

152 número 234 del libro

Oficio del Negociado de Tesis,

Adaptación y modificaciones de corta y larga  
duración en la actividad eléctrica de neuronas  
de la corteza cerebral *in vitro*

Rafael Jesús Montoro Laseca

Tesis presentada para optar al grado de Doctor en Medicina  
por la Universidad de Sevilla

Sevilla, 1992

R. 19490



DEPARTAMENTO DE FISILOGIA:  
FISILOGIA MEDICA Y BIOFISICA  
FACULTAD DE MEDICINA

AVDA. SANCHEZ PIZJUAN, 4 - 41009 SEVILLA - Teléfs. (95) 437 15 46 - 490 00 66 - Fax (95) 490 00 67

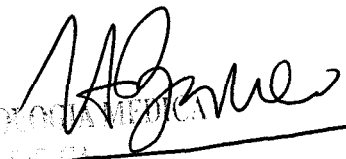
D. José López Barneo, Catedrático de Fisiología del Departamento de Fisiología:  
Fisiología Médica y Biofísica, de la Universidad de Sevilla

CERTIFICA:

Que D. Rafael Jesús Montoro Laseca ha realizado bajo su dirección en dicho Departamento el trabajo titulado "Adaptación y modificaciones de corta y larga duración en la actividad eléctrica de neuronas de la corteza cerebral *in vitro*", que presenta para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía por la Universidad de Sevilla.

Sevilla, 23 de noviembre de 1992.



  
DETO. DE FISIOL. MED. Y BIOFISICA  
FACULTAD DE MEDICINA  
D. José López Barneo



## **Agradecimientos**

*Quiero expresar mi agradecimiento en primer lugar a José López Barneo por haberme brindado la posibilidad de integrarme en su grupo de investigación, por haber creado la infraestructura técnica y humana donde el hacer investigación pueda ser cada vez más estimulante y menos heroico y sobre todo por su talante personal. A Diego Mir, pues fué la excelencia de sus clases de Fisiología lo que me atrajo a este Departamento. A Lucía Tabares, con quien inicié mi andadura científica. A Guillermo Alvarez de Toledo, que me "inició" en el mundo de la electrónica y de cuyo ejemplo he aprendido lo que significa "amor al trabajo". A Juan Ureña que creó gran parte del "software" que he utilizado en la conversión analógica-digital de mis datos. A Dora Jassik-Gerschenfeld, por su estímulo para el estudio de la corteza visual. A Jesús Avila y Javier Díaz Nido, pues gracias a su colaboración se han realizado los experimentos de bioquímica. A todos los miembros del Departamento de Fisiología Médica y Biofísica, pues todos han influido en la consecución de esta Tesis, en especial a Antonio Castellano, Juanjo Toledo, Rafael Fernandez Chacón y Antonio Marín, por todas las veces que me han ayudado y a Antonio Molina, por amenas charlas fruto de las cuales surgieron conceptos tales como el "oohismo".*

*Entre todos han conseguido que en el tiempo de realización de este trabajo, además del avance en el conocimiento científico haya conseguido un más importante avance en mi maduración humana, lo que de corazón agradezco.*

*También quiero agradecer la financiación de esta Tesis Doctoral con una beca del Programa Nacional para la Formación de Personal Investigador.*

*A mis padres*

*A Luisa María*

*"Una grande y determinada determinación de no parar hasta llegar,  
venga lo que viniere, suceda lo que sucediera, trabaje lo que trabajare,  
murmure quien murmurare, siquiera me muera en el camino, siquiera se  
hunda el mundo."*

*Teresa de Avila*

## **CONTENIDO**

<b>INTRODUCCION Y OBJETIVOS</b>	<b>1</b>
<b>MATERIAL Y METODOS</b>	<b>8</b>
1. Obtención de las secciones de cerebro	8
2. Dispositivo experimental para el registro intracelular	11
3. Soluciones empleadas en el registro intracelular	12
4. Registro del potencial de membrana	13
4.1. Equipo electrónico de registro	13
4.2. Electrodo	15
4.3. Estimulación extracelular	16
4.4. Proceder experimental	17
5. Adquisición y reproducción de datos	17
5.1. Esquema del sistema	17
5.2. "Posttrigger"	18
6. Preparación de las secciones para el análisis bioquímico	20
7. Identificación de las proteínas	21

	<i>Contenido</i>
7.1. Electroforesis	21
7.2. Identificación mediante anticuerpos	22
8. Mapas peptídicos	23
9. Purificación de proteínas y fosforilación posterior	23
<b>RESULTADOS</b>	<b>24</b>
<b>A. PROPIEDADES ELECTROFISIOLOGICAS Y ADAPTACION EN EL DISPARO REPETITIVO DE NEURONAS DEL CORTEX VISUAL</b>	<b>24</b>
1. Tipos celulares según el patrón de disparo	24
1.1. Células tónicas	28
1.2. Células con agrupamiento inicial	32
2. Estudio farmacológico de los cambios de potencial en respuesta a pulsos de corriente	35
2.1. Respuesta subumbral	37
2.1.1. Conductancias para el Na <sup>+</sup> en la respuesta subumbral	39
2.1.2. Conductancias para el Ca <sup>2+</sup> en la respuesta subumbral	39
2.2. Respuesta supraumbral	42
2.2.1. Conductancias para el Ca <sup>2+</sup>	42
2.2.2. Efecto del bloqueo de la conductancia para el Ca <sup>2+</sup>	45
2.2.3. Efecto del bloqueo de conductancias para el K <sup>+</sup>	49
3. Adaptación a corto plazo en células tónicas y células con agrupamiento inicial	51
3.1. Variación de la adaptación a corto plazo con la intensidad del estímulo	55
3.2. Variación de la adaptación a corto plazo con el potencial de membrana	56

3.3. Variación de la frecuencia instantánea con la intensidad del estímulo	57
4. Adaptación a largo plazo en la corteza visual.	60
<b>B. POTENCIALES POSTSINAPTICOS EN CELULAS HIPOCAMPICAS, CARACTERISTICAS GENERALES Y MODIFICACIONES POR LA APLICACION DE N-METIL-D-ASPARTATO Y LA DESPOLARIZACION</b>	<b>65</b>
1. Componentes de la aferencia sináptica a células CA1 del hipocampo al estimular en el <i>stratum radiatum</i>	65
2. Tipos de receptores glutamatérgicos responsables de los dos componentes de la aferencia sináptica a células del área CA1	68
3. Efecto de la aplicación de N-metil-D-aspartato en la respuesta postsináptica obtenida en células del área CA1.	70
3.1. Evolución del potencial de membrana durante la aplicación de N-metil-D-aspartato.	71
3.2. Variación de la amplitud del componente monosináptico tras la aplicación de N-metil-D-aspartato.	72
3.3. Variación de la resistencia de entrada de la membrana tras la aplicación de N-metil-D-aspartato.	75
3.4. Aparición del componente polisináptico tras la exposición a N-metil-D-aspartato.	75
3.5. La aplicación repetida de N-metil-D-aspartato tiene un efecto aditivo.	79
3.6. El componente polisináptico no se obtiene si se seccionan las conexiones entre CA1 y CA3.	80
3.7. La estimulación tetánica repetida puede tener un efecto idéntico a la aplicación de N-metil-D-aspartato.	81
4. Cambios inducidos por la despolarización.	82
4.1. Cambios en la respuesta sináptica inducidos por alto $K^+$ extracelular.	82



4.2. Cambios en la respuesta sináptica inducidos por la despolarización postsináptica con corriente continua.	85
<b>C. FOSFORILACION/DESFOSFORILACION DE LA PROTEINA TIPO 2 ASOCIADA A MICROTUBULOS EN RESPUESTA A LA APLICACION DE N-METIL-D- ASPARTATO Y A LA DESPOLARIZACION</b>	88
1. El N-metil-D-aspartato induce la desfosforilación de la proteína tipo 2 asociada a microtúbulos.	89
2. La despolarización con alto potasio extracelular induce la fosforilación de la proteína tipo 2 asociada a los microtúbulos.	92
<b>DISCUSION</b>	97
1. Tipos celulares según el patrón de disparo en la corteza visual.	98
2. Adaptación en el disparo repetitivo en el cortex visual.	104
3. Componentes de la respuesta postsináptica en células del área CA1 del hipocampo	109
4. Variación de la aferencia sináptica al área CA1 tras el tratamiento con N-metil-D-aspartato o alto potasio extracelular.	111
5. Variación del estado de fosforilación de la proteína tipo 2 asociada a microtúbulos por la aplicación de N-metil-D-aspartato y alto potasio extracelular.	117
<b>CONCLUSIONES</b>	122
<b>REFERENCIAS</b>	127

## ABREVIATURAS

ACP	adaptación a corto plazo
AKE	alto potasio externo
ALP	adaptación a largo plazo
APV	D,L-2-amino-5-fosfonovalerato
ATP	adenosina 5'-trifosfato
CAI	células con agrupamiento inicial
CDA	células con disparo agrupado
CMKII	proteína kinasa tipo II dependiente del complejo $Ca^{2+}$ /calmodulina
CNQX	6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona
CT	células tónicas
CZ	calmidazolium
EGTA	ácido etilen glicol-bis-( $\beta$ -aminoetil eter)N,N,N',N'-tetracético
FI	frecuencia instantánea
H7	1-(5-isoquinolinasulfonil)-2-metil piperazina
IEP	intervalo entre potenciales de acción
$K_{Ca}$	conductancia para potasio dependiente de $Ca^{2+}$
$K_{Na}$	conductancia para potasio dependiente de $Na^{+}$
MES	ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico
MAP1	proteína tipo 1 asociada a los microtúbulos
MAP2	proteína tipo 2 asociada a los microtúbulos
NMDA	N-metil-D-aspartato
PDA	potencial de acción
PDM	potencial de membrana
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PBS	solución de tampón fosfato
PHP	posthiperpolarización
PKC	proteína kinasa C
PPSE	potencial postsináptico excitador
PPSI	potencial postsináptico inhibitor
RE	resistencia de entrada
SDS	dodecilsulfato de sodio
SNC	sistema nervioso central
SR	stratum radiatum
TEA	tetraetilamonio
TTX	tetrodotoxina

## INTRODUCCION Y OBJETIVOS

El sistema nervioso central lleva a cabo sus complejas funciones gracias a la actividad armónica de sus unidades básicas, las neuronas, que son células de una enorme sofisticación morfológica y funcional. Una neurona típica recibe decenas de miles de aferencias y es capaz de generar en cada instante la respuesta bioquímica y electrofisiológica adecuada que permite la transmisión a otras células de una información coherente con el "status" funcional del sistema nervioso. Las aferencias que llegan al individuo son integradas mediante las relaciones sinápticas existentes entre las neuronas, que al contactar entre sí forman circuitos que constituyen verdaderas "redes" neuronales. La información aferente que recibe cada neurona es integrada generándose a su vez una información eferente que se transmite a las siguientes neuronas de los circuitos en los que está inmersa. La información eferente se codifica mediante la frecuencia de generación de potenciales de acción que se producen en el segmento inicial del axón y se propagan a lo largo de la fibra nerviosa. En el segmento inicial del axón se supone la existencia de canales de  $\text{Na}^+$  de umbral relativamente bajo, por lo que el valor del potencial de membrana en ese punto y la rapidez con que se modifique determinan la frecuencia instantánea de potenciales de acción, producidos por la activación asincrónica de conductancias dependientes de voltaje para el  $\text{Na}^+$  y el  $\text{K}^+$  (Hodgkin y Huxley, 1952).

El desarrollo del conocimiento de la estructura del sistema nervioso mediante técnicas morfológicas, indujo un modelo de funcionamiento de cada neurona como un elemento pasivo, que realizaba la integración de la información mediante la suma de las aferencias que le llegaban, que en función de su disposición espacial y temporal determinaban el patrón de disparo neuronal. Posteriormente el estudio de las características electrofisiológicas de las neuronas modificó esta concepción de la actividad neuronal poniendo de manifiesto que conductancias dependientes de voltaje distintas a las descritas para el  $\text{Na}^+$  y el  $\text{K}^+$  en el axón del calamar (Hodgkin y Huxley, 1952), participaban en la modulación de la frecuencia de generación de los potenciales de acción, confiriendo así unas propiedades intrínsecas a cada neurona (Kandel, 1976; Llinás, 1988). Esta concepción de la actividad neuronal que se describió inicialmente en células nerviosas de invertebrados (Kandel, 1976), se pudo comprobar en neuronas del sistema nervioso central de vertebrados gracias a la utilización de la técnica de registro intracelular en secciones de cerebro, en las que era posible manipular el medio extracelular (Llinás y Sugimori, 1980a; Llinás y Jahnsen, 1982). El comportamiento electrofisiológico de las neuronas depende por tanto no solo del número, distribución y naturaleza de las entradas sinápticas (excitadoras e inhibitorias), sino también de sus propiedades intrínsecas que vendrán determinadas por los tipos de canales iónicos dependientes de voltaje que exprese en su membrana plasmática. El esquema general de la disposición de las conexiones sinápticas y los tipos de canales iónicos que una neurona presenta, vienen determinados genéticamente en orden a realizar las funciones que se han adquirido a través de la evolución filogénica. No obstante en este esquema se incluyen mecanismos que permiten realizar un ajuste fino a las condiciones externas de cada momento, dotando al sistema nervioso de una enorme plasticidad y por tanto posibilidad de adaptación a distintas situaciones, pudiendo discriminar la información aferente en rangos temporales de forma superior a cualquier otro sistema o adquirir estados funcionales distintos dependientes de situaciones previas.

Como se ha señalado el estudio de las propiedades intrínsecas de las neuronas de vertebrados, avanzó de forma fundamental con el empleo de secciones de cerebro. En la década pasada se ha comprobado que neuronas agrupadas en áreas cerebrales concretas tienen, en general, idénticas propiedades eléctricas intrínsecas. El patrón de respuesta de las neuronas de la oliva inferior, por ejemplo, es característico (Llinás y Yarom, 1981) y se distingue fácilmente de los patrones de disparo de neuronas del cerebelo, de la corteza cerebral o del tubérculo cuadrigémino superior (Llinás, 1988). En algunas estructuras, como por ejemplo el septum, diferentes tipos

electrofisiológicos neuronales se disponen preferentemente en distintos subnúcleos y algunas células dependiendo del valor del potencial de membrana pueden presentar tipos de respuestas funcionales distintas (Alvarez de Toledo y López-Barneo, 1988; Steriade y Llinás, 1988). Parece existir por tanto, un "lenguaje electrofisiológico" típico de cada estructura cerebral que es el resultado de la individualidad biofísica de las neuronas.

En la corteza cerebral la estructuración funcional se realiza mediante columnas perpendiculares a la superficie cerebral de unos 200-500  $\mu\text{m}$  de diámetro (Mountcastle, 1957; Hubel y Wiesel, 1977) que a su vez se dividen en capas atendiendo a las características morfológicas celulares. En el neocortex de mamíferos las neuronas se han clasificado atendiendo a sus propiedades electrofisiológicas intrínsecas (McCormick, Connors, Lighthall y Prince, 1985; Connors y Gutnick, 1990) en "células de disparo rápido", que pueden mantener una alta frecuencia de disparo con poca o ninguna adaptación; "células de disparo regular", que presentan una clara adaptación durante un pulso mantenido y "células generadoras de brotes de espigas", que presentan los potenciales de acción agrupados en forma fásica. Además de su patrón de disparo, otras dos variables utilizadas para realizar la anterior clasificación son la morfología de los potenciales de acción y la variación de la frecuencia instantánea de las espigas con el aumento de intensidad del estímulo (Connors y Gutnick, 1990).

Aunque no existe una relación inequívoca entre la morfología y el patrón de disparo de las neuronas corticales, se admite que las células de disparo rápido son neuronas no piramidales, posiblemente interneuronas inhibitorias (McCormick et al., 1985), mientras que las células de disparo regular y las generadoras de brotes son células piramidales o estrelladas espinosas, constituyendo las células excitadoras del cortex (Landry, Wilson y Kitai, 1984; McCormick et al., 1985). La modificación de la frecuencia de disparo en el tiempo implica que la respuesta neuronal cambia aún cuando la información excitatoria aferente se mantenga constante. Esta propiedad tiene una evidente funcionalidad en la organización espacio-temporal del cerebro ya que puede estar involucrada, por ejemplo, en la discriminación que éste realiza entre estímulos novedosos y los que no lo son. En otras estructuras cerebrales, como el colículo superior, la adaptación que sufre el disparo neuronal puede presentar una constante de tiempo similar a la observada en la adaptación sensorial (Llinás y

López-Barneo, 1988). Cómo el cerebro utiliza los diferentes patrones de disparo de las células neocorticales en la elaboración de la información es una pregunta que sigue abierta.

La adaptación del disparo neuronal puede mediar por tanto fenómenos "plásticos" de corta duración, pero en las neuronas ocurren además otras modificaciones que también alteran su relación entrada-salida, y que se basan en la plasticidad de sus relaciones sinápticas. Estas modificaciones pueden ser duraderas, permitiendo aprovechar las experiencias adquiridas durante el desarrollo ontogénico para conseguir una mejor adaptación al medio externo. Los dos primeros trabajos que mostraron una alteración de larga duración en una relación sináptica, aparecieron en 1973 describiendo una potenciación que ocurría en las células del giro dentado del hipocampo, al realizar una estimulación tetánica de la vía perforante. Esta potenciación duraba horas en el animal anestesiado (Bliss y Lomo, 1973) y semanas si se realizaba en el animal despierto (Bliss y Gardner-Medwin, 1973). Posteriormente este fenómeno se describió en el área CA1 del hipocampo (Schwartzkroin y Wester, 1975; Lynch, Dunwiddie y Gribkoff, 1977), área CA3 (Alger y Teyler, 1976) y en muchas otras localizaciones del sistema nervioso central (subiculum, septum, cortex cerebelar, nucleos cerebelares, neocortex,..). Para que esta potenciación se produjese se comprobó que era necesaria la activación de un subtipo de los receptores glutamatérgicos, los receptores para N-metil-D-aspartato (NMDA) (Collingridge, Kehl y McLennan, 1983; Harris, Ganong y Cotman, 1984).

El estudio de las propiedades de los receptores NMDA en la aferencia que las células piramidales del área CA1 del hipocampo reciben desde el área CA3 por la colateral de Schaffer, es especialmente apropiado pues es dentro del sistema nervioso central una de las aferencias sinápticas que presenta mayor densidad de receptores NMDA en base a los estudios de marcaje autoradiográfico (Monaghan, Holets, Toy y Cotman, 1983; Monaghan, Yao, Olverman, Watkins y Cotman, 1984), y muestra una pronunciada potenciación en los estudios electrofisiológicos realizados en secciones de hipocampo (Schwartzkroin y Wester, 1975; Alger y Teyler, 1976). Estos receptores tienen un canal iónico asociado, que permite el paso de  $\text{Ca}^{2+}$  y otros cationes al interior celular, cuando la célula postsináptica está suficientemente despolarizada como para que se elimine el bloqueo que ejerce el  $\text{Mg}^{2+}$  en el canal (Mayer y Westbrook, 1987; Ascher y Nowak, 1988). La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  puede activar a kinasas (proteína kinasa C y  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina kinasa), proteasas

(calpainas) y fosfatasa (calcineurina), que pueden estar involucradas en las modificaciones metabólicas responsables de las alteraciones sinápticas derivadas de la activación de los receptores NMDA.

Los receptores NMDA participan también en otro tipo de modificaciones de la respuesta sináptica como son el "kindling" (Slater, Stelzer y Galvan, 1985; Mody y Heinemann, 1987; Gean, Shinnick-Gallager y Anderson, 1989) y las respuestas epilépticas (Herron, Williamson y Collingridge, 1985; Dingledine, Hynes y King, 1986; Hablitz y Langmoen, 1986). El "kindling" consiste en hacer epileptogénica una zona del sistema nervioso central en el animal completo, para lo que se estimula una aferencia a esta área diariamente con un estímulo tetánico (normalmente 60 Hz durante 1 s), con lo que aparece un componente polisináptico (o postdescarga) en la respuesta, que aumenta con los días en duración, amplitud y frecuencia, y finalmente origina un ataque epiléptico en el animal (Mody y Heinemann, 1987; Gean et al., 1989). Aunque la potenciación de larga duración y el "kindling" tienen protocolos de inducción semejantes y ambos resultan en un aumento duradero de la respuesta sináptica a un estímulo, existen rasgos diferenciales entre ambos fenómenos. Mientras que la potenciación de larga duración dura entre horas y semanas, el "kindling" es permanente (Cain, 1989) y mientras que los antagonistas específicos de los receptores NMDA impiden la inducción de aquella en algunas localizaciones como las neuronas piramidales del área CA1 (Collingridge y Bliss, 1987), retrasan pero no impiden el desarrollo del "kindling" y de la actividad epiléptica (Herron et al., 1985; Hablitz y Langmoen, 1986; Cain, 1989). Por otra parte el "kindling" facilita la respuesta a sustancias que provocan ataques epilépticos y se favorece por la aplicación repetida de estos agentes (Cain, 1989). Por todo lo anterior el kindling se considera un modelo para estudiar la epilepsia mientras que la potenciación a largo plazo no.

Los mecanismos moleculares subyacentes a todos estos tipos de cambios "plásticos" en las sinapsis no han sido aún establecidos, pudiendo participar en ellos modificaciones de las proteínas del citoesqueleto, que medien los cambios morfológicos observados en las espinas dendríticas tras la potenciación de la eficacia sináptica (Fifkova y Van Harreveld, 1977; Chang y Greenough, 1984; Morales y Fifkova, 1989; Calverley y Jones, 1990; Friedrich, 1990). De particular interés a este respecto resulta la proteína tipo 2 asociada a los microtúbulos (MAP2), que es especialmente abundante en las densidades postsinápticas de las espinas dendríticas (Cáceres, Banker, Steward, Binder y Payne, 1984; Morales y Fifkova, 1989) y cuyo

estado de fosforilación parece regular su unión al citoesqueleto (Murthy y Flavin, 1983; Hoshi, Akiyama, Shinohara, Ogawara, Nishida y Sakai, 1988; Díaz-Nido, Serrano, Hernández y Avila, 1990; Brugg y Matus, 1991).

La capacidad adaptativa del sistema nervioso central al mundo externo, se basa por tanto en modificaciones en el estado funcional de las neuronas. Estos cambios dependen, por un lado, del tipo y distribución de los canales iónicos dependientes de voltaje los cuales determinan las propiedades intrínsecas de las células y su patrón de respuesta electrofisiológica. Por otro lado, la eficacia sináptica, factor que depende de canales regulados por los neurotransmisores y que determina el "status" de los circuitos sinápticos, es susceptible de modificación, lo que permite el aprendizaje y la integración de la experiencia acumulada por cada individuo en el esquema organizativo básico de su sistema nervioso.

En base a lo indicado anteriormente los objetivos generales de este trabajo han sido el estudio de los mecanismos responsables a nivel celular de las adaptaciones temporales en las características electrofisiológicas de los elementos neuronales. En neuronas de la corteza visual se han estudiado sus propiedades electrofisiológicas intrínsecas y las conductancias iónicas subyacentes, con especial atención a la adaptación a corto y largo plazo en el disparo neuronal. Por otra parte, en células piramidales del área CA1 de la corteza hipocámpica, se han analizado los cambios que la aplicación de NMDA y la despolarización producen en su respuesta sináptica y las modificaciones que de forma paralela ocurren en el estado de fosforilación de la MAP2.

Los objetivos específicos han sido:

1. Estudio de los patrones de disparo de las neuronas de la capa II-III de la corteza visual del cobaya, con pulsos intracelulares de corriente.
2. Análisis farmacológico de la respuesta subumbral y supraumbral obtenida con estos pulsos de corriente.
3. Estudio de la adaptación a corto y largo plazo en el disparo repetido de potenciales de acción en estas neuronas corticales.



4. Análisis de los componentes de la respuesta sináptica en neuronas piramidales del área CA1, al estimular en el *stratum radiatum* del hipocampo.
5. Caracterización del efecto en la respuesta sináptica de la aplicación de NMDA a la sección de hipocampo y su comparación con la acción de la despolarización inducida mediante alto potasio extracelular o con corriente continua.
6. Estudio del efecto de NMDA y alto potasio extracelular en el estado de fosforilación de la MAP2.

## **MATERIAL Y METODOS**

### **1. Obtención de las secciones de cerebro**

Los experimentos se realizaron en secciones de cerebro de 500  $\mu\text{m}$  de grosor. Para el estudio en la corteza visual las secciones se obtuvieron del cerebro de cobayas albinos de la raza Dunkin-Hartley. Para el estudio en la corteza hipocámpica se utilizaron ratas albinas de la raza Wistar. Los animales se mantuvieron antes de los experimentos en condiciones de alimentación *ad libitum*.

Los animales se sacrificaron previa anestesia con pentotal sódico (tiopental sódico, Abbot), mediante una inyección intraperitoneal que supuso una dosis de 2,5 mg/100 g de peso. Una vez el animal dormido se obtuvo la cabeza del mismo cortando a nivel del cuello con una pequeña guillotina (Letica, Barcelona). A continuación se cortó el cuero cabelludo mediante una incisión sagital, abatiendo los dos colgajos resultantes hacia fuera. Seguidamente se fracturó la zona interorbitaria con una pequeña gubia, rechazando la calota craneal hacia fuera de forma que el cerebro quedase fácilmente accesible desde arriba, cortándose la duramadre si no había quedado pegada a la calota. Se realizaron entonces dos cortes para seccionar los filetes olfativos y el tallo cerebral y a continuación se extrajo el cerebro mediante una espátula que se introdujo con sumo cuidado por debajo del mismo de delante hacia atrás de forma que se cortaran los pares craneales, y al alcanzar el polo

occipital del cráneo levantase toda la masa encefálica. El cerebro se sumergió inmediatamente en la solución estándar (ver apartado 3) a 4°C, que había sido burbujeadada con carbógeno (95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>) al menos durante 30 min. Desde que se cortó la cabeza del animal hasta que el cerebro se sumergió en la solución pasaron entre 1,5 y 3 min.

El tejido se mantuvo en la solución fría ≈ 30 s, durante los cuales se extendió una película de cianoacrilato sobre la base de una cubetita de metacrilato. Se sacó entonces el cerebro y se hizo un bloque de forma que al apoyarlo sobre el plano por donde luego iba a ser pegado a la cubetita, quedara la superficie de la corteza lo más perpendicular posible a este plano de unión. Con esta disposición el plano de corte que fué siempre horizontal, cortó la corteza de forma aproximadamente perpendicular a su superficie, lo que es idóneo, teniendo en cuenta que ésta es la disposición funcional de las columnas de la corteza cerebral. A los lados y detrás del bloque de tejido se pegaron junto a él, unas piecitas de agar al 2%, que evitaron la deformación de la pieza durante el proceso de corte.

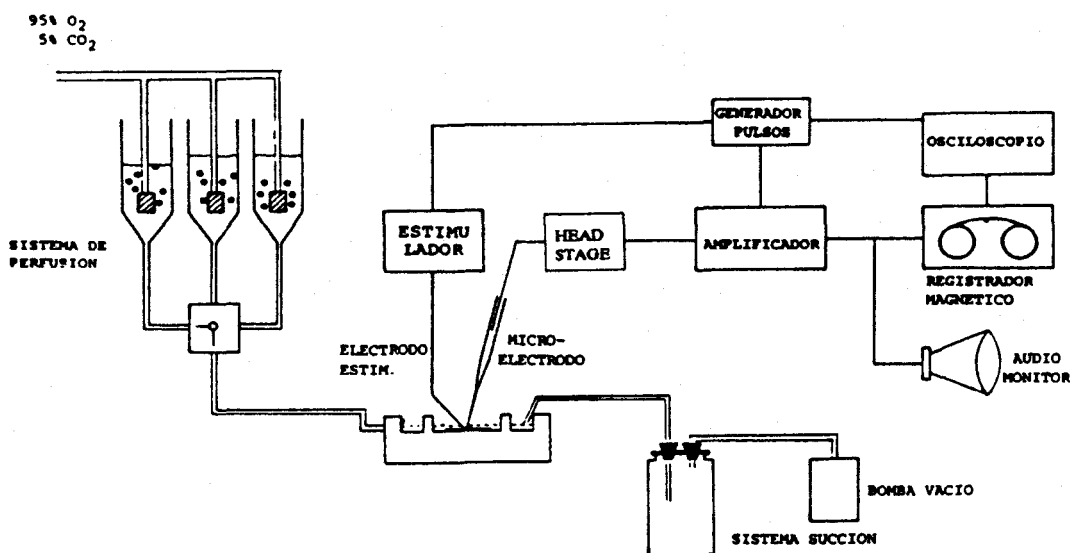


Figura 1. Esquema del dispositivo experimental para el registro de potencial intracelular. Las soluciones flúan por gravedad desde los compartimentos de la derecha, a través de la cámara de registro, para ser succionadas del compartimento lateral izquierdo. Tanto el microelectrodo de registro como el electrodo de estimulación se movían mediante dos micromanipuladores no representados en el esquema. La iluminación de la preparación se realizaba mediante una lámpara situada debajo de la cámara de registro.

El corte se realizó mediante un vibratomo (Vibratome 1000, Lancer, San Luis, MO, EE.UU.), estando el bloque en la cubetita antes citada y sumergido en la solución control a  $\approx 4^{\circ}\text{C}$ . Se obtuvieron así secciones de  $500\ \mu\text{m}$  en general, aunque en ocasiones se hicieron de  $350\ \mu\text{m}$ , sin observarse ninguna diferencia en los resultados. Una vez obtenida cada sección se pasó a un vial independiente con la misma solución y burbujeo de carbógeno, pero estando a temperatura ambiente. En estos viales (en general se obtuvieron 6 secciones de cada animal), se mantuvieron las secciones al menos durante 1 h, antes de pasar a realizar los experimentos. El objeto de esta incubación fué que las células se recuperaran del trauma causado por el corte, lo cual se consiguió en la gran mayoría de ellas a juzgar por la pequeña proporción de células que se tiñeron al cabo de esta hora, cuando se comprobó su estado con Azul Tripán, colorante vital que sólo penetra en aquellas células muertas o altamente deterioradas. En el caso de las secciones en las que se iban a realizar los experimentos de bioquímica con el isótopo radiactivo  $^{32}\text{P}$ , la solución de corte e incubación fué la llamada 0  $\text{PO}_4$  en la tabla 1.

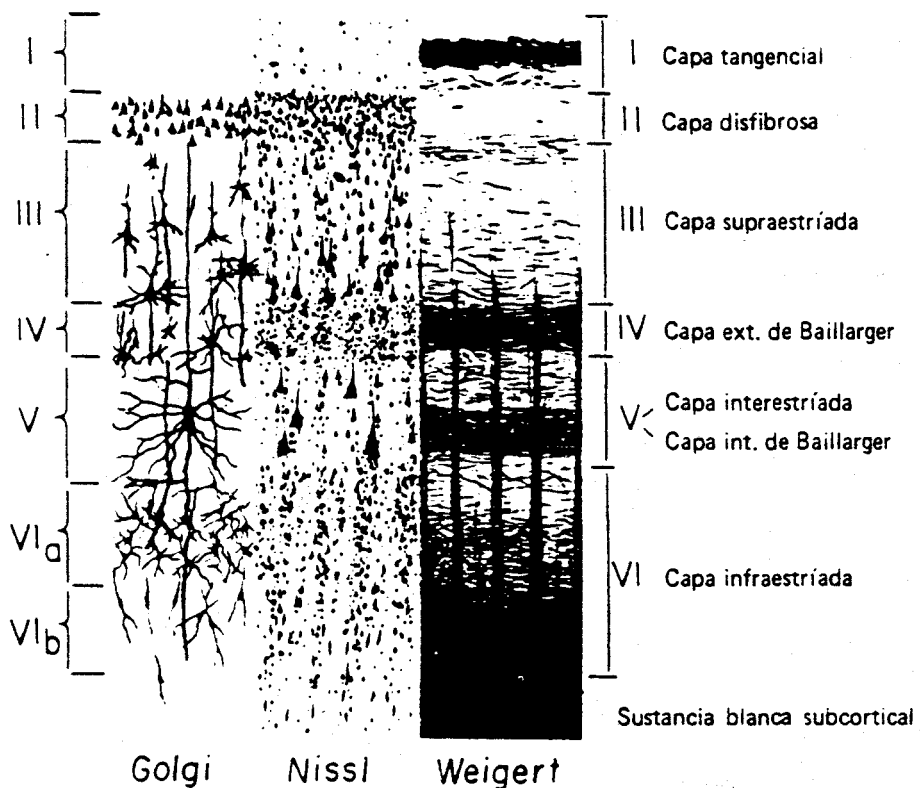
En el caso de la corteza visual, el plano de apoyo y pegado del bloque fué unos  $20^{\circ}$  inclinado con respecto al plano frontal, y no se recogieron las secciones correspondientes al  $1^{\text{er}}$  mm, pues en esa zona el corte era inevitablemente muy tangencial a la superficie cortical. A partir de esta distancia se cogieron seis secciones de  $500\ \mu\text{m}$  cada una, con lo que el corte alcanzó los 4 mm a partir del polo occipital del cerebro. No obstante, debido a los distintos tamaños de los animales estudiados, y para poder comparar los resultados entre todos ellos, se han simplificado las regiones de corte a tres, que en general se corresponden con la zona de corteza comprendida entre el  $1^{\text{er}}$  y el  $2^{\circ}$  mm, el  $2^{\circ}$  y el  $3^{\circ}$  mm, y el  $3^{\circ}$  y  $4^{\circ}$  mm respectivamente, midiendo a partir del polo occipital en cobayas de un peso de 250 gr. En la primera zona el ventrículo muestra una forma de huso alargado, en la segunda su límite lateral tiene forma de corazón y en la tercera zona el ventrículo va tomando forma triangular, existiendo un importante componente de fibras, en su vértice lateral inferior. La mayoría de los registros obtenidos en la corteza visual se realizaron en el área 17, según la topología realizada mediante potenciales evocados (Creel y Giolli, 1972). Asimismo se realizaron siempre lateral a la fisura sagital lateral, pues a veces no se encuentran potenciales evocados, medial a este surco (Choudhury, 1978).

En el caso de la corteza hipocámpica, para obtener secciones perpendiculares al eje longitudinal del hipocampo, primero se cortó el cerebro según el plano sagital

central, sobre el que se apoyó un hemisferio y se seccionó según un plano inclinado 20 ° con respecto al horizontal. Sobre este último plano se apoyó el bloque para su corte en el vibratomo.

## 2. Dispositivo experimental para el registro intracelular

Tras el período de incubación, la sección objeto de estudio se pasó a una cámara de registro fabricada en nuestro laboratorio (Alvarez de Toledo, 1985), en la que la sección se encuentra sumergida en la solución. Esquemáticamente (figura 1), la cámara se divide en tres dependencias, una lateral de entrada de la solución, otra central propiamente de registro donde se sitúa la sección y otra lateral donde se sitúa una aguja de succión por vacío, que sirve además para regular el nivel de llenado de la cámara. La solución era calentada antes de llegar a la cámara de registro al ser conducida por un serpentín situado en una cámara con agua caliente, y la temperatura



**Figura 2.** Correspondencia de la distribución cito y mieloarquitectónica en la corteza cerebral. Se compara la distribución celular estudiada mediante una tinción de Golgi y una de Nissl, con la distribución de las fibras mielínicas obtenida mediante una tinción de Weigert. (Tomada de Brodmann, 1909).

de la solución se monitorizaba de forma constante mediante un termistor introducido en la dependencia lateral de succión. En la dependencia central se situaba también la tierra del dispositivo electrónico, fabricada con alambre de plata clorurado (Ag-ClAg).

Para evitar interferencias electromagnéticas en el registro del potencial intracelular, sobre todo con la corriente alterna industrial (50 Hz) que alimenta todo el equipo del laboratorio, la cámara de registro se situó dentro de una Jaula de Faraday, que se apoyaba en una plancha metálica que a su vez estaba colocada sobre unas cámaras neumáticas llenas de aire, situadas sobre un bloque de granito. Este bloque se apoyaba en el suelo a través de dos recipientes con arena, de forma que el dispositivo en conjunto filtraba las vibraciones mecánicas que se pudieran originar en el suelo del laboratorio.

Dentro de la Jaula y sobre la cámara de registro se situó un estereomicroscopio (Nikon, mod. 102, Nippon K., NY, EE.UU.), mediante el cual se pudieron localizar las capas de estimulación y registro. La sección se visualizó por transiluminación mediante una lámpara alimentada con corriente continua situada debajo de la cámara de registro, de forma que en la sección se veían más oscuras las zonas ricas en fibras y más claras las zonas predominantemente celulares, de forma parecida a lo que se obtiene mediante una tinción de Weigert (figura 2). A la derecha de la cámara de registro se situó un micromanipulador, en el que se colocó el electrodo de registro y el "head stage" del amplificador de registro (ver apartado 4.1). A la izquierda de la cámara de registro se situó otro micromanipulador con el que se colocó el electrodo de estimulación extracelular (figura 1).

### **3. Soluciones empleadas en el registro intracelular**

La solución que se hacía pasar por la cámara de registro se cambió mediante un juego de llaves de 3 pasos (figura 1). Las soluciones empleadas permanecieron en burbujeo con carbógeno al menos 30 min antes de ser empleadas, de forma que se obtuviera una solución enriquecida de  $O_2$  y que el tampón  $CO_2$ -bicarbonato fijara el pH en 7,4. La composición de estas soluciones se muestra en la tabla 1. El resto de sustancias utilizadas en los experimentos se disolvieron en la solución estándar (para obtener la concentración final deseada), y a continuación esta solución estándar se hizo pasar por la cámara de registro. Todos los productos químicos fueron obtenidos

**Tabla 1.** Soluciones externas utilizadas en el registro intracelular

	Estándar	0 PO <sub>4</sub>	AKE*	0 Ca	0 Na	Co
ClNa	124	125		127		130
ClK	5	5	129	5	5	5
Cl <sub>2</sub> Ca	2.4	2.4	2.4		2.4	
Cl <sub>2</sub> Co						2.4
Cl <sub>2</sub> Mg						
SO <sub>4</sub> Mg	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	
PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> Na	1.2		1.2	1.2	1.2	
Trizma*					155	25
CO <sub>3</sub> HNa	26	26	26	26		
Glucosa	10	10	10	10	10	10
O <sub>2</sub>	95%	95%	95%	95%	95%	95%
CO <sub>2</sub>	5%	5%	5%	5%	5%	5%

Los valores se indican en mM.

\* AKE, solución con alto potasio externa.

Trizma, Tris (hidroximetil) aminometano, pH= 7.4 (Sigma).

de Sigma (San Luis, MO, EE.UU.), excepto la 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona (CNQX) que fué obtenida de Tocris Neuroamin (Bristol, Reino Unido).

#### 4. Registro del potencial de membrana

##### 4.1. Equipo electrónico de registro

El equipo de registro consistió básicamente en un generador de pulsos y un amplificador de registro intracelular construidos en nuestro laboratorio (Alvarez de Toledo, 1985; Alvarez de Toledo y López-Barneo, 1988). El generador de pulsos tuvo las siguientes características:

- un pulso tipo TTL (5 V de amplitud), para poder sincronizar todo el equipo electrónico. La frecuencia de generación de este pulso podía oscilar entre 0,1 y 10 Hz.

- un primer pulso de estimulación, de una duración entre 5 ms y 1 s y una amplitud entre 0 y 500 mV, que podía ser positivo o negativo. Este pulso se originaba con un retraso respecto del de sincronización que podía oscilar entre 0 y 300 ms. El objeto de este retraso era poder adquirir, antes de que se produjese el pulso, el registro del potencial de membrana durante el tiempo que se deseara dentro del rango mencionado, lo que a su vez permitía centrar el pulso en la pantalla del osciloscopio.

- un segundo pulso de estimulación, controlado independientemente del primero, que se podía originar con un retraso respecto del 1º entre 1 y 300 ms. Este retraso podía comenzar desde el inicio del 1º pulso o desde el final del mismo. La amplitud de este 2º pulso tuvo el mismo rango que el 1º. Su duración tuvo un rango entre 5 y 300 ms. Este 2º pulso podía generarse repetitivamente hasta 99 veces, con un intervalo entre los pulsos que se oscilaba entre 3 y 100 ms.

El amplificador de registro intracelular tenía las siguientes características:

- podía generar pulsos de corriente continua, actuando como un convertidor voltaje-corriente con una relación de 1 nA/100 mV, con lo que atendiendo a las características del generador de pulsos la amplitud del pulso inyectado a la célula tenía un rango entre 0 y 5 nA.

- además de este pulso se podía generar una corriente continua positiva o negativa, con un rango entre 0 y 2 nA, con la que se podía mantener la célula despolarizada o hiperpolarizada.

- compensación de las características eléctricas de los electrodos. Se podía compensar la resistencia de los electrodos de registro (micropipetas, ver más adelante), con un rango entre 0 y 200 MΩ. Asimismo se pudo compensar la pequeña capacidad que tiene el electrodo por estar dos medios conductores, que son la solución del electrodo y la del baño donde se encuentra sumergido, separados por una delgada capa aislante formada por la propia micropipeta.

- una parte importante del amplificador la constituyó un circuito de oscilación eléctrica que incluía al electrodo de registro. Esta oscilación permitió limpiar la punta del electrodo cuando se ensuciaba en su avance a través de la sección y facilitó el acceso al interior celular una vez que se había contactado con una membrana celular (ver apartado 4.4).



- merece mención aparte el "head stage" del amplificador (ver figura 1). Esta parte del amplificador de registro es una pequeña cajita metálica en la que se alojan el amplificador operacional al que va conectado el electrodo de registro y parte del circuito para la oscilación eléctrica. Este primer amplificador operacional de la etapa de amplificación (AD 515, Analog Devices), está configurado como un seguidor de voltaje y tiene la finalidad de acople de la impedancia del electrodo. Para ello tiene una alta impedancia de entrada ( $10^{12} \Omega$ ) y un ruido intrínseco muy bajo ( $4 \mu\text{V}$  pico a pico). Este "head stage" se montó sobre el micromanipulador del electrodo de registro, con lo que se reduce la distancia entre el electrodo de registro y la entrada al amplificador operacional antes citado. Al reducir esta distancia se disminuye la capacidad que tiene este electrodo para actuar como antena de ondas electromagnéticas externas.

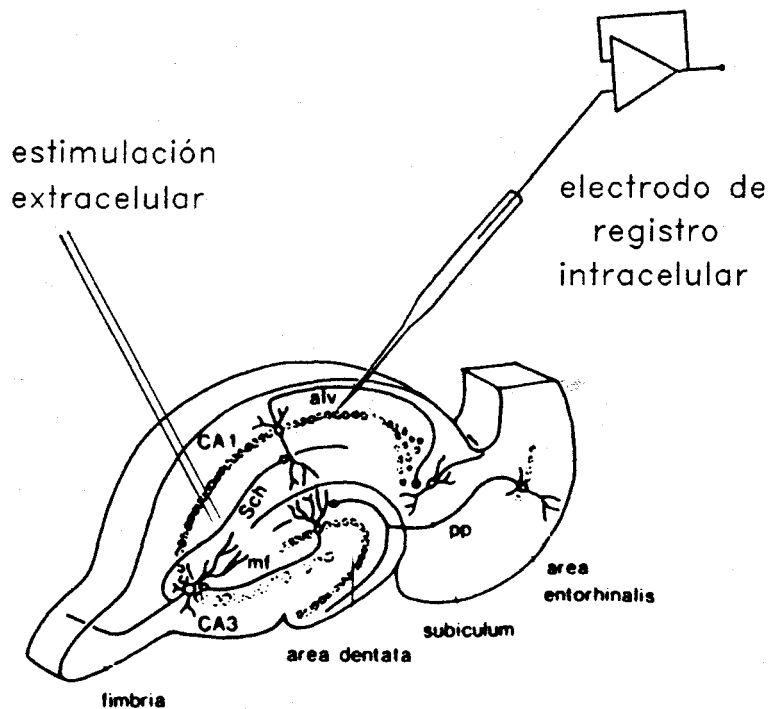
#### **4.2. Electrodo**

El electrodo de registro anteriormente citado se compone de un hilo de plata clorurada (Ag-ClAg), que se introduce en una micropipeta de vidrio. El clorurar el hilo tiene como misión reducir la resistencia eléctrica entre un medio sólido (el hilo de plata) y uno líquido (la solución que llena la micropipeta) y disminuir el potencial de unión que se establece entre el metal y la solución. La micropipeta de vidrio se hizo en un estirador de micropipetas (Narishigue, mod. PE-2, Tokio, Japón), mediante estiramiento con calor de tubos capilares de vidrio (A-M Systems, n° catálogo 6030, Everett, WA, EE.UU.). Las micropipetas se llenaron con una solución de acetato potásico a una concentración 3 M, filtrada previamente a través de un filtro Millipore de  $0,22 \mu\text{m}$ .

Los electrodos más adecuados para el registro resultaron ser aquellos con una resistencia al paso de un pulso de corriente continua de 0,2 nA, entre 55 y 65 M $\Omega$ . Para pulsos de intensidades mayores presentaron una pequeña rectificación (variación de la resistencia dependiendo de la intensidad de la corriente inyectada), en el sentido de aumentar la resistencia con pulsos negativos y disminuirla con pulsos positivos. Esta rectificación no fué considerada en nuestro estudio pues fué fundamentalmente cualitativo, pero habría que tenerla en cuenta para un correcto estudio cuantitativo.

### 4.3. Estimulación extracelular

La estimulación extracelular se realizó en los estudios de plasticidad sináptica en la corteza hipocámpica. Se realizó según se muestra en la figura 3 en el *stratum radiatum* para estimular la colateral de Schaffer (formada por un ramificación del axón de las células del área CA3), mediante un electrodo bipolar de hilo de plata de 300  $\mu\text{m}$  de diámetro, aislado con teflón excepto en la superficie distal de estimulación. Este electrodo se montó en un micromanipulador situado a la izquierda de la cámara de registro según se comentó en el apartado 2 y se cuidó de estar justamente encima de la sección sin penetrar en ella para no dañarla. La estimulación se realizó mediante un estimulador (Cibertec, mod. CS-98), a través de una unidad de aislamiento (Cibertec isolation unit mod. 100). Se utilizaron pulsos de 0,1 ms de duración e intensidad variable. El estimulador se podía disparar desde el generador de pulsos, de forma que todo el equipo electrónico estuviera sincronizado.



**Figura 3.** Diseño experimental para realizar la estimulación extracelular en el stratum radiatum donde se encuentra la colateral de Schaffer (Sch en el esquema). Abreviaturas: alv, alveus hippocampus; mf, fibras musgosas; pp, vía perforante.

#### **4.4. Proceder experimental**

Una vez colocada la sección en la cámara de registro, y el electrodo de estimulación extracelular en los experimentos en que era necesario, se situó la micropipeta en el micromanipulador de la derecha de la cámara y se sumergió la punta de la micropipeta en la solución de la cámara de registro. A continuación se procedió a compensar la resistencia y capacidad del electrodo, con lo que la respuesta en voltaje que se produce en el electrodo al inyectar un pulso de corriente desaparece (el electrodo se comporta como un circuito eléctrico con la resistencia y la capacidad en paralelo). Se situó entonces la punta de la micropipeta en la capa celular objeto de estudio y se avanzó a través de la sección, monitorizando la resistencia de la micropipeta mediante un pulso de corriente de 0,2 nA. Al avanzar en el tejido se observaban aumentos de la resistencia de la micropipeta, que se podían deber a suciedad en su punta o a estar contactando con una membrana celular. Se realizaba entonces una breve ( $\approx 10$  ms) oscilación eléctrica en el electrodo de registro con lo que se limpiaba la punta o se accedía al interior celular según los casos. El acceso al interior celular se reconocía porque el potencial monitorizado tomaba valores negativos y casi siempre se podían observar además potenciales de acción como respuesta de la membrana a la excitación producida por el trauma mecánico. Se inyectaba entonces corriente negativa continua, para que el potencial de membrana fuese de unos -70 mV, y se esperaba que la célula recuperase lentamente su potencial de membrana original. Esto solía ocurrir en unos 3 a 6 min, si no era así el proceder fué abandonar la célula y seguir avanzando en la sección, pues se constató que era difícil que una célula se recuperara si no lo conseguía en los primeros minutos. Una vez estabilizado el potencial de membrana en un valor más negativo que -60 mV, se procedía a la realización del experimento.

### **5. Adquisición y reproducción de datos**

#### **5.1. Esquema del sistema**

La señal correspondiente al potencial de membrana se almacenó en un registrador magnético (Racal, mod. Store 4, Hythe Southampton, Reino Unido), con cuatro canales. En los otros tres canales se grabaron de forma paralela al potencial de membrana, la corriente inyectada a la célula, la señal de sincronización del sistema, y la voz del experimentador con comentarios acerca de la evolución del experimento.

La señal del potencial de membrana se llevó en paralelo hacia un audiomonitor que nos indicaba la idoneidad de las oscilaciones eléctricas utilizadas para penetrar en el interior celular por el tono del sonido que producían.

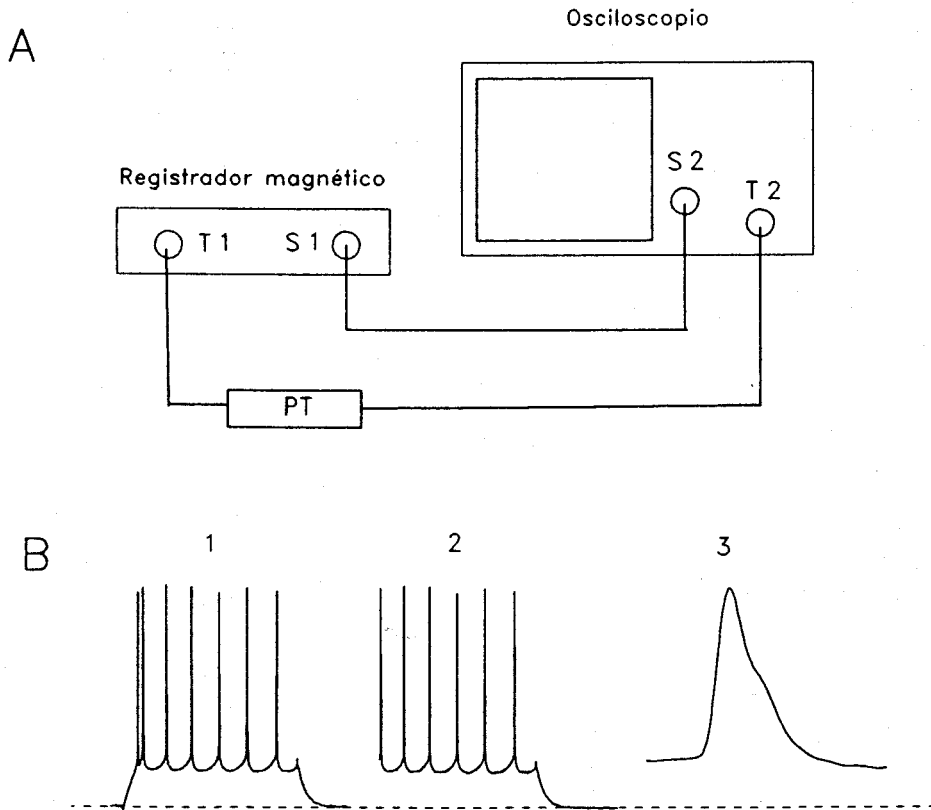
La disposición de los distintos aparatos utilizados para la adquisición de los resultados fué la siguiente (figura 1): del generador de pulsos salían dos señales, el pulso de estimulación que entraba en el amplificador de registro intracelular y la señal de sincronización del sistema que iba hacia uno de los canales de la cinta magnética y en paralelo hacia el estimulador extracelular. Del amplificador de registro intracelular salían a su vez dos señales, el potencial de membrana celular que se dirigía en paralelo hacia la cinta magnética y hacia el audiomonitor, y la corriente inyectada en la célula que se llevaba hacia uno de los canales de la cinta magnética. Desde la cinta magnética la señal de sincronización se llevó al conector de disparo de un osciloscopio (Tektronix, mod. 5111A), al que también se condujeron las señales de potencial de membrana y la corriente inyectada a la célula, con lo que se pudo monitorizar en todo momento el experimento realizado.

Una vez almacenadas las señales en la cinta magnética para la reproducción gráfica de los barridos de interés se digitalizó la información correspondiente a éstos. Para ello se utilizó un osciloscopio Tektronix 5223, que posee una tarjeta de conversión analógica-digital, y la información ya en forma digital se llevó mediante una tarjeta GPIB (National Instruments, Austin, TX, EE.UU.) a un ordenador IBM PC (AT), utilizando para ello un programa diseñado en nuestro laboratorio siguiendo las instrucciones del manual de la tarjeta (Tektronix 5223 Digitizing Oscilloscope Manual). Desde el ordenador la información se pasó a papel bien mediante un plotter (Hewlet Packard, mod. 7470A), o mediante una impresora laser (Hewlet Packard, mod. Laserjet Series II), utilizando un programa de gráficos (SigmaPlot, Jandel Scientific, Corte Madera, CA, EE.UU.).

## **5.2. "Posttrigger"**

En algunas ocasiones interesó estudiar con gran resolución temporal una parte de un registro que duraba muy poco en relación a la duración del registro del que formaba parte. Así ocurría con los potenciales de acción que duran  $\approx 2$  ms y forman parte de pulsos que duran 300 ms, que a su vez están incluidos en registros que duran 500 ms. Así en las figuras 7A y 11A se muestra la morfología de los

potenciales de acción que se generaban en los pulsos mostrados en las figuras 6B y 9B respectivamente. Para poder observar esta pequeña zona del registro con mejor resolución temporal, hay que seleccionar una base de tiempo más pequeña (50 ms para el registro de la 6B y 0,2 ms para los registros mostrados en la figura 7A), pero si se mantiene la señal de sincronización inicial, sólo se pueden tener sincronizados los primeros ms iniciales del registro, en los cuales no están los potenciales de acción.



**Figura 4.** Sistema de retraso de la señal de sincronización (posttrigger). A. Disposición del posttrigger (PT) durante el proceso de reproducción de las señales (S1) que se habían grabado en el registrador magnético con una señal de sincronización (T1). En el osciloscopio S2 indica el canal para la recepción de señales y T2 el conector de la base de tiempo para la señal de sincronización. B. Representación del mismo registro según había sido grabado (1); disparando el osciloscopio con el retraso determinado por el posttrigger pero a la misma base de tiempo (2) o con una base de tiempo mucho menor (3).

Para solucionar este problema algunos osciloscopios tienen incorporado en el diseño de su base de tiempo una opción llamada posttrigger. El posttrigger retrasa el disparo del osciloscopio el tiempo que se le indique a partir del instante en que le llega a la base de tiempo la señal de sincronización, que es la que "dispara" (trigger)

el haz horizontal de rayos catódicos del osciloscopio. De esta forma podemos hacer coincidir el disparo del osciloscopio con el inicio de la zona que nos interesa del registro y utilizar entonces la base de tiempo que más nos interese. El osciloscopio Tektronix 5223 que se usó para digitalizar la señal no posee esta opción por lo que se diseñó un "posttrigger" en el laboratorio. Este posttrigger consta fundamentalmente de un multivibrador monoestable SN74121 (Texas Instruments), en el que se conectó un condensador de 70  $\mu\text{F}$  entre las patillas 10 y 11 y una resistencia variable de 10  $\text{K}\Omega$  entre las patillas 11 y 14. La señal de sincronización grabada en la cinta magnética se hizo llegar a la patilla 5 y la patilla 1 fué la etapa de salida del aparato. Las patillas 3,4 y 7 se conectaron a la tierra del sistema. Con este diseño el retraso que se obtenía de la señal de sincronización podía variar entre 0 y 500 ms.

El esquema de la forma de trabajo se muestra en la figura 4A. La señal de sincronización (T1) llega al posttrigger (PT), donde sufre el retraso que se elija mediante un potenciómetro (que actúa como resistencia variable) y a continuación llega al conector de disparo del osciloscopio (T2). De forma paralela, la señal que nos interesa (S1) y que está grabada en otro canal del registrador magnético está llegando al conector adecuado del osciloscopio (S2). Un ejemplo del uso de este posttrigger se muestra en la figura 4B: en B1 se puede observar la respuesta de una célula ante un pulso de corriente transmembranaria de 300 ms, tal como se había grabado durante el experimento (con la base de tiempo del osciloscopio en 50 ms por división), en B2 se presenta el mismo registro pero eligiendo como instante de disparo del osciloscopio, algunos ms antes de la generación del 2º potencial de acción, de forma que si se elige ahora una base de tiempo de 0,2 ms por división se obtiene la morfología detallada del 2º potencial de acción (B3), en la que se observa una clara inflexión en la fase de repolarización del potencial de acción.

## **6. Preparación de las secciones para el análisis bioquímico**

La obtención de las secciones de hipocampo se realizó como se indicó en el apartado 1. La solución empleada fué la llamada 0  $\text{PO}_4$  en la tabla 1, que se diferenciaba de la estándar utilizada en los experimentos de electrofisiología en que no tenía  $\text{PO}_4\text{NaH}_2$ . Tras el corte las secciones estuvieron incubándose en viales independientes durante 1 h. Tras este período de recuperación se cambió la solución externa por otra de la misma composición iónica excepto que contenía  $^{32}\text{PO}_4$  (New England Nuclear, Viena, Austria) con una actividad de 0,2  $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ . Se mantuvieron

las secciones en esta solución con  $^{32}\text{PO}_4$  durante 90 min para permitir que el  $^{32}\text{PO}_4$  pasara al interior celular. Cuando se utilizó algún bloqueante, se añadió al final de este período durante el tiempo indicado en el apartado "Resultados" para cada uno de ellos. Seguidamente se realizaron los experimentos; cambiando la solución externa por otras con la sustancia objeto de estudio. La incubación en  $^{32}\text{PO}_4$  y todo el proceso posterior se realizó estando las soluciones permanentemente burbujeadas con carbógeno y a una temperatura de 33 °C, para lo cuál los experimentos se realizaron con los viales sumergidos en agua hasta la mitad de su altura en un baño de calentamiento (Salvis). Una vez terminado el experimento se trasladó la sección a un eppendorf que contenía 300  $\mu\text{l}$  de solución de parada (50 mM MES ph 6,4; EGTA 5 mM;  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  0,25 mM; FNa 50 mM; ortovanadato de sodio 1 mM; B-glicerofosfato, 100 mM; ATP 2 mM; PMSF, 1 mM; leupeptina 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; aprotinina 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) a 0 °C. Inmediatamente se congelaron a -20 °C hasta que se continuó con su procesamiento.

A continuación las secciones se homogeneizaron en la solución de parada, utilizando un homogenizador (Potter) con vástago de teflón. Los homogenados obtenidos se centrifugaron a  $10^5 \times g$ , durante 1 h a 2 °C. El sobrenadante constituyó la fracción soluble celular. Con el sedimento se realizó una suspensión en una solución que contenía Tris-ClH, pH 7,5, 50 mM; EGTA, 5 mM;  $\text{Cl}_2\text{Mg}$ , 1 mM; FNa, 50 mM; ortovanadato de sodio, 1 mM;  $\beta$ -glicerofosfato, 100 mM; ATP, 2 mM; PMSF, 1 mM; aprotinina, 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y Tritón-X-100, 2,5 % (p/v). El Tritón-X-100 es un detergente que emulsiona los lípidos de las membranas celulares, dejando libres las proteínas incluidas en ella. Esta suspensión se homogeneizó y se incubó durante 30 min a 0 °C. La solución fué entonces centrifugada a  $10^5 \times g$  durante 30 min a 0 °C. El sobrenadante que se obtuvo incluía las proteínas solubilizadas mediante Tritón.

## **7. Identificación de las proteínas**

### **7.1. Electroforesis**

La separación de las proteínas presentes en la fracción soluble celular y en la fracción solubilizada mediante Tritón, se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, en presencia de dodecilsulfato de sodio, según el método de Laemmli (1970). Se utilizaron geles de acrilamida al 4,5 % en el gel de concentración y al 6,5

% en el gel de separación. Los geles se tiñeron con Azul de Coomassie según el método de Fairbanks, Stech y Wallach (1981). Como marcadores de peso molecular se utilizaron los de Sigma y proteína microtubular de cerebro de rata (que contiene MAP1, MAP2,  $\alpha$  y  $\beta$ -tubulina), obtenida mediante el método de Karr, White y Purich (1979).

Las proteínas marcadas radiactivamente se detectaron mediante autorradiografía de los geles secos, en una película Kodak-X-Omat. Para cuantificar la radiactividad asociada a las bandas, se cortaron éstas del gel seco y se midió su radiactividad en un contador de centelleo líquido. En otras ocasiones se obtuvo una medida indirecta de esta radiactividad realizando una densitometría óptica de las autorradiografías.

## **7.2. Identificación mediante anticuerpos**

En los experimentos realizados con N-metil-D-aspartato (NMDA), se comprobó que no se había producido proteólisis de la MAP2, midiéndose la cantidad de MAP2 existente en las secciones control y en las tratadas con NMDA. Para ello, una vez obtenidos los homogenados de las secciones en la solución de parada, se cogieron alícuotas conteniendo la misma cantidad de proteína (100  $\mu$ g). A continuación se sometieron las muestras a electroforesis en gel de poliacrilamida según se ha indicado en el apartado anterior. Se transfirieron entonces las proteínas a papel de nitrocelulosa según el método de Towbin, Staehelin y Gurdon (1979). A continuación se saturó el papel de nitrocelulosa con tampón fosfato salino (PBS) que contenía Tween-20 al 0,05 % (p/v) y albúmina sérica bovina al 1 % (p/v), incubándose posteriormente el papel con un anticuerpo policlonal de conejo contra MAP2, durante 12 h a 4 °C, tras lo cual se lavó el papel de nitrocelulosa con PBS que contenía Tween-20 al 0,05 %. Después de esta incubación con el primer antígeno se incubó el papel durante 2 h a temperatura ambiente con anticuerpos contra inmunoglobulinas G de conejo, conjugados con peroxidasa (Tago, Burlingame, EE.UU.). Finalmente se lavó el papel de nitrocelulosa con PBS (que contenía Tween-20 al 0,05 %) y la reacción de la peroxidasa se desarrolló en Tris-Cl 0,1 M (pH = 7,5) con peróxido de hidrógeno y  $\alpha$ -cloro-naftol.



## 8. Mapas peptídicos

Se realizó el mapa peptídico de la MAP2, mediante proteólisis limitada con la proteasa V8 de *S. aureus* según el método de Cleveland, Fisher, Kirschner y Laemmli (1977), con una relación proteasa-proteína del 1 % y un tiempo de parada de la electroforesis para la digestión enzimática de 30 min.

## 9. Purificación de proteínas y fosforilación posterior

Todas las proteínas purificadas se obtuvieron de cerebro de rata. La MAP2 fué purificada mediante tratamiento con calor según el procedimiento de Weingarten, Lockwood, Hwo y Kirschner (1975). Esta proteína se utilizó para preparar anticuerpos en conejo, según el método descrito por Montejó de Garcini, Díez y Avila (1986). La proteína kinasa C (PKC) se purificó según el método de Walsh, Valentine, Ngai, Carruthers y Hollenberg (1984). La proteína kinasa tipo II dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y calmodulina (CMKII) fué purificada según el método de Kelly, Shields, Conway, Yip y Burgin (1987). La calmodulina se purificó de acuerdo con el método de Dedman, Potter, Jackson, Johnson y Means (1977).

La fosforilación de la MAP2 por PKC purificada se realizó en una solución que contenía MES, 0,1 M (pH = 6,8);  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ , 2 mM; fosfatidil serina, 80  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; 12-miristato 13-acetato forbol, 0,15  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; PMSF, 1 mM y ATP ( $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ), 50  $\mu\text{M}$ . La fosforilación de MAP2 por CMKII se llevó a cabo en una solución que contenía MES 0,1 M (pH=6,8); calmodulina 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ;  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  5 mM;  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ , 2 mM; PMSF 1 mM y ATP ( $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ), 50  $\mu\text{M}$ . Ambas reacciones se llevaron a cabo a 35 °C durante 20 min y se detuvieron mediante la adición de tampón de muestra (Tris-ClH 248 mM, pH 6,8, SDS 5 % (P/V), glicerol 50 % (V/V), 2-mercaptoetanol 10 % (V/V) y azul de Bromofenol 0,01 % (P/V)) hirviendo.

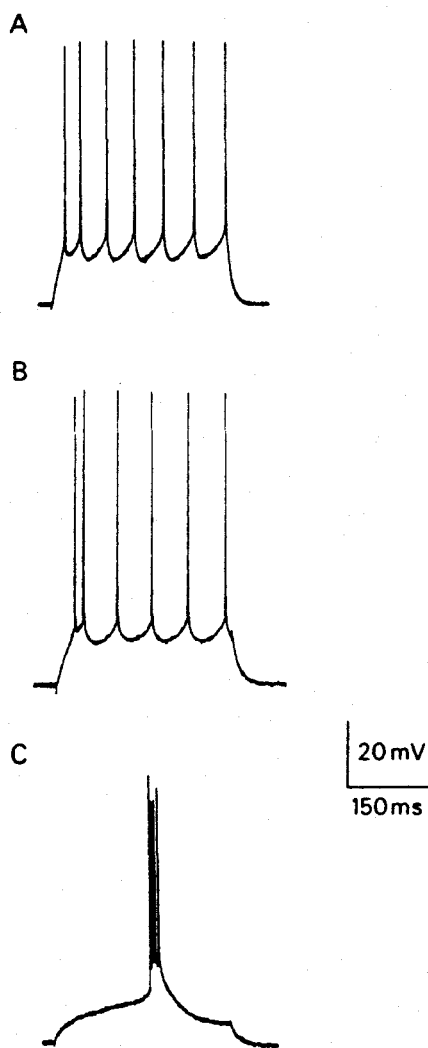
## **RESULTADOS**

### **A) PROPIEDADES ELECTROFISIOLÓGICAS Y ADAPTACION EN EL DISPARO REPETITIVO DE NEURONAS DEL CORTEX VISUAL**

El presente estudio sobre la electrofisiología de las neuronas de la corteza visual del cobaya se basa en el registro del potencial de membrana en 125 células. De éstas, 98 se consideraron útiles para el análisis cuantitativo atendiendo a los siguientes criterios: i) rápida recuperación del potencial de reposo tras el trauma causado por el acceso de la micropipeta al interior celular, ii) estabilidad de las propiedades electrofisiológicas pasivas de la membrana durante el período de registro, y iii) amplitud de los potenciales de acción superior a 70 mV (medida desde el potencial de reposo). El 91,5 % de los registros se realizaron en la capa II-III de la corteza, obteniéndose el 8,5 % restante en otras capas corticales.

#### **1. Tipos celulares según el patrón de disparo**

En el conjunto de células estudiadas se diferenciaron tres tipos según el patrón de disparo de potenciales de acción (PDA) generados en respuesta a la inyección transmembranaria de pulsos rectangulares de corriente:



**Figura 5.** Diversidad de respuestas electrofisiológicas encontradas en el cortex visual del cobaya con la inyección de pulsos cuadrados de corriente. A. Célula tónica con una disminución gradual de la frecuencia de disparo. Pulso de 0,45 nA. B. Célula de agrupamiento inicial, en que la disminución de la frecuencia de disparo se alcanza tras el 2º potencial de acción. Pulso de 0,35 nA. C. Célula con disparo agrupado, cuya respuesta es un brote de espigas. Pulso de 0,27 nA.

- células tónicas (CT, 53 % del total), en las que la frecuencia de aparición de los PDA durante un pulso es regular, disminuyendo progresivamente durante el pulso (figura 5A). En el contexto del presente trabajo esta disminución en la frecuencia de los PDA durante un pulso de corriente se denomina adaptación.

- células con agrupamiento inicial (CAI, 45 % del total), que tienen una respuesta tónica con pulsos de pequeña amplitud, pero al aumentar la amplitud de estimulación la frecuencia de los potenciales de acción disminuye bruscamente tras el 2º o 3º PDA, para ser luego muy constante (figura 5B).

- células con disparo agrupado (CDA, 2 % del total), cuya respuesta nunca es tónica, estando siempre los PDA agrupados en brotes (figura 5C).

Los dos primeros tipos celulares (CT y CAI) fueron los predominantes (98 % del total) por lo que nuestro estudio en la corteza visual se centró en la diferenciación entre ambos, ya que hasta el momento han sido incluidos en la literatura en un mismo grupo denominado "neuronas de disparo regular" (McCormick et al., 1985; Connors y Gutnick, 1990).

La distribución topográfica de las células registradas en las diferentes capas del cortex visual se muestra en la tabla 2, en la que se puede apreciar que la proporción entre CT y CAI se mantiene prácticamente constante en la capa II-III (que fué donde se realizaron la mayoría de los registros), en las tres zonas que se han esquematizado en la sección "Material y Métodos" (apartado 1), dependiendo de la distancia a la que se encontraba la sección del polo occipital del encéfalo.

**Tabla 2.** Distribución topográfica de las células

Tipos	Zonas	Capas				
		I	II-III	IV	V	VI
Tónicas (CT)	1-2 mm		9	2	1	1
	2-3 mm	1	15	5		
	3-4 mm		9	3		3
Con Agrupamiento Inicial (CAI)	1-2 mm		10	1		
	2-3 mm		16	2		
	3-4 mm		12	6		
Con Disparo Agrupado (CDA)	1-2 mm					1
	2-3 mm		1			
	3-4 mm					

Además de la distribución de los tipos de respuesta según la localización de la célula en el cortex se analizó la distribución de los dos tipos celulares (CT y CAI) según el peso del animal. Este parámetro es una medida indirecta de la edad y por

tanto de la maduración de los animales, lo que permitió establecer una relación entre los tipos celulares y el grado de desarrollo. Un esquema de esta distribución se muestra en la tabla 3, la cual está construida a partir de 87 células obtenidas en experimentos en los que se anotó el peso del animal. La relación CAI/CT es de 1 para el conjunto de todas las células, sin embargo, esta relación cambia en los dos grupos comprendidos entre 200 y 300 gr. Es de 0,5 en el grupo de 200 a 250 gr y aumenta a 1,7 en el grupo de 250 a 300 gr. Estos dos grupos de animales fueron los más utilizados y los datos obtenidos podrían reflejar los cambios funcionales y bioquímicos que ocurren durante la maduración del cortex visual (Robertson, Hanes, y Yu, 1988; Gordon, Daw y Parkinson, 1991).

**Tabla 3.** Distribución de células tónicas y células de agrupamiento inicial según el peso del animal

Peso del animal (gr)	Número de Células	
	C.T.	C.A.I.
0 < peso < 50	0	0
50 < " < 100	1	1
100 < " < 150	2	1
150 < " < 200	4	3
200 < " < 250	10	5
250 < " < 300	10	17
300 < " < 350	5	5
350 < " < 400	4	3
400 < " < 450	3	2
450 < " < 500	0	0
500 < " < 550	4	7
Total de células	43	44

### 1.1. Células tónicas

Tal como se ha definido este grupo, es decir, células en las que la frecuencia de aparición de PDA durante un pulso de corriente disminuye de forma progresiva, estaría incluido en el tipo de "neuronas de tipo regular" según la clasificación de Connors y Gutnick (1990), en la que la característica de este grupo sería que se adaptan durante un pulso de corriente intracelular. Las características electrofisiológicas de las células tónicas (CT) se presentan en la tabla 4. La resistencia de entrada ( $RE = \text{incremento } V / \text{incremento } I$ ), se obtuvo inyectando a las células al potencial de membrana de reposo pulsos hiperpolarizantes de  $-0,2 \text{ nA}$ . La constante de tiempo de la membrana ( $\tau$ ), se calculó como el tiempo que tardó el salto de potencial de membrana en alcanzar el 63% de su amplitud final durante un pulso de  $-0,2 \text{ nA}$  y  $100 \text{ ms}$ . La capacidad de la membrana fué calculada a partir de la fórmula  $C = \tau / RE$ . La duración del potencial de acción fué medida en el punto medio entre el umbral y el máximo. Todos los valores que hacen referencia al PDA, fueron medidos en el primer PDA que se originó en un pulso de  $300 \text{ ms}$  de duración.

La respuesta de las células tónicas a pulsos rectangulares de corriente, se muestra en la figura 6. Incluso con pulsos de poca intensidad (A) la frecuencia de

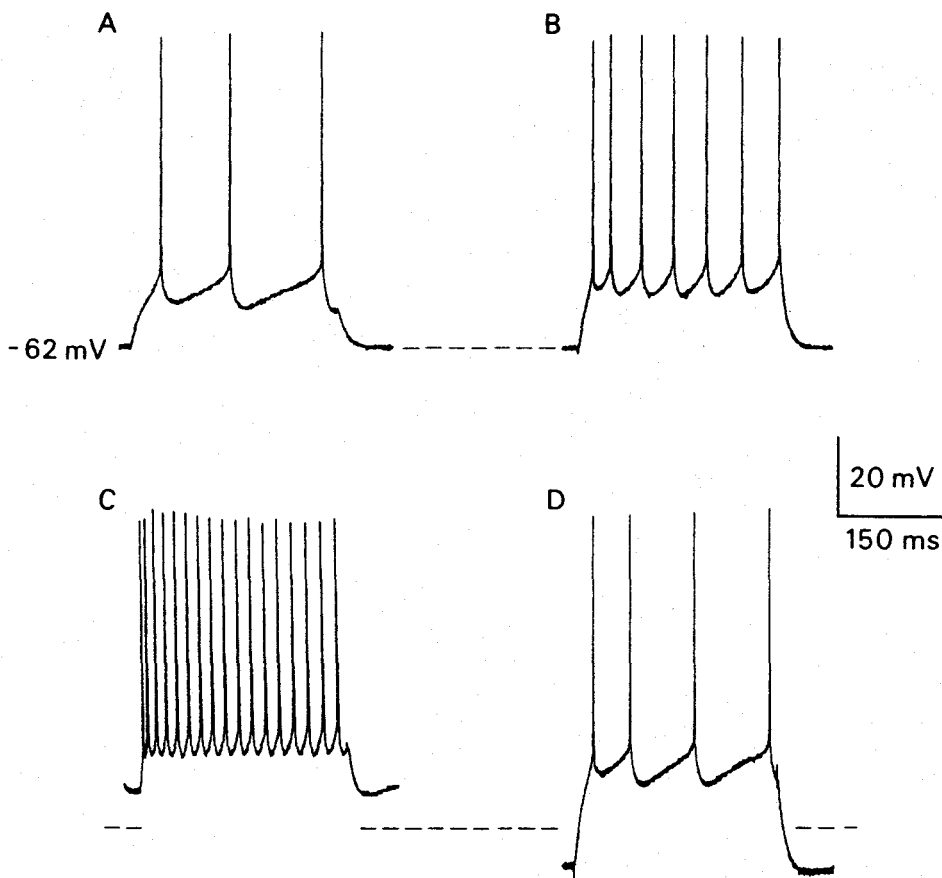
**Tabla 4.** Características electrofisiológicas de las células tónicas (CT)

	membrana celular				potencial de acción				
	PDM (mV)	RE (M $\Omega$ )	$\tau$ (ms)	C (pF)	umb. (mV)	ampl. (mV)	dur. (ms)	dV/dt <sub>s</sub> (V/s)	dV/dt <sub>b</sub> (V/s)
x	67.5	36.7	8.3	255.5	30.3	89.3	0.73	148.4	85.1
DE	$\pm 4.9$	$\pm 10.6$	$\pm 2.3$	$\pm 129.5$	$\pm 5.4$	$\pm 6.6$	$\pm 0.1$	$\pm 21.8$	$\pm 18.7$

**Abreviaturas:** PDM, potencial de membrana en reposo; RE, resistencia de entrada;  $\tau$ , constante de tiempo de carga de la membrana; C, capacidad total de la membrana; umb., umbral del PDA, medido desde PDM; ampl., amplitud medida desde PDM; dur., duración; dV/dt<sub>s</sub>, primera derivada de la fase de subida del PDA; dV/dt<sub>b</sub>, idem de la fase de bajada; x, media; DE, desviación estándar (n=35).

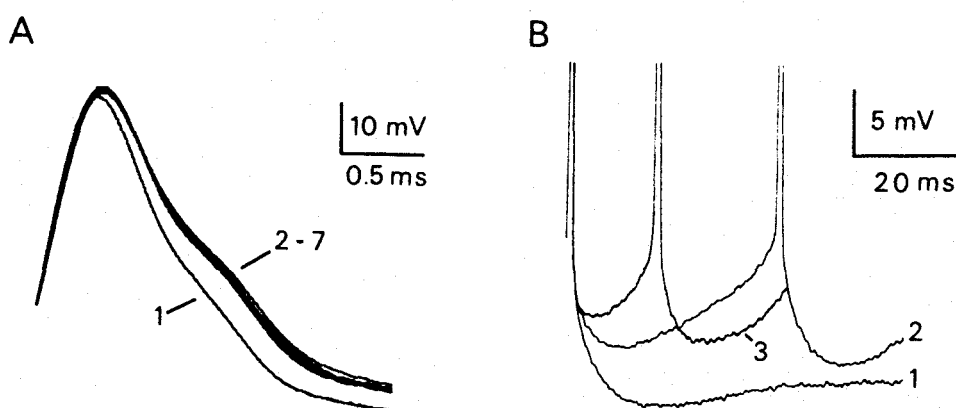
aparición de PDA disminuye a lo largo del pulso, fenómeno que se aprecia de forma más clara al aumentar la intensidad del pulso (B). Si se despolariza la célula 10 mV (C), (a este nivel la célula presenta disparo continuo, por lo que el pulso parte de la PHP de la espiga previa), la respuesta sigue siendo tónica con adaptación. Hiperpolarizando el potencial de membrana (PDM) 10 mV (D), tampoco se modificó el patrón de disparo por lo que no parece que la hiperpolarización deinactive ninguna conductancia que promueva la adaptación.

La variación de la morfología de los PDA durante un pulso es una de las características que fundamentan la distinción entre CT y CAI. En la figura 7A se



**Figura 6.** Características del patrón de disparo típico de una célula tónica. A y B. Respuestas a pulsos de 0,3 nA (A) y 0,45 nA (B). En C, a una corriente continua de 0,3 nA, se ha añadido un pulso de 0,8 nA. D. Pulso de 0,8 nA añadido a una corriente continua de -0,4 nA. La línea discontinua indica el potencial de reposo.

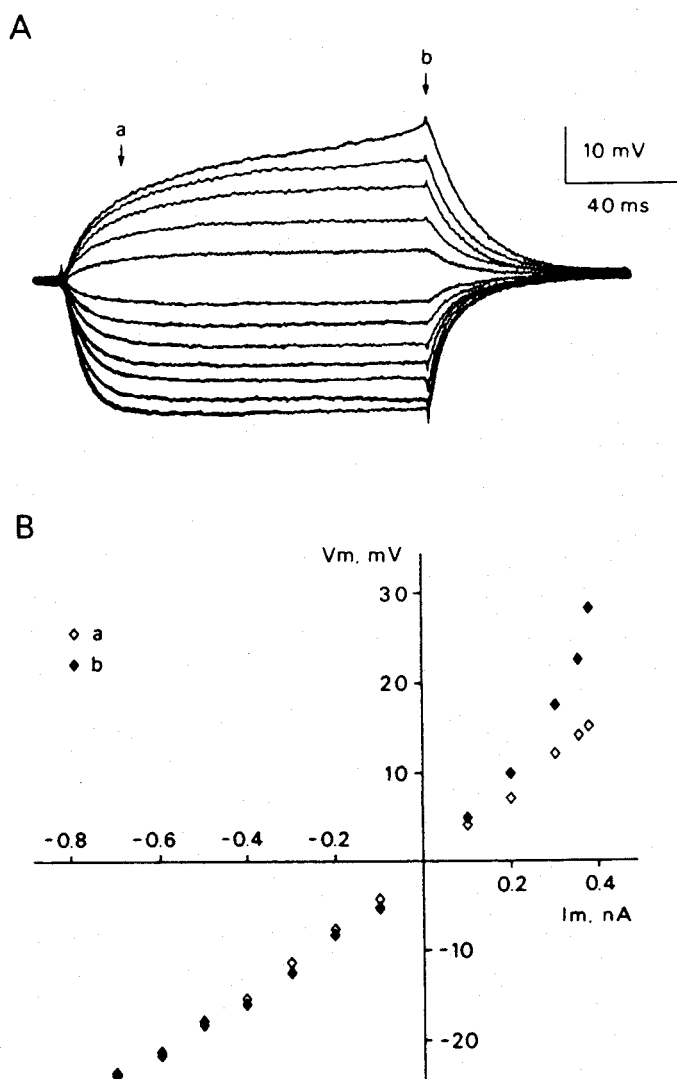
muestra esta variación en la morfología de los PDA en las células tónicas. Se observa que la duración de los PDA se hace progresivamente mayor, lo que distingue este grupo de las CAI, en las que como se mostrará más adelante (figura 11) el PDA más duradero es el 2°. También se advierte una clara diferencia entre la duración del primer PDA y el resto. Otro detalle de la morfología de los PDA que diferencia las CT es la posthiperpolarización (PHP) del primer PDA, que es siempre cóncava hacia arriba, a diferencia de lo que ocurre con las CAI, en las que cuando se produce el agrupamiento, la morfología del postpotencial pierde su concavidad y se vuelve convexa en su inicio (figura 11).



**Figura 7.** Morfología de la subida y bajada de los potenciales de acción y de los postpotenciales del primer potencial de acción en una célula tónica. En A se muestran superpuestos los potenciales de acción de la figura 6B. B. Postpotenciales del primer potencial de acción en tres pulsos distintos, con amplitudes de 0,26, 0,35 y 0,45 nA para los barridos 1, 2 y 3 respectivamente. Nótese que la posthiperpolarización se hace progresivamente menor según aumenta la intensidad del estímulo. Los potenciales de acción han sido truncados.

Los potenciales subumbrales de las CT en respuesta a pulsos de corriente rectangulares de amplitud creciente se muestran en la figura 8A. En la figura 8B, se ha construido con estas respuestas la curva corriente-voltaje (curva I-V), para los dos tiempos señalados en A. Los rombos vacíos representan la curva I-V a los 20 ms del inicio del pulso (a). Para valores más hiperpolarizados que -15 mV, se observa una leve inflexión hacia arriba. Para valores más despolarizados que 10 mV, también existe una pequeña desviación hacia arriba, aunque el comportamiento es prácticamente lineal. Los rombos llenos (b), representan la curva I-V al final del pulso (123 ms), en ella la inflexión que ocurre en el sentido hiperpolarizante es de un





**Figura 8.** Potenciales subumbrales de una célula tónica ante pulsos rectangulares de corriente. A. Cambios en el potencial de membrana originados por pulsos despolarizantes de 0,1, 0,2, 0,3, 0,35 y 0,38 nA e hiperpolarizantes de -0,1 a -0,7 nA. B. Curva corriente-voltaje en los tiempos "a" (20 ms) y "b" (123 ms), para los pulsos mostrados en A.

**Tabla 5.** Características electrofisiológicas de las células con agrupamiento inicial (CAI)

	membrana celular				potencial de acción				
	PDM (mV)	RE (M $\Omega$ )	$\tau$ (ms)	C (pF)	umb. (mV)	ampl. (mV)	dur. (ms)	dV/dt <sub>r</sub> (V/s)	dV/dt <sub>b</sub> (V/s)
x	71.2	35.4	8.6	256.6	27.5	93.6	0.7	169.7	103
DE	$\pm 4.7$	$\pm 9.7$	$\pm 2$	$\pm 80.3$	$\pm 4.2$	$\pm 6.3$	$\pm 0.16$	$\pm 18.1$	$\pm 22.9$

**Abreviaturas:** tienen el mismo significado que en la tabla 4.(n=34).

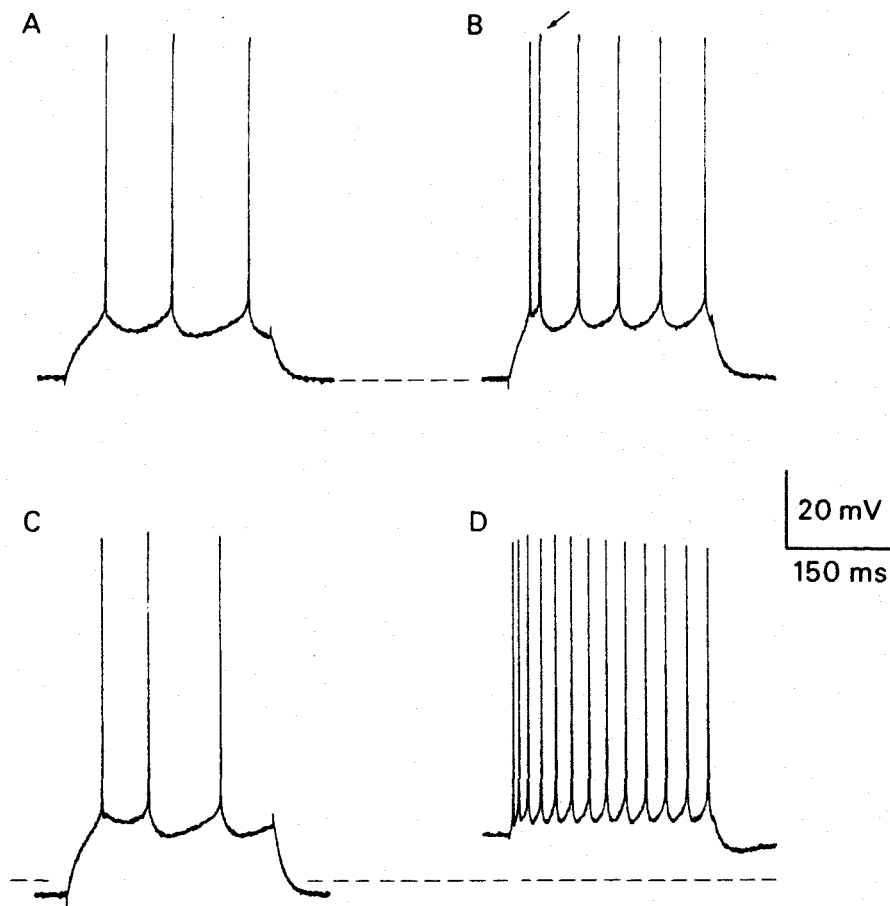
valor muy aproximado a lo que sucedía a los 20 ms. En el sentido despolarizante, en cambio, la inflexión se hace mucho más acusada.

## 1.2. Células con Agrupamiento Inicial

Como se indicó anteriormente, estas células pertenecen al grupo de neuronas de disparo regular (Connors y Gutnick, 1990), y también se adaptan marcadamente durante un pulso de corriente intracelular. Sin embargo, a diferencia de las CT, la adaptación en las CAI es casi completa en el 3<sup>er</sup> potencial de acción (compárense las respuestas en la figura 5A y B). Los parámetros electrofisiológicos de las CAI se presentan en la tabla 5. La respuesta de una célula CAI a pulsos de corriente transmembranaria se muestra en la figura 9. Con pulsos de poca intensidad, la respuesta es similar a la obtenida en una CT (figura 9A), pero cuando se aumenta la intensidad de estimulación el 2<sup>o</sup> PDA se genera próximo al 1<sup>o</sup> (figura 9B, flecha), con una gran posthiperpolarización tras este 2<sup>o</sup> PDA, con lo que en el 2<sup>o</sup> intervalo entre espigas se consigue la adaptación que ocurre en el pulso. Al hiperpolarizar la célula (figura 9C), su respuesta no muestra mayor adaptación, lo que sugiere que al potencial de reposo todas las conductancias que intervienen en el patrón de disparo están suficientemente deinactivadas. Al despolarizar la célula (figura 9D), sí se

obtiene una respuesta mucho más tónica que al potencial de reposo, lo que indica que a este PDM, no es posible activar la conductancia responsable del agrupamiento inicial de PDA.

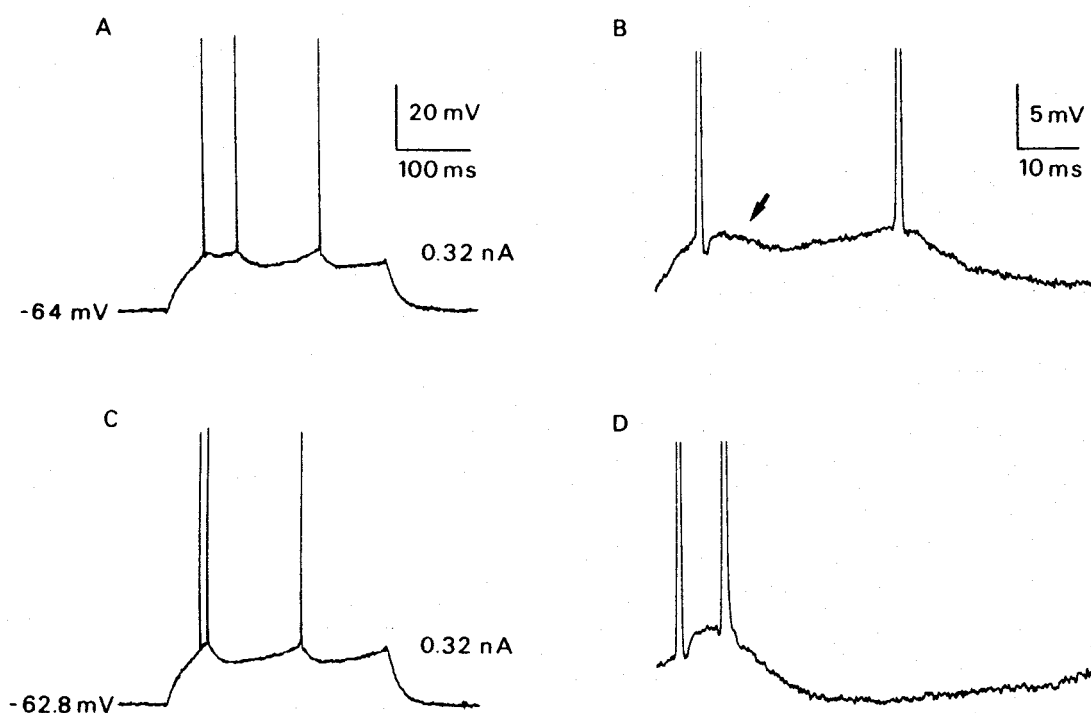
La formación del agrupamiento inicial de dos PDA al comienzo del pulso se ilustra en la figura 10 donde se observa que una leve despolarización del potencial de membrana, facilita el agrupamiento de las dos primeras espigas. En D se observa que el 2º PDA se genera sobre un postpotencial despolarizante (postdespolarización), que ya existía en B (flecha), pero que en D es más acentuado.



**Figura 9.** Patrón de disparo de una célula de agrupamiento inicial con pulsos despolarizantes de diferente amplitud y desde distintos potenciales de membrana. En A, desde el potencial de reposo (-72 mV), un pulso de 0,27 nA origina una respuesta tónica. En B, con un pulso de 0,35 nA, la respuesta muestra la agrupación típica al comienzo del pulso (flecha). En C, al pulso de 0,35 nA se le añadió una corriente continua de -0,1 nA, lo que hiperpolarizó la célula 4 mV. En D, al pulso de 0,35 nA se le añadió una corriente continua de 0,2 nA, lo que despolarizó la célula 12 mV.



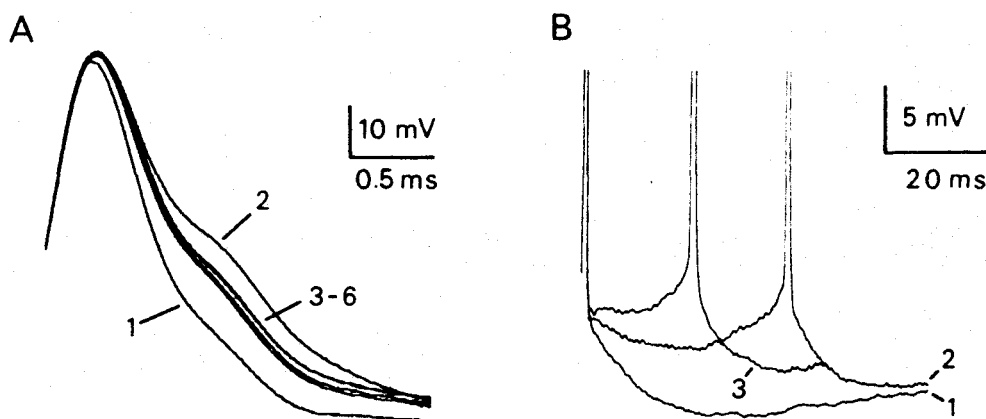
El estudio de la morfología de los PDA en las células CAI, similar al que se mostró anteriormente para las CT (figura 7), permite encontrar características típicas diferentes entre los dos tipos celulares. Una vez que se han agrupado los dos primeros PDA en la respuesta al pulso de corriente intracelular en las células CAI, el 2º PDA es el más ancho de todo el pulso (figura 11A). A partir de la 3ª espiga de nuevo vuelven a aumentar de duración progresivamente, pero sin llegar nunca a la del 2º PDA. Cuando este agrupamiento inicial está formado por tres espigas es el tercer PDA el más ancho. En la figura 11B se muestra la evolución del postpotencial del primer PDA, al ir aumentando la intensidad del pulso. A diferencia de lo que



**Figura 10.** Efecto de una pequeña despolarización en el patrón de disparo de una célula de agrupamiento inicial. A y C son respectivamente los mismos registros que B y D, a una base de tiempo mayor y con una amplificación de la señal menor. En C y D la célula se despolarizó 1,2 mV. En B y D los potenciales de acción están truncados.

ocurre con las CT (figura 7B), en las CAI la morfología no es siempre cóncava hacia arriba, sino que debido a la activación de una postdespolarización como la mostrada en la figura 10, cambia a convexa (figura 11B), provocando que el siguiente PDA se genere mucho antes de lo que lo hace en una CT.

La respuesta subumbral de las CAI, es parecida a la de las CT. La figura 12A ilustra los cambios de potencial en respuesta a pulsos positivos y negativos de corriente. En la figura 12B se observa que con pulsos hiperpolarizantes, la pendiente de la curva I-V sufre una inflexión cuando los pulsos hiperpolarizan la célula más de -11 mV. En el sentido despolarizante se observa una clara diferencia para los tiempos "a" y "b": mientras que la relación I-V permanece casi lineal a los 20 ms del inicio del pulso (a), a los 120 ms existe una clara inflexión hacia arriba (b).

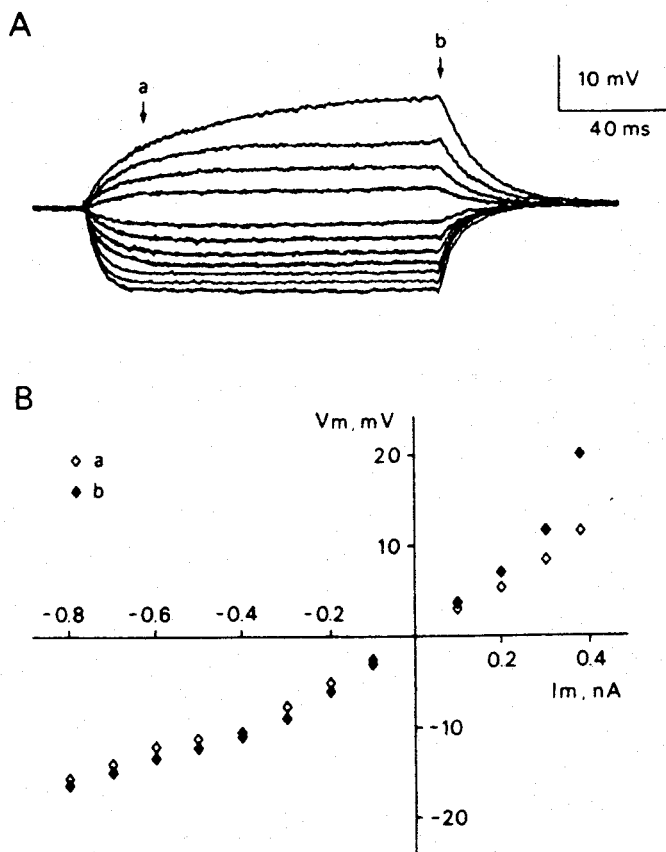


**Figura 11.** Morfología de los potenciales de acción en una célula de agrupamiento inicial. En A se superponen los potenciales de acción que se originan en la figura 6B. En B se superpone el inicio de las respuestas obtenidas en la misma célula, ante pulsos de 0,22, 0,29 y 0,31 nA (trazos 1, 2 y 3 respectivamente). Los potenciales de acción están truncados.

## 2. Estudio farmacológico de los cambios de potencial en respuesta a pulsos de corriente

Si bien la generación de los potenciales de acción en una neurona depende de la existencia de conductancias dependientes de voltaje para el  $\text{Na}^+$  y el  $\text{K}^+$  (Hodgkin y Huxley, 1952), la frecuencia de aparición de estos potenciales depende de otras conductancias que pueden generarse de forma independiente al potencial de acción, como es la conductancia para el  $\text{Ca}^{2+}$  de bajo umbral (Llinás y Yarom, 1981; Carbone y Lux, 1984), o como consecuencia de la activación de los potenciales de acción, como es la conductancia para el  $\text{Ca}^{2+}$  de alto umbral (Llinás y Sugimori, 1980b). La entrada de calcio activa a su vez otras conductancias, como es la de  $\text{K}^+$  dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{K}_{\text{Ca}}$ ) (Meech, 1978; Hotson y Prince, 1980). La mayor o

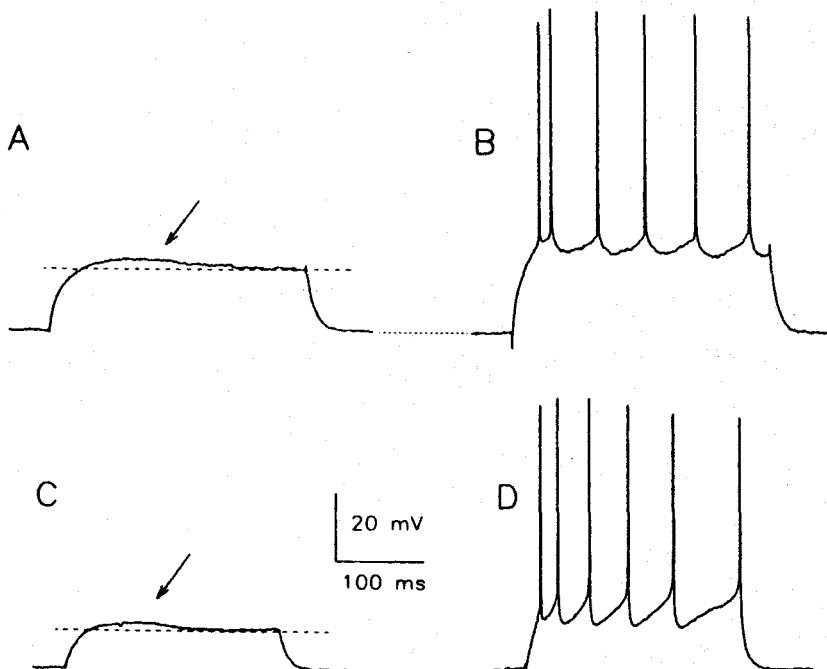
menor entrada de calcio al interior celular dependerá también de la duración del potencial de acción, duración que depende de conductancias de  $K_{Ca}$  y otras conductancias dependientes de voltaje (Hodgkin y Huxley, 1952; Adrian, Chandler y Hodgkin, 1970). La participación de la conductancia para un ión en la respuesta que se obtiene al inyectar un pulso de corriente transmembranario, se puede analizar cambiando la concentración externa de ese ión o aplicando un fármaco que bloquee de forma selectiva esa conductancia. Estos son los dos protocolos seguidos en los experimentos que se muestran en este apartado en el que se analiza la participación de diferentes conductancias en el patrón de disparo de las CT y CAI.



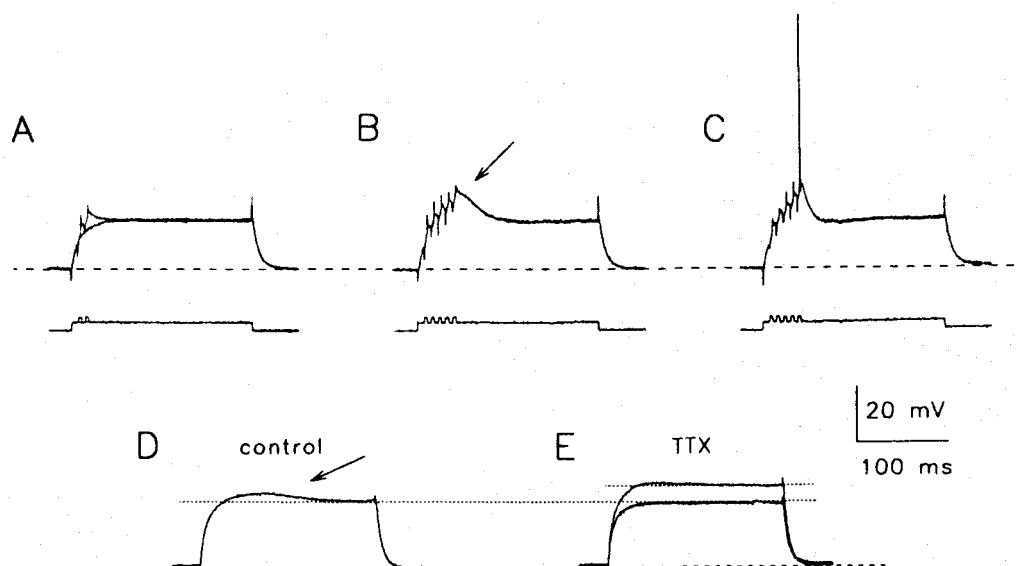
**Figura 12.** Relación corriente-voltaje en una célula de agrupamiento inicial. El potencial de reposo fué de  $-65$  mV. En A se presentan los cambios en el potencial de membrana, originados por pulsos despolarizantes de 0,1, 0,2, 0,3 y 0,39 nA e hiperpolarizantes de  $-0,1$  a  $-0,8$  nA. En B, se ha construido la curva corriente-voltaje, con los valores obtenidos en los registros mostrados en A, para los instantes "a" (20 ms del inicio del pulso) y "b" (120 ms del inicio del pulso).

## 2.1. Respuesta subumbral

Tanto en las CT como en las CAI la aplicación de pulsos positivos de corriente dió lugar a la aparición de una onda despolarizante inicial subumbral (figura 13). Este onda inicial no fué siempre mayor en las CAI por lo que no parece que determine la diferencia en el patrón de disparo entre CT y CAI. Se han estudiado no obstante, las bases iónicas de su formación, pues se podría deber a la activación de una conductancia hiperpolarizante en la segunda mitad del pulso, o a la activación al inicio del pulso de conductancias despolarizantes para el  $\text{Na}^+$  o el  $\text{Ca}^{2+}$  con un umbral menor que el de generación del potencial de acción.



**Figura 13.** Activación de conductancias subumbrales en células de agrupamiento inicial y células tónicas. A. La activación de una conductancia subumbral (flecha) origina una onda despolarizante al inicio del pulso (el área que se encuentra por encima de la línea de trazo discontinuo), en una célula de agrupamiento inicial con un pulso de 0,5 nA. B. Patrón de disparo de la misma célula con un pulso de 0,64 nA. C. Activación de una onda despolarizante subumbral (flecha) en una célula tónica con un pulso de 0,4 nA. D. Patrón de disparo de la célula mostrada en C con un pulso de 0,78 nA. La línea de puntos entre los trazos representa el potencial de reposo de las células que fué de -72 mV en A y B y de -60 mV para la célula presentada en C y D.



**Figura 14.** Activación de conductancias subumbrales en células de agrupamiento inicial y bloqueo de las mismas mediante TTX. En A se superpusieron dos pulsos de 0,2 nA y 5 ms a otro pulso de 0,3 nA y 300 ms. B. Con 5 pulsos de 0,2 nA superpuestos al de 0,3 nA se consigue activar la onda despolarizante inicial (flecha) y en ocasiones el potencial de acción (C). La línea de trazos representa el potencial de reposo que en esta célula era de -78 mV. D. En otra célula de agrupamiento inicial con un potencial de reposo de -76 mV (línea de trazos) se observa que la onda inicial que se genera con un pulso de 0,55 nA (parte de la respuesta señalada con una flecha que queda por encima de la línea de puntos), tras la aplicación de TTX 15  $\mu$ M (E), apenas se esboza con pulsos de 0,55 y 0,7 nA.

El umbral para la activación de esta onda subumbral, que es muy próximo al umbral para la activación del PDA, se observa en la figura 14A, B y C. En la figura 14A se muestra como con dos pulsos añadidos a un pulso principal no se manifiesta claramente una conductancia despolarizante que sí lo hace cuando se alcanzan un valor más despolarizado del potencial de membrana mediante la adición de 5 pulsos pequeños al pulso principal (figura 14B). La activación de una conductancia despolarizante se manifiesta por la convexidad hacia arriba (flecha en la figura 14B) que aparece tras el 5<sup>o</sup> pulso pequeño. En otras ocasiones se alcanza el umbral para la generación del PDA (figura 14C). El que la activación de una conductancia origine una despolarización se debe a que su potencial de equilibrio es más positivo que el potencial de membrana al cuál se ha activado. En nuestro caso, los iones más abundantes con un potencial de equilibrio más despolarizado que el umbral del potencial de acción son el  $\text{Na}^+$  y el  $\text{Ca}^{2+}$ .



### **2.1.1. Conductancias para el $\text{Na}^+$ en la respuesta subumbral**

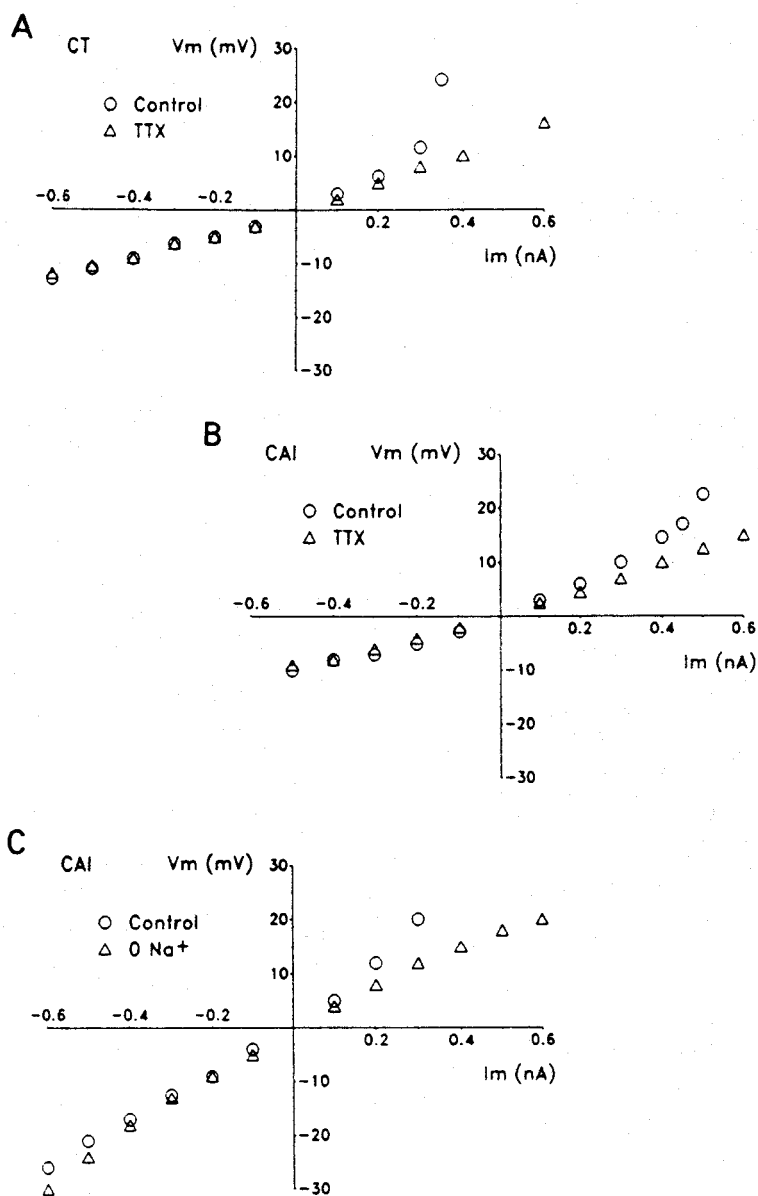
La posible participación de una conductancia para los iones de  $\text{Na}^+$  en la génesis de la onda despolarizante subumbral que se ha mostrado en las figuras 13 y 14, se estudió o bloqueando los canales de  $\text{Na}^+$  con tetrodotoxina (TTX), que es un bloqueante selectivo de los canales de  $\text{Na}^+$  dependientes de voltaje, o sustituyendo el  $\text{Na}^+$  en la solución externa por el catión impermeable  $\text{Tris}^+$ . El efecto de la aplicación de TTX se muestra en los paneles inferiores de la figura 14. Se observa que la onda despolarizante inicial que se genera en la situación control con un pulso de 0,55 nA (flecha en la figura 14D), desaparece al aplicar TTX (15  $\mu\text{M}$ ) en la solución externa (figura 14E), originándose una respuesta totalmente pasiva con un pulso de idéntica intensidad. Para comprobar que la desaparición de la onda inicial no se debía a no alcanzar la misma despolarización que en situación control, se aumentó la intensidad del pulso a 0,7 nA, con lo que se superaba incluso la despolarización alcanzada en la situación control y no obstante la onda inicial está prácticamente abolida (figura 14E).

La activación de la onda despolarizante inicial es la causa de la aparición de la inflexión hacia arriba que se observaba en la curva I-V con los pulsos positivos de corriente (figuras 8B y 12B), pues cuando se eliminó la onda, también desapareció la inflexión citada. En la figura 15A y B se muestra que la TTX elimina la inflexión en el sentido positivo tanto en una CT como en una CAI, no teniendo apenas efecto en la respuesta de la membrana a pulsos de corriente negativos. Un resultado similar se obtuvo al sustituir el  $\text{Na}^+$  de la solución externa por  $\text{Tris}^+$  (figura 15C), lo que implica claramente una participación del  $\text{Na}^+$  en la onda despolarizante inicial y por tanto en la deflexión hacia arriba que se produce en la curva I-V con pulsos positivos de corriente.

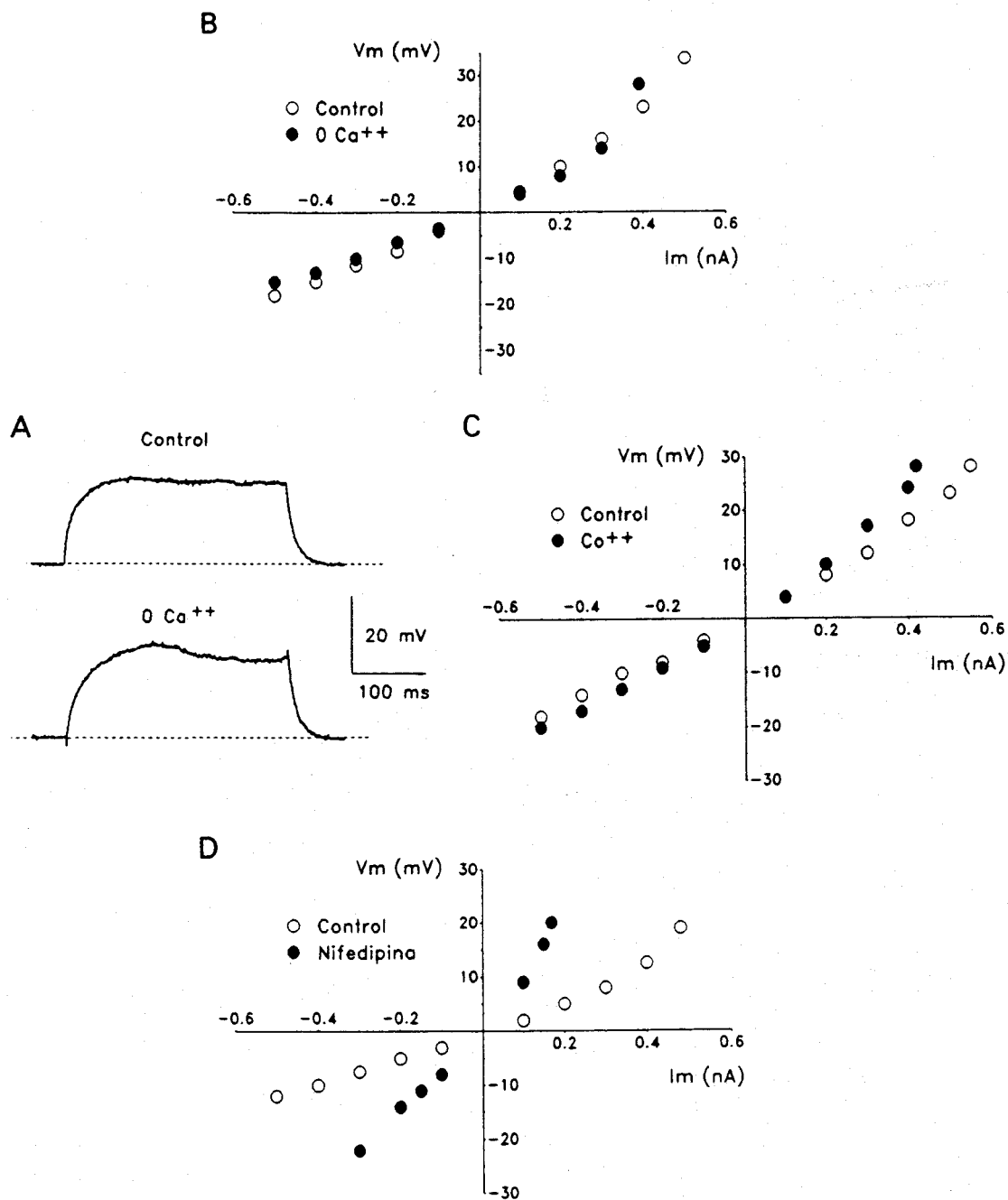
### **2.1.2. Conductancias para el $\text{Ca}^{2+}$ en la respuesta subumbral**

Otro posible ión responsable de la onda inicial despolarizante puede ser el  $\text{Ca}^{2+}$ , de hecho se ha mostrado en el apartado anterior, que cuando se impidió la entrada de  $\text{Na}^+$  al interior celular, la onda inicial disminuyó de forma clara, pero no totalmente (figura 14E, pulso de mayor intensidad). Cuando se sustituyó la solución externa estándar por otra que no contenía  $\text{Ca}^{2+}$  (sin quelantes del mismo) (figura 16A), se obtuvo una onda inicial mayor, es decir el resultado inverso al bloqueo de

la entrada de  $\text{Na}^+$  al interior celular. Este cambio no es atribuible a un aumento en la resistencia de entrada (RE) de la membrana, pues la RE disminuyó un poco en  $0 \text{ Ca}^{2+}$  (figura 16B). Como resultado de lo anterior la inflexión que ocurre en la curva I-V en el sentido despolarizante, se acentúa en la solución sin  $\text{Ca}^{2+}$  (figura 16B).



**Figura 15.** Abolición de la deflexión hacia arriba en el sentido despolarizante, de la curva I-V, en CT y CAI. La medida de la respuesta en voltaje, se hizo a los 100 ms del inicio del pulso. A. Efecto de una solución con TTX  $10 \mu\text{M}$ , en la respuesta subumbral de una CT. B. Igual en una CAI. C. Efecto en la respuesta subumbral de una CAI, de una solución en la que se substituyó equimolarmente el  $\text{ClNa}$  por  $\text{Tris}^+$ . La correspondencia de los símbolos con la situación experimental se indica en cada diagrama.



**Figura 16.** Efecto del bloqueo de la conductancia al Ca<sup>2+</sup> sobre la onda despolarizante inicial y la curva corriente-voltaje en células de agrupamiento inicial. A. Aumento de la onda despolarizante inicial al sustituir la solución externa por otra sin Ca<sup>2+</sup>. La línea de puntos representa el potencial de reposo que fué de -72 mV. B. Aumento de la inflexión de la curva I-V en el sentido despolarizante, al sustituir la solución externa por otra sin Ca<sup>2+</sup>. C. Resultado similar en la curva I-V al sustituir equimolarmente en la solución externa el Ca<sup>2+</sup> por Co<sup>2+</sup>. En esta situación la resistencia de entrada aumentó. En D se añadió a la solución externa nifedipina 100  $\mu$ M. La correspondencia de los símbolos con la situación experimental está indicada en cada panel.

Sólo en una de las 8 células en que se hizo este protocolo, se observó una disminución de la inflexión. Un resultado similar se obtuvo en las 5 células en las que se sustituyó equimolarmente el  $\text{Ca}^{2+}$  por  $\text{Co}^{2+}$  (figura 16C), con la diferencia de que en esta situación la resistencia de entrada aumenta. Cuando se utilizó una solución con nifedipina  $100 \mu\text{M}$  (figura 16D), que bloquea los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de alto umbral, la inflexión en el sentido despolarizante se siguió observando. Cuando se realizaron estos tres protocolos para estudiar la participación de conductancias de  $\text{Ca}^{2+}$  en la onda despolarizante inicial que aparece en las CT, se obtuvieron resultados similares.

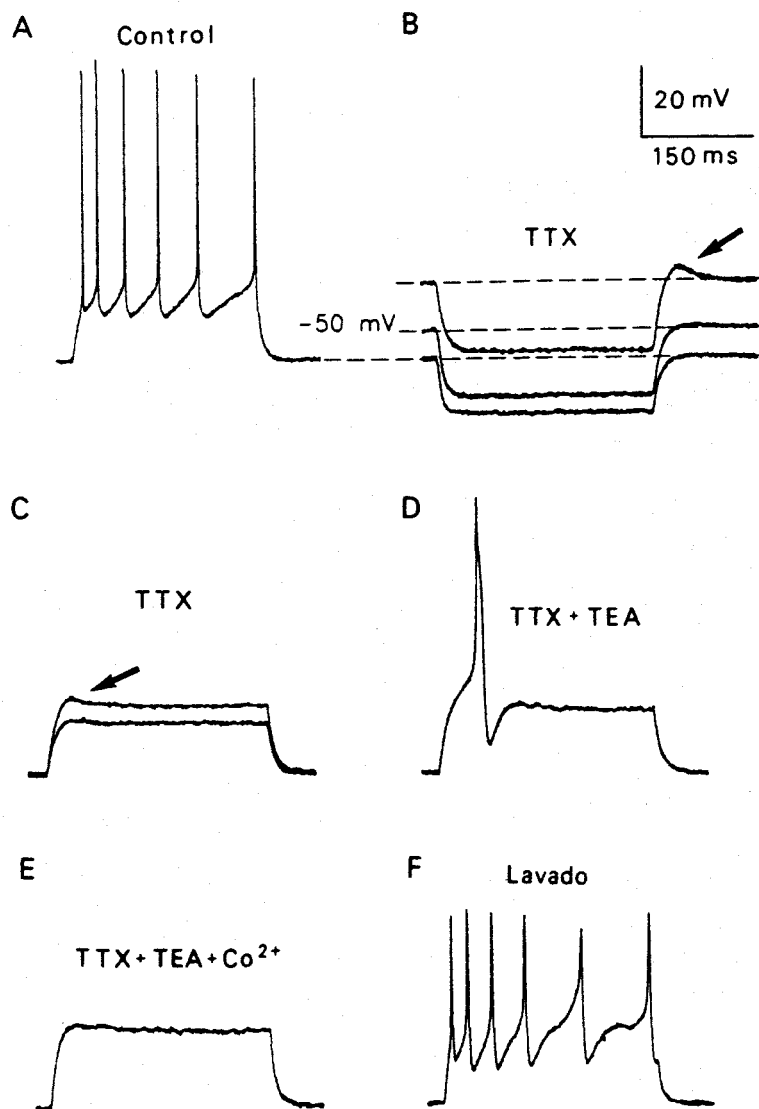
## **2.2. Respuesta supraumbral**

### **2.2.1. Conductancias para el $\text{Ca}^{2+}$**

Tanto en células tónicas como en células de agrupamiento inicial, se encontró una conductancia para calcio de alto umbral de activación, similar a la descrita con localización preferente en dendritas de neuronas del sistema nervioso central (Llinás, 1988). Para el estudio de las conductancias para el  $\text{Ca}^{2+}$  se bloqueó la conductancia para el  $\text{Na}^+$  con TTX. En la figura 17A se muestra una célula tónica, con su típica adaptación progresiva en la frecuencia de aparición de PDA a lo largo de un pulso. Tras el bloqueo de estos PDA con TTX  $10 \mu\text{M}$ , se aplicó un pulso hiperpolarizante para deactivar los canales existentes y a la vez una corriente continua de distintas intensidades, para obtener despolarizaciones de diferentes amplitudes (figura 17B). Con este protocolo se puede observar que a  $-50 \text{ mV}$  (trazo intermedio de la figura 17B), comienza a activarse una conductancia que ya se manifiesta claramente a  $-36 \text{ mV}$  (trazo superior, flecha). Esta conductancia debe ser de alto umbral de  $\text{Ca}^{2+}$  pues la de bajo umbral debería activarse de forma casi total con el salto de voltaje que ocurre en el trazo intermedio (Llinás y Yarom, 1981; Carbone y Lux, 1984).

La activación de esta conductancia también se puso de manifiesto con pulsos despolarizantes desde PDM, manteniendo una concentración de TTX de  $10 \mu\text{M}$  en la solución externa (figura 17C, flecha). Si en esta situación se añade TEA  $10 \text{ mM}$  a la solución externa (figura 17D), el bloqueo de conductancias para  $\text{K}^+$ , permite que el acoplamiento electrotonico entre el soma y las dendritas sea mucho mayor, con lo que el pulso inyectado en el soma consigue una despolarización mayor en las dendritas y por tanto una mayor activación de la conductancia de  $\text{Ca}^{2+}$  de alto

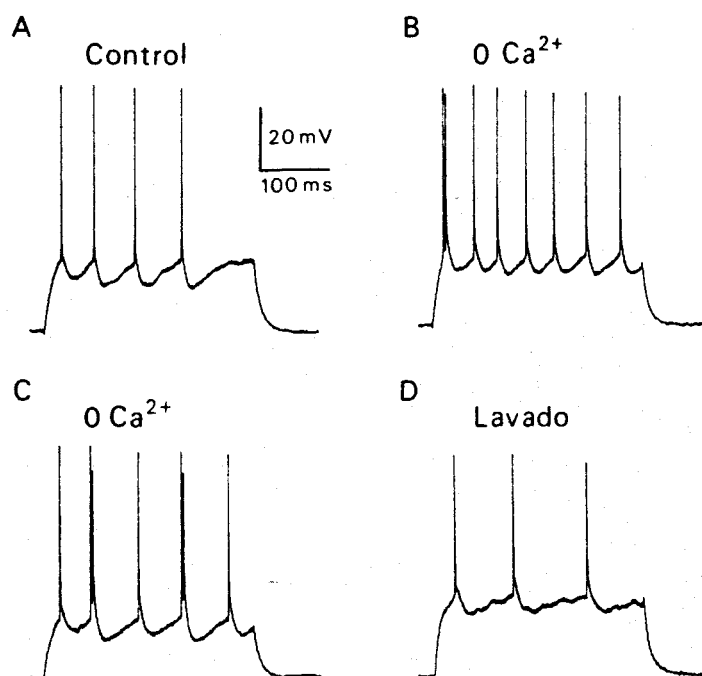
umbral, y a la vez la espiga de  $\text{Ca}^{2+}$  que ocurre en la dendrita se transmite al soma con muy poco decremento electrotonico (figura 17D). Para comprobar que la espiga representaba una conductancia para el  $\text{Ca}^{2+}$  se pasó una solución externa con TEA y



**Figura 17.** Estudio de las conductancias para el  $\text{Ca}^{2+}$  en una célula tónica. El potencial de membrana en reposo fué de  $-58$  mV. A. Respuesta tónica típica con un pulso de  $0,7$  nA. B. Tras la adición de TTX  $10$   $\mu\text{M}$  a la solución externa, se explora la respuesta a un pulso de  $-0,85$  nA, desde potencial de reposo y despolarizando la célula  $8$  y  $22$  mV. C. Respuesta en TTX  $10$   $\mu\text{M}$ , para pulsos de  $0,6$  y  $0,8$  nA. D. Respuesta a un pulso de  $0,7$  nA, en una solución con TTX  $10$   $\mu\text{M}$  y TEA  $10$  mM. E. Respuesta a un pulso de  $1$  nA, en una solución en la que se ha sustituido equimolarmente el  $\text{Ca}^{2+}$  por  $\text{Co}^{2+}$  y que contiene TTX  $10$   $\mu\text{M}$  y TEA  $10$  mM. F. Tras  $45$  minutos en una solución externa estándar, con un pulso de  $0,8$  nA.

TTX en la que se había sustituido equimolarmente el  $\text{Ca}^{2+}$  por  $\text{Co}^{2+}$ , obteniéndose el bloqueo de la espiga (figura 17E). Al volver a una solución externa estándar se recuperó el disparo neuronal, aunque no hubo una reversión total debido probablemente a que los bloqueantes utilizados se lavan lentamente.

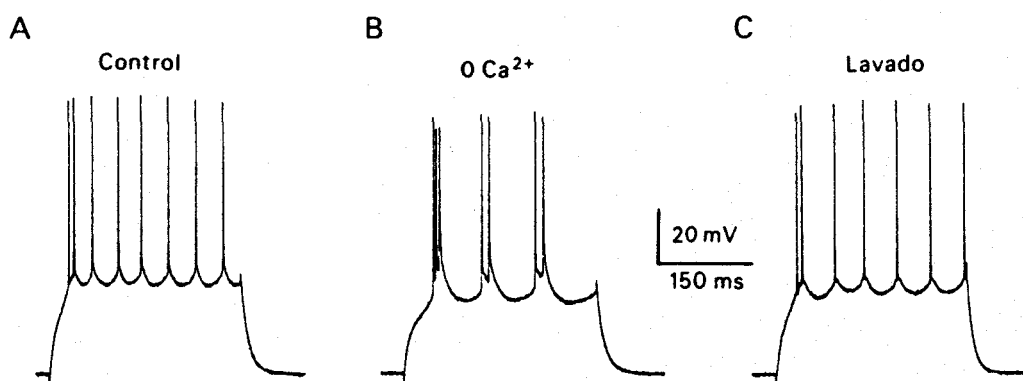
La conductancia de  $\text{Ca}^{2+}$  de alto umbral, también se puso de manifiesto si en vez de utilizar TEA, se sustituyó el  $\text{Ca}^{2+}$  por  $\text{Ba}^{2+}$  en la solución externa, debido a que el  $\text{Ba}^{2+}$  bloquea conductancias de  $\text{K}^+$  y permea muy bien por los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ . En algunas células la conductancia de  $\text{Ca}^{2+}$  de alto umbral produjo un disparo repetitivo con TTX y TEA o sólo con TTX cuando la célula se despolarizó con corriente continua.



**Figura 18.** Efecto de una solución externa sin  $\text{Ca}^{2+}$  en una célula tónica. A. Respuesta celular ante un pulso de 0,8 nA. B. Respuesta ante un pulso de 0,8 nA, tras 12 minutos en  $0 \text{ Ca}^{2+}$ . C. Idéntica situación pero aplicando un pulso de 0,6 nA. D. Tras 18 minutos en solución externa normal, la célula responde con tres potenciales de acción ante un pulso de 0,7 nA.

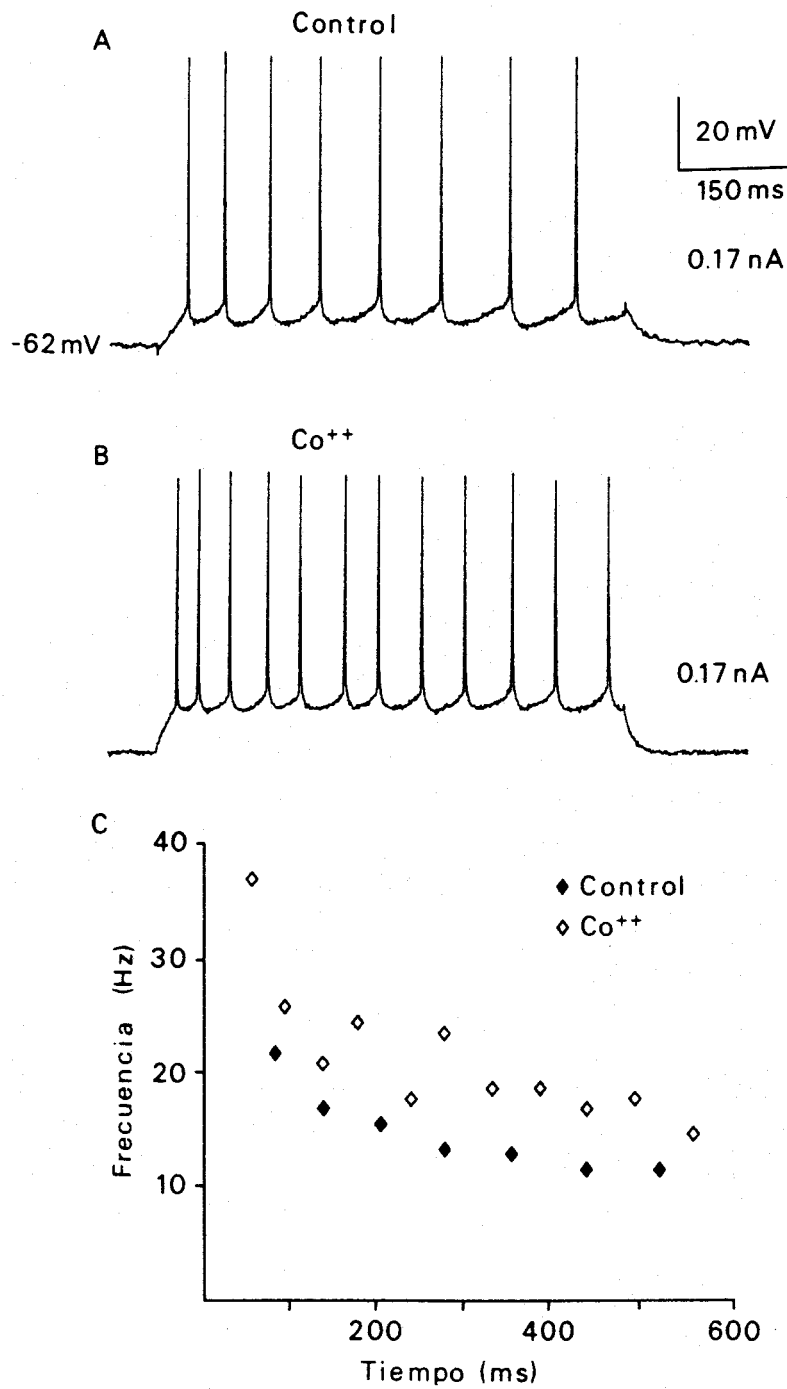
### 2.2.2. Efecto del bloqueo de la conductancia para $\text{Ca}^{2+}$

El estudio de la abolición de la conductancia a los iones de  $\text{Ca}^{2+}$  sobre la actividad eléctrica neuronal se estudió mediante la utilización de una solución externa sin  $\text{Ca}^{2+}$  o la aplicación de distintos bloqueantes de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  como el  $\text{Co}^{2+}$  o la nifedipina. El efecto de la aplicación de una solución externa en la que se había sustituido el  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  por  $\text{ClNa}$ , fué un aumento de la posibilidad de generarse PDA agrupados, en respuesta a un pulso de corriente transmembranario. Este hecho se muestra en la figura 18, donde una célula tónica (figura 18A), al ser cambiada la solución externa por otra sin  $\text{Ca}^{2+}$ , pierde su carácter tónico (figura 18B). Los PDA se pueden agrupar también durante el pulso (figura 18C), a diferencia de lo que sucede en las CAI, en las que el agrupamiento sólo ocurre en el inicio del pulso. Con pulsos de 0,9 nA, se podían obtener brotes de tres espigas (no mostrado). Al reinstaurar el  $\text{Ca}^{2+}$  externo la célula volvió a mostrar un patrón de disparo tónico (figura 18D).



**Figura 19.** Efecto de una solución externa sin  $\text{Ca}^{2+}$  en una célula de agrupamiento inicial. A. Respuesta inicial en la solución externa normal con un pulso de 0,46 nA. B. Respuesta con un pulso de 0,3 nA, en una solución externa sin  $\text{Ca}^{2+}$ . C. Tras 30 minutos de lavado en la solución externa estándar con un pulso de 0,44 nA.

Al igual que lo descrito en las CT, la sustitución de la solución externa por otra sin  $\text{Ca}^{2+}$  produjo en las CAI un aumento en la tendencia a generar PDA agrupados. En la figura 19A se muestra una CAI con los dos primeros PDA agrupados, en la que al cambiar la solución externa por otra sin  $\text{Ca}^{2+}$  (figura 19B), muestra un patrón de disparo completamente distinto, generándose brotes de espigas durante todo el

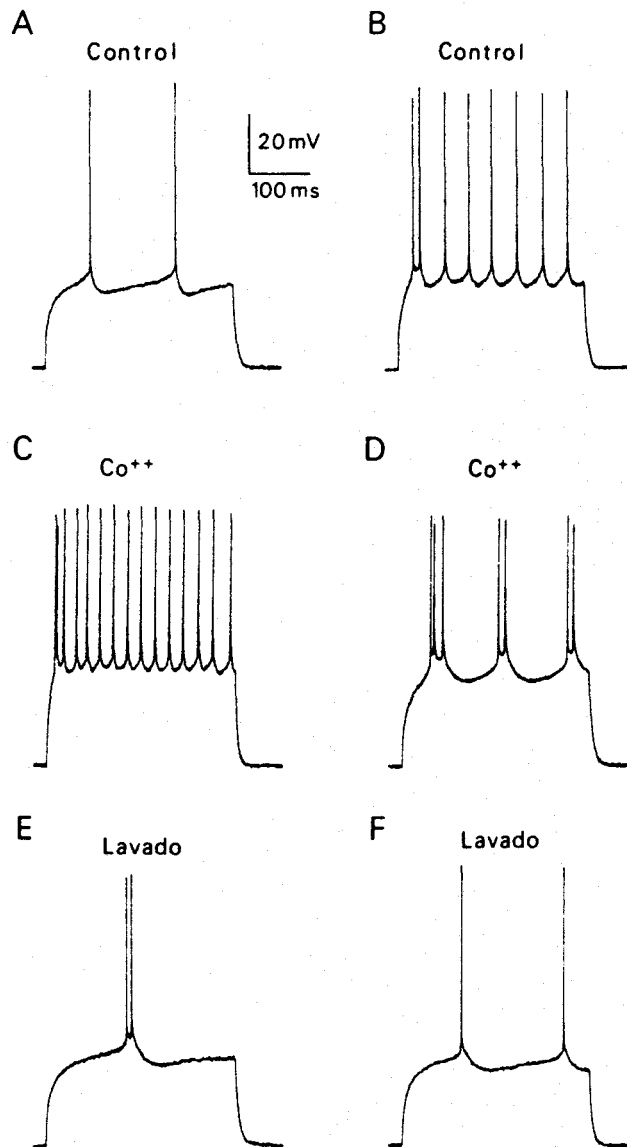


**Figura 20.** Efecto del bloqueo de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  por  $\text{Co}^{2+}$ , en una célula tónica. A. Respuesta celular a un pulso de 0,17 nA. B. Respuesta ante el mismo pulso tras 5 minutos en una solución con  $\text{Co}^{2+}$ . C. Relación frecuencia instantánea-tiempo transcurrido en el pulso, para los pulsos presentados en A y B. El primer punto corresponde en ambos casos a la frecuencia instantánea del 2° potencial de acción.





pulso. Al volver a la solución externa con 2,4 mM  $\text{Ca}^{2+}$  (figura 19C), la célula presenta de nuevo su patrón de disparo típico. No obstante lo anterior en algunas ocasiones el efecto de 0  $\text{Ca}^{2+}$  externo no fué tan espectacular, consistiendo en un aumento del número de espigas que se agrupaban en el brote inicial.

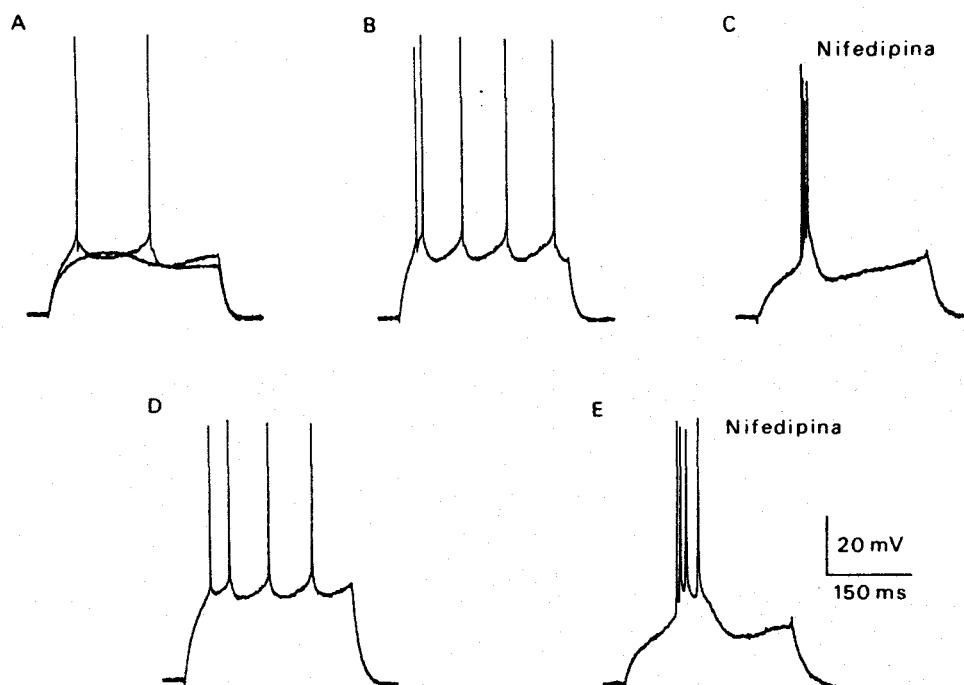


**Figura 21.** Bloqueo de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  por  $\text{Co}^{2+}$  en una célula de agrupamiento inicial. A. Respuesta inicial tónica con un pulso de 0,56 nA. B. Al aumentar la amplitud del pulso a 0,66 nA la célula muestra el típico patrón con las dos primeras espigas agrupadas. C. 10 min después de sustituir equimolarmente el  $\text{Ca}^{2+}$  por  $\text{Co}^{2+}$  con el pulso de 0,66 nA. D. En presencia de  $\text{Co}^{2+}$  la respuesta es totalmente fásica con un pulso de 0,45 nA. E. Tras 10 min de lavado del Co, con un pulso de 0,47 nA. F. Tras 45 min en solución estándar con un pulso de 0,5 nA.

En otra serie de experimentos se sustituyó el  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  equimolarmente por  $\text{Cl}_2\text{Co}$ , pues el  $\text{Co}^{2+}$  no permea a través de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , bloqueándolos. El resultado fué también un aumento en la tendencia a agrupar los PDA. Así en la CT de la figura 20, se puede observar que el  $\text{Co}^{2+}$ , además de provocar un aumento de la resistencia de entrada, y por tanto del número de espigas para una misma amplitud de estimulación, cambia el patrón de disparo que inicialmente mostraba una disminución progresiva de la frecuencia instantánea (figura 20A), a un patrón en el que los PDA tienden a agruparse de dos en dos (figura 20B). Este efecto se observa más fácilmente en el panel mostrado en la figura 20C.

En las células CAI el bloqueo de  $\text{Ca}^{2+}$  por  $\text{Co}^{2+}$  tuvo un efecto similar al descrito en el párrafo anterior. En la figura 21A se muestra una CAI en la que con intensidades bajas de estimulación se obtiene un patrón tónico, para luego agruparse las dos primeras espigas con intensidades mayores (figura 21B). En esta célula el  $\text{Co}^{2+}$  originó un aumento del número de PDA generados con la misma estimulación, probablemente debido al aumento de la RE que produce, y un aumento en el número de PDA en el agrupamiento inicial (figura 21C). Con estimulaciones menores se puede apreciar que la capacidad para agrupar PDA se extiende a toda la duración del pulso (figura 21D). En el proceso de lavado del  $\text{Co}^{2+}$  disminuye la capacidad de generar brotes en respuesta al pulso de corriente (figura 21E), y tras 45 min de lavado la célula es capaz de generar de nuevo un patrón tónico con bajas intensidades de estimulación (figura 21F).

Al igual que con el  $\text{Co}^{2+}$  que es un bloqueante inorgánico de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , la aplicación de nifedipina, un bloqueante orgánico perteneciente a la familia de las dihidropiridinas, originó un cambio en el patrón de disparo en el que los PDA se agruparon en brotes. En la figura 22 se muestra este efecto en una CAI y una CT. En la figura 22A se muestra una CAI en la que un pulso de 0,48 nA resulta en una respuesta subumbral, mostrando la típica onda despolarizante inicial. Con una estimulación algo mayor la respuesta es bastante tónica (figura 22A), para luego agruparse las dos primeras espigas al aumentar la intensidad del pulso (figura 22B). La aplicación de nifedipina en esta célula resultó en la generación de un brote de espigas (figura 22C) con una amplitud de estimulación para la que inicialmente la respuesta era subumbral. En la CT mostrada en la figura 22D la aplicación de nifedipina también provocó la aparición de un patrón de disparo similar al originado en la célula de agrupamiento inicial (figura 22E).

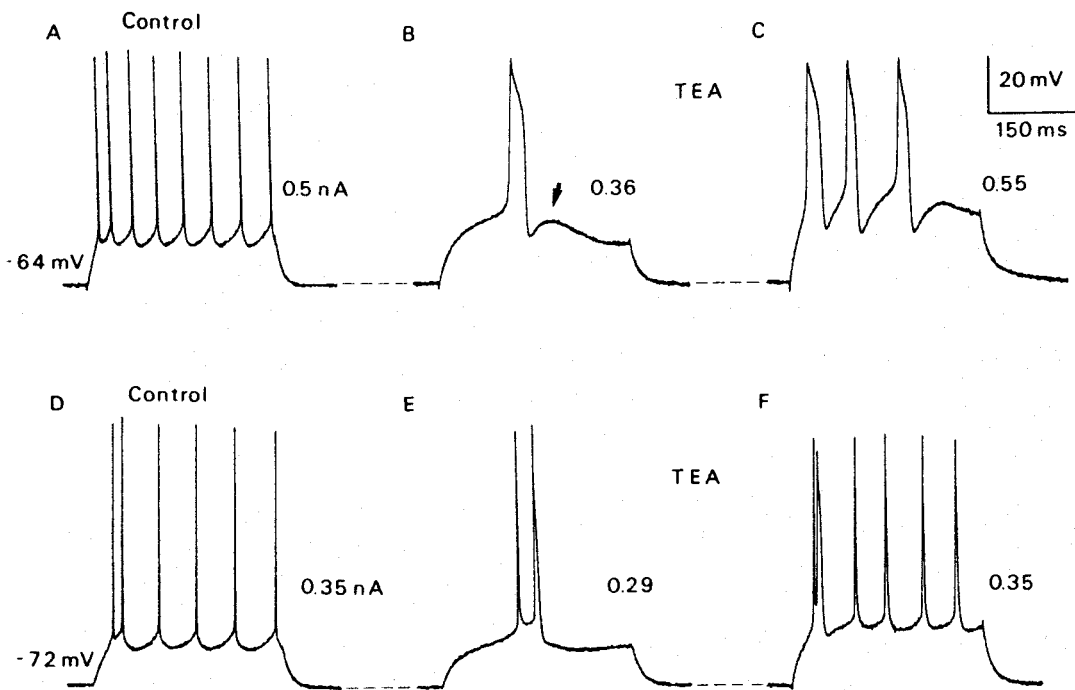


**Figura 22.** Efecto del bloqueo de  $\text{Ca}^{2+}$  por nifedipina. A. Célula con agrupamiento inicial, en la que se muestra la onda subumbral que ocurre con una estimulación de 0,48 nA y la respuesta tónica inicial con un pulso de 0,55 nA. B. Con una intensidad de 0,62 nA, el patrón es ya típico de una célula de agrupamiento inicial. C. Tras 5 min en nifedipina 100  $\mu\text{M}$ , con una estimulación de 0,35 nA. D. Célula tónica con su patrón típico a una estimulación de 0,36 nA. E. Tras 10 min en una solución con nifedipina 75  $\mu\text{M}$ , con la misma intensidad de estimulación.

Los datos que se han mostrado en este apartado indican por lo tanto, que el bloqueo de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior celular si bien no explica la diferencia entre CT y CAI pues no transforma un tipo en otro, sí que induce en ambos tipos un patrón de disparo común, con una mayor tendencia a agrupar los PDA (compárese la figura 184C y 19B o la figura 22C y 22E). Estos resultados sugieren que la conductancia para  $\text{Ca}^{2+}$  de alto umbral o conductancias dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  impiden el agrupamiento de los PDA, favoreciendo un disparo de carácter tónico.

### 2.2.3. Efecto del bloqueo de conductancias para el $\text{K}^{+}$

La participación de las conductancias de  $\text{K}^{+}$  en el patrón de disparo se estudió utilizando en la solución externa TEA, que bloquea tanto la conductancia para el  $\text{K}^{+}$



**Figura 23.** Efecto del bloqueo de las conductancias para  $K^+$  por tetraetilamonio. A. Célula tónica con el típico patrón de adaptación progresiva. B. Tras 10 min en una solución con tetraetilamonio (10 mM) se produce un gran ensanchamiento de la espiga. C. En TEA y con estimulaciones de intensidad parecida a control, sigue mostrando un disparo tónico. D. Célula de agrupamiento inicial con dos potenciales de acción agrupados en el inicio del pulso. E y F. Tras 10 min expuesta a tetraetilamonio (10 mM) con dos intensidades de estimulación distintas.

dependiente de voltaje llamada "rectificador retrasado" como la conductancia de  $K^+$  dependiente de la concentración interna de  $Ca^{2+}$  de gran conductancia. Tanto las CT como las CAI mostraron un aumento en la duración de las espigas, probablemente por un aumento del acoplamiento electrofónico entre el soma y las dendritas, pues como se comentó anteriormente, la despolarización provocada por el PDA alcanzaría las dendritas con menor decremento, obteniéndose una mayor activación de la conductancia de  $Ca^{2+}$  de alto umbral, y la despolarización generada por esta conductancia para el  $Ca^{2+}$  se transmitiría al soma con un menor decremento electrofónico. En el caso de las CT el aumento de duración fue mayor, así la célula de la figura 23A, al ser bañada con una solución 10 mM TEA, genera una espiga mucho más ancha (figura 23B), pero no obstante no cambió su patrón de disparo, ya que pudo generar una espiga aislada y si se aumentaba la intensidad de estimulación

se obtenía un patrón tónico (figura 23C). En el caso de las CAI (figura 23D), la aplicación de TEA aumentó algo la capacidad para agrupar los dos primeros PDA (figura 23E), pero con pulsos de mayor amplitud el patrón de disparo se conservó, siendo siempre el 2º PDA el que sufrió un aumento mayor en su duración (figura 23F).

El efecto del TEA fué por tanto contrario al bloqueo de los canales de  $Ca^{2+}$ , en el sentido de que no sólo no eliminó las diferencias entre los dos patrones de disparo sino que las acentuó.

### 3. Adaptación a corto plazo en células tónicas y células con agrupamiento inicial

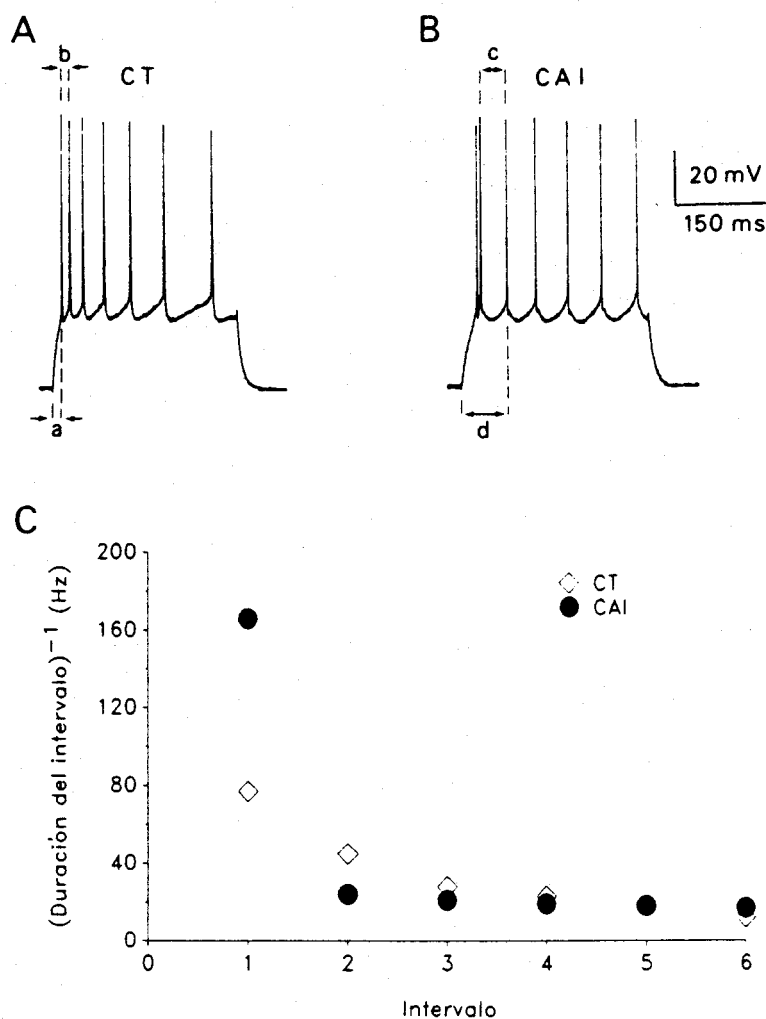
En el contexto del presente trabajo se denomina adaptación al fenómeno consistente en la disminución de la frecuencia de generación de PDA durante la aplicación de un pulso rectangular de corriente, o lo que es lo mismo el aumento de la duración de los intervalos entre los PDA (Kernell, 1965). Este fenómeno, que se observa en el disparo de neuronas centrales, se relaciona con la disminución en la respuesta ante estímulos mantenidos en los receptores sensoriales (Hunt y Ottoson, 1975; Brown, 1990) y con la habituación en la conducta motora ante estímulos externos repetidos (Harutiunian-Kozak, Dec y Dreher, 1971; Oyster y Takahashi, 1975). En la adaptación del disparo neuronal se han distinguido dos componentes:

- adaptación a corto plazo, (ACP): que se refiere a la disminución de la frecuencia de aparición de PDA durante los primeros 300 ms de un pulso rectangular de corriente intracelular despolarizante.

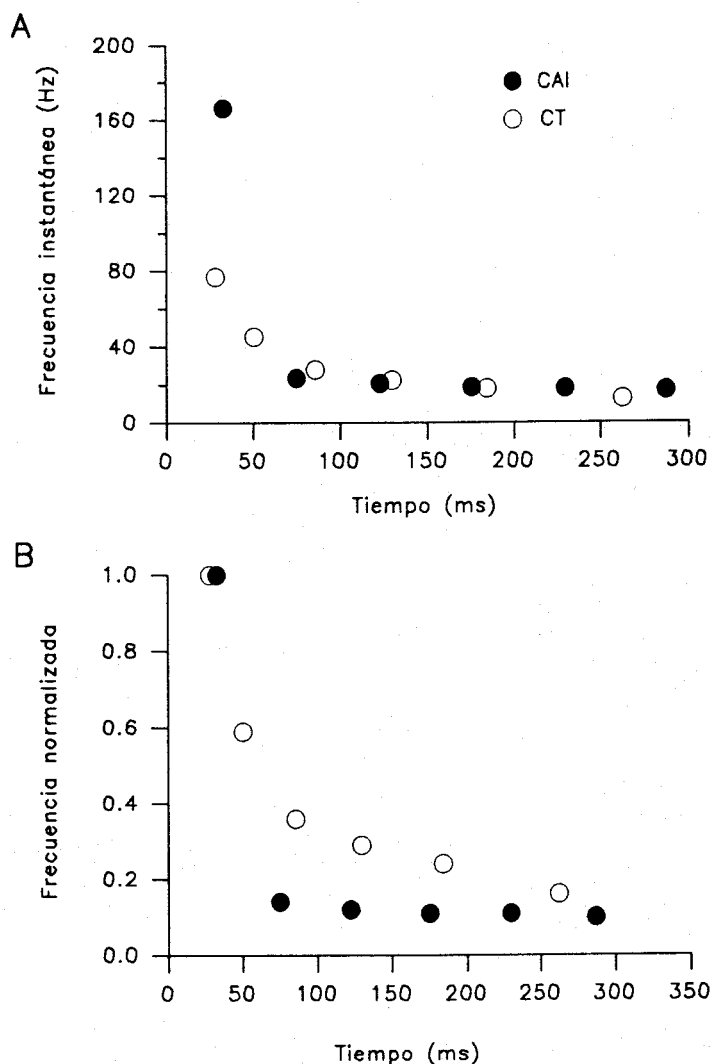
- adaptación a largo plazo, (ALP): que se refiere a la disminución en el número de PDA generados por un estímulo constante administrado de forma repetida, generalmente produciendo una despolarización con pulsos de corriente aplicados de forma repetitiva.

Para estudiar la adaptación a corto plazo se utilizaron una serie de parámetros que se definen en la figura 24. En la figura 24A el tiempo indicado por "a" es la latencia que existe en el pulso para que se genere el 1º PDA; "b", representa la duración del 1º intervalo entre PDA (IEP), el valor inverso de esta duración expresado en segundos<sup>-1</sup> se puede definir como frecuencia instantánea de disparo (FI). En la figura 24B, "c" representa la duración del 2º IEP y "d" el tiempo en que se origina el 3º PDA, contado desde el inicio del pulso. La figura 24C ilustra la

adaptación a corto plazo (ACP), de una CT (figura 24A) y una CAI (figura 24B), mostrándose la variación de la frecuencia instantánea (FI), para los sucesivos intervalos en ambas células. Se puede observar que la CT se adapta progresivamente y continuaría haciéndolo si el pulso tuviese una duración mayor. La CAI en cambio, se adapta casi totalmente en el 2º IEP, mostrando luego una adaptación muy pequeña. Para cuantificar esta adaptación al inicio del pulso, se halló el cociente (FI de la 3ª espiga) / (FI de la 2ª espiga), en pulsos de 300 ms que originaban una respuesta de 7 espigas, obteniéndose para las CT un valor de  $0,55 \pm 0,08$  (media  $\pm$  D.E.,  $n=12$ ) y para las CAI un valor de  $0,2 \pm 0,07$  ( $n=12$ ). Esta diferencia en la



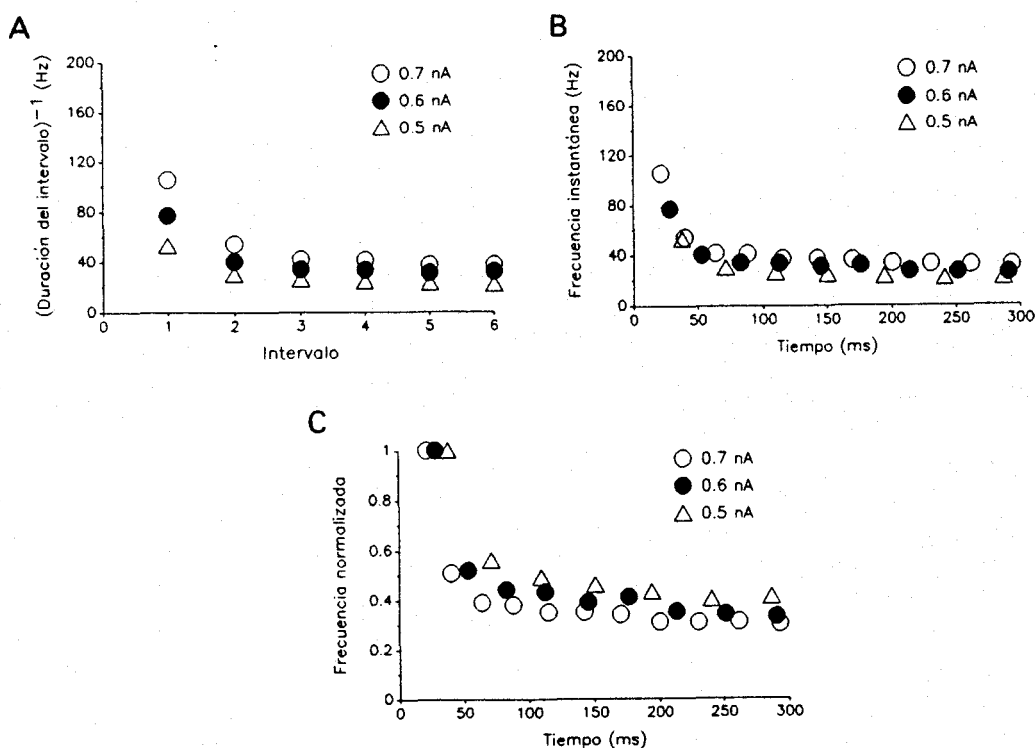
**Figura 24.** Adaptación a corto plazo en una célula tónica y una célula de agrupación inicial. A. Respuesta de una célula tónica ante un pulso de corriente de 0,88 nA. B. Respuesta de una célula de agrupación inicial ante un pulso de corriente de 0,7 nA. En C se compara la adaptación que ocurre en A y B, en relación a los intervalos entre los potenciales de acción. Ver el texto para mayor detalle.



**Figura 25.** Curso temporal de la adaptación a corto plazo mostrada en la figura 24. En A se muestra como disminuye la frecuencia instantánea en relación al instante en el que se generan los potenciales de acción, en los dos registros mostrados en la figura 24A y B. B muestra la misma relación pero con la frecuencia instantánea normalizada para cada célula.

corto plazo, es pues una de las características que permiten distinguir estos dos tipos celulares.

Aunque desde el punto de vista funcional la relación FI/intervalo es muy ilustrativa, se profundizó en la evolución temporal de la disminución de la FI, relacionándola con el instante en el que se generan los PDA, según se representa en la figura 25A. El primer punto de cada célula representa por tanto, el 2º PDA que



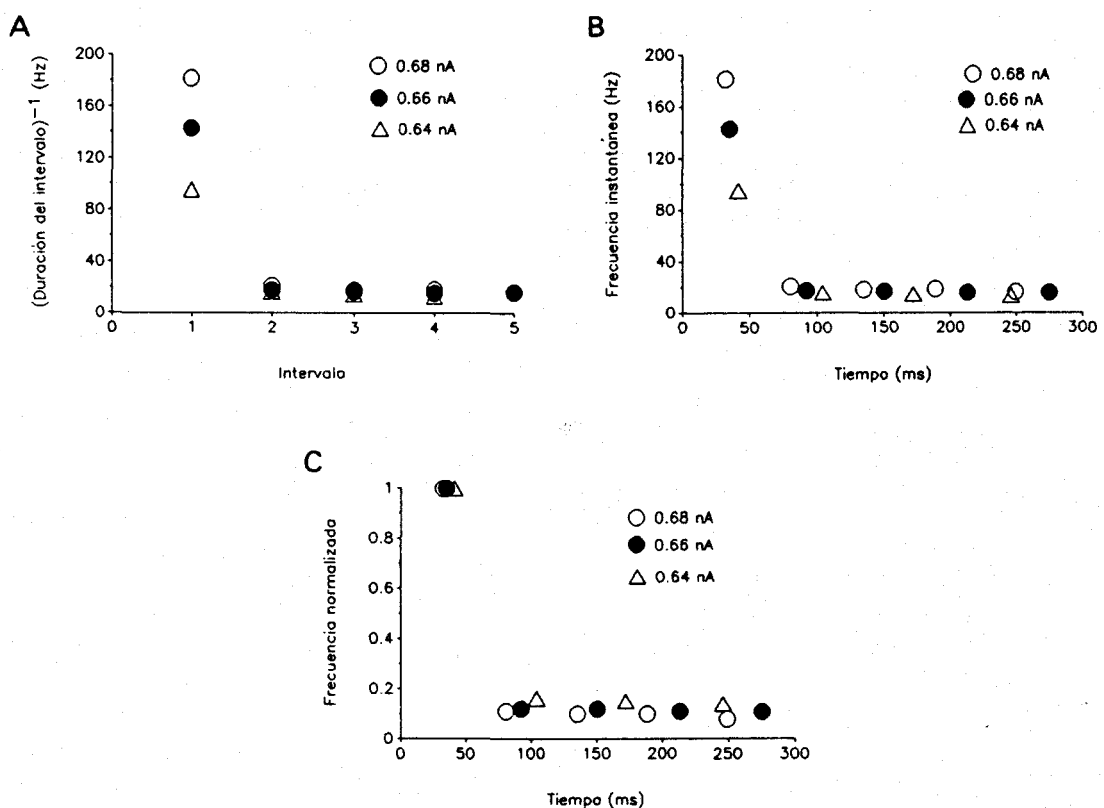
**Figura 26.** Efecto del aumento de la amplitud del pulso en la adaptación a corto plazo que ocurre en una célula tónica. En A se relaciona la disminución de la frecuencia instantánea para cada amplitud de estimulación versus los intervalos que ocurren en los pulsos. B Disminución de la frecuencia instantánea en relación al instante en que se generan los potenciales de acción. C. Igual que en B con la frecuencia instantánea normalizada en cada pulso.

ocurre durante el pulso. Se observa que en los primeros 75 ms, la frecuencia instantánea de disparo (FI) en la CAI disminuye mucho más que en la CT. A partir de estos primeros 75 ms la CT sufre una mayor adaptación que la CAI. Este hecho se observa mejor si se normaliza la FI con respecto a la FI del 2° PDA, que es la FI mayor en cada pulso. Así se ha hecho en la figura 25B, donde se observa por un lado que la adaptación que sufre la CAI es comparativamente mayor que la de la CT, y por otro que mientras la CAI alcanza casi completamente su adaptación en el tercer PDA (que está representado en el segundo punto de la gráfica), la CT continúa adaptándose durante todo el pulso.



### 3.1. Variación de la adaptación a corto plazo con la intensidad del estímulo

Se analizó la variación de la ACP en cada tipo celular, en relación a la intensidad de la estimulación. En las CT el aumento de la intensidad del pulso intracelular, determina un aumento de la frecuencia instantánea, especialmente en los intervalos iniciales de cada pulso (figura 26A). En la figura 26B se muestra la relación frecuencia instantánea-tiempo en que ocurre cada potencial de acción (FI-T). En los primeros 50 ms, se aprecia una relación entre el tiempo transcurrido desde el inicio del pulso hasta que se origina un PDA y la FI que este PDA muestra. Así el 2º PDA del pulso de 0,5 nA y el 3º PDA del pulso de 0,7 nA, se originan en tiempos similares y muestran una FI parecida. En la figura 26C, se aprecia que si se normaliza la FI en cada pulso, la adaptación es de forma relativa mayor según se aumenta la amplitud del pulso.



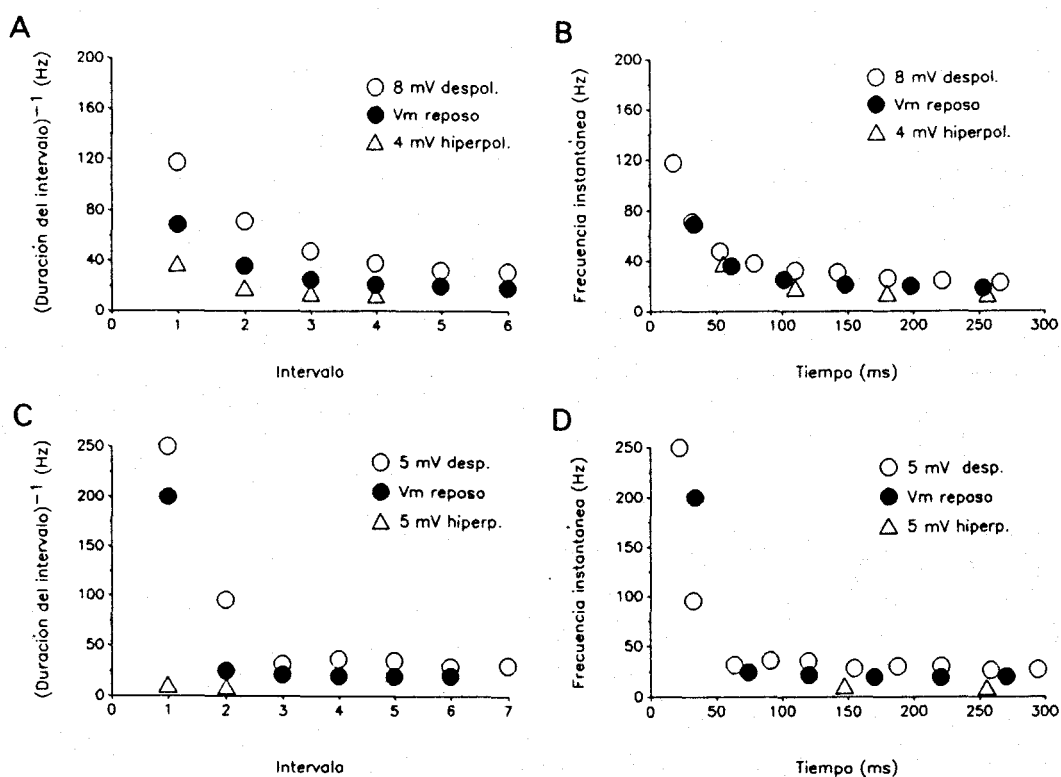
**Figura 27.** Modificación de la adaptación a corto plazo en una célula de agrupamiento inicial, al aumentar la intensidad de estimulación. A. Disminución de la frecuencia instantánea en relación a los intervalos que ocurren, para tres pulsos de amplitud creciente. B. Disminución de la frecuencia instantánea en relación al tiempo en que se generan los potenciales de acción. C. Idéntica relación pero con la frecuencia normalizada para cada pulso.

En las CAI, el comportamiento fué similar, excepto que el aumento de la frecuencia instantánea en el primer intervalo es mucho mayor que en las CT para un mismo incremento de la amplitud de estimulación. En la figura 27A, se observa que para un aumento de 0,04 nA en la intensidad del pulso, el aumento en la frecuencia instantánea del primer intervalo es mucho mayor de lo que era en una CT, para un incremento de 0,2 nA (figura 26A). La respuesta en los restantes intervalos, es similar a lo que ocurre en las CT. En la figura 27B, se presenta esta modificación de la frecuencia instantánea en relación al instante en que se generan los PDA. Como se observa en la figura 27C la adaptación relativa aumenta con la amplitud del pulso, igual que ocurría con las células tónicas.

### **3.2. Variación de la adaptación a corto plazo con el potencial de membrana**

Se estudió también la variación de la adaptación a corto plazo, al modificar el potencial de membrana celular. Como se observa en la figura 28A, la despolarización de una célula tónica, tiene un efecto similar al aumento de la amplitud del pulso inyectado: un aumento de la FI que es mayor en los primeros intervalos, pero sin modificar su patrón de disparo tónico con adaptación. Este aumento se relaciona en la figura 28B con el instante de aparición de la espiga en el pulso. Como se mostró con el aumento de la intensidad del pulso, la FI en los primeros ms aparece en estrecha relación con el tiempo en el que se genera el PDA, contado desde el inicio del pulso, así la 2ª espiga del pulso a  $V_m$  en reposo, se origina a un tiempo similar a la 3ª espiga del pulso a +8 mV y muestra una FI parecida.

En las CAI la modificación del patrón de disparo, y por tanto de la ACP al modificar el potencial de membrana celular, es también similar a lo que ocurre al aumentar la amplitud del pulso desde el potencial de reposo. Una ACP típica de las células de agrupamiento inicial se muestra en la figura 28C, cuando la célula está a potencial de reposo (círculos negros). Cuando la célula se hiperpolariza 5 mV, la respuesta se hace tónica, generándose tres PDA (triángulos). Al despolarizar la célula 5 mV (círculos blancos), se genera un brote inicial de tres espigas, con lo que la adaptación no se alcanza en el 2º intervalo, sino en el 3º. La variación de la relación frecuencia instantánea-tiempo con la modificación del potencial de membrana en esta célula se muestra en la figura 28D.

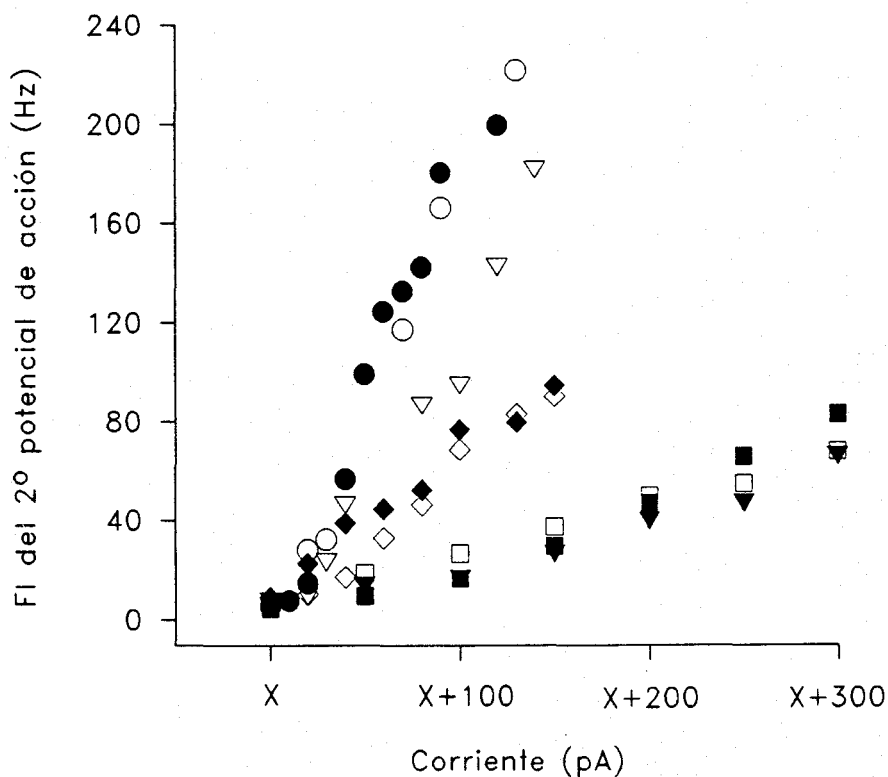


**Figura 28.** Modificación de la adaptación a corto plazo, al cambiar el potencial de membrana celular. **A.** Modificación de la frecuencia instantánea en relación a los intervalos, al variar el potencial de membrana en una célula tónica. El potencial de membrana de reposo en esta célula fué de  $-68$  mV. **B.** Relación frecuencia instantánea-tiempo en que se originan las espigas para los mismos pulsos que en **A.** **C.** Relación frecuencia instantánea-intervalo, para tres potenciales de membrana en una célula de agrupamiento inicial que tenía un potencial de membrana de reposo de  $-75$  mV. **D.** Relación frecuencia instantánea-tiempo para los mismos pulsos que en **C.**

### 3.3. Variación de la frecuencia instantánea con la intensidad del estímulo

En el apartado anterior se ha mostrado cómo al aumentar la intensidad del pulso inyectado, el PDA que muestra un mayor incremento en su FI es el 2°. La relación frecuencia instantánea-intensidad del pulso (FI-I), para el 2° PDA, se muestra en la figura 29 para ocho células, observándose un comportamiento bastante lineal. Las células representadas por cuadrados blancos y negros y por triángulos negros son células tónicas, siendo en este grupo la pendiente de la relación FI-I, de  $206 \pm 53$  Hz/nA (media  $\pm$  D.S.,  $n=10$ ). En el grupo de CAI, el rango de variación es más

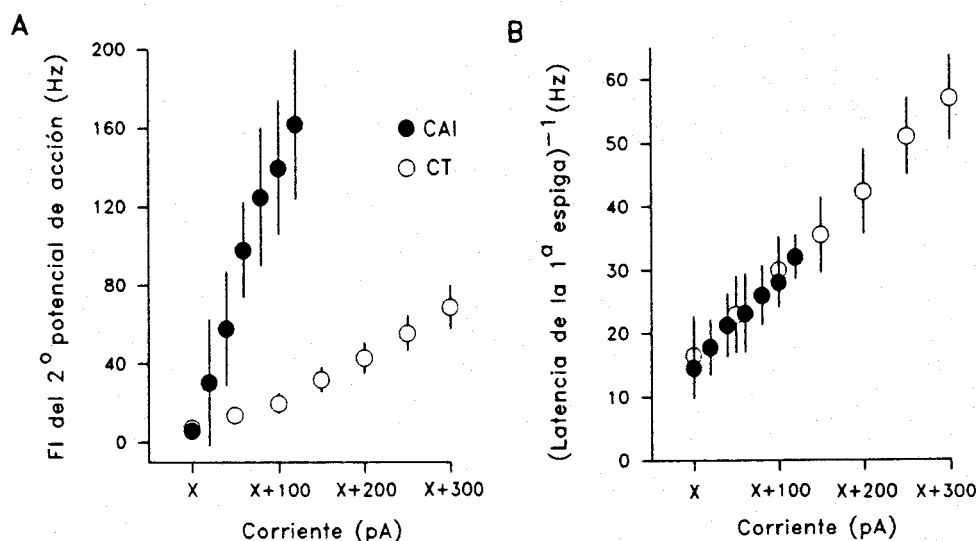
amplio y se pueden establecer dos subgrupos, uno con alta pendiente en la relación FI-I (triángulos blancos y círculos blancos y negros en la figura 25), con un valor de  $1629 \pm 230$  Hz/nA, ( $n=6$ ) y otro de pendiente intermedia (rombos de la figura 25), con un valor de  $852 \pm 278$  Hz/nA, ( $n=6$ ). La evolución media de la relación FI-I para el 2º PDA en células de agrupamiento inicial de alta pendiente (que son las CAI más frecuentes) y células tónicas se muestra en la figura 30A, en la que se puede apreciar una clara diferencia en la pendiente de la relación FI-I para cada grupo. En el caso de las CAI esta relación se muestra en un rango de intensidades más pequeño porque para estimulaciones mayores la FI del 2º PDA en estas células no aumenta más o incluso disminuye, por lo que debemos estar fuera del rango fisiológico de estimulación. En las CT la pendiente de la relación FI-I aumenta según se aumenta la intensidad de estimulación (figura 30A). En contraste con esta diferencia para el 2º PDA si se construye la relación FI-I para el primer PDA de estas mismas



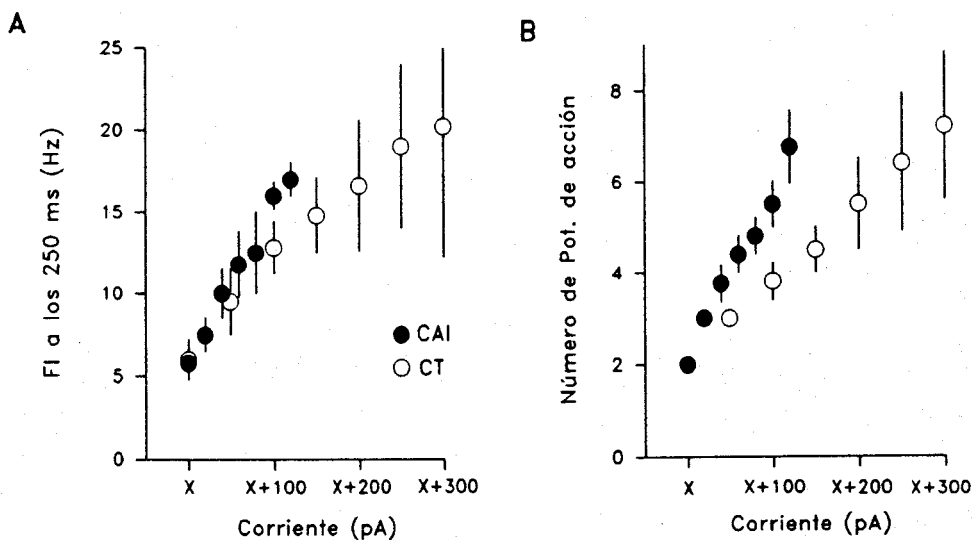
**Figura 29.** Relación frecuencia instantánea-intensidad del pulso, para el 2º potencial de acción en 8 células. De éstas las representadas por triángulos negros y por cuadrados eran tónicas, y el resto eran células de agrupamiento inicial. En abscisas X representa el valor mínimo de intensidad para el que la célula presentó una respuesta con dos espigas, en un pulso de 300 ms.

células (figura 30B), tomando como intervalo previo al primer PDA su latencia de aparición, se observa una pendiente de la relación FI-I prácticamente idéntica para los dos grupos celulares.

La pendiente de la relación FI-I a los 250 ms del inicio del pulso (figura 31A), al igual que ocurría en el 2º PDA, es mayor para las CAI que para las CT en el rango de intensidades en el que se compararon ambos tipos celulares. Las CAI presentaron una pendiente de 92,6 Hz/nA. En las CT, a diferencia de lo que ocurría para el 2º PDA, la pendiente disminuye al aumentar la intensidad de estimulación, observándose dos fases, una 1ª para el rango de estimulación de X a X+100 pA, en la que la pendiente fué de 68,7 Hz/nA y una 2ª fase para el rango de estimulación de X+100 a X+300 pA, en la que la pendiente fué de 36,4 Hz/nA. La pendiente de la relación entre el número de PDA obtenidos en cada pulso y la intensidad del pulso aplicada, es también mayor para las CAI que para las CT (figura 31B). Esto es una consecuencia del hecho de que a lo largo de todo el pulso la FI aumente más en las CAI que en las CT al aumentar la intensidad del estímulo.



**Figura 30.** Relación frecuencia instantánea-intensidad del pulso, para el 1º y 2º potencial de acción en células tónicas y células de agrupamiento inicial. En abscisas X tiene el mismo significado que en la figura 29. A. Relación frecuencia instantánea-intensidad del pulso para el 2º potencial de acción en células de agrupamiento inicial (círculos negros) y células tónicas (círculos blancos). Los puntos expresan las medias y las barras la desviación estándar de 6 células de cada tipo. B. Relación (latencia para el primer potencial de acción)<sup>-1</sup>-intensidad del pulso, para las mismas células representadas en B (los símbolos tienen el mismo significado).



**Figura 31.** Comparación de la respuesta de células de agrupamiento inicial (círculos negros) y células tónicas (círculos blancos) ante el aumento de la intensidad del pulso de estimulación. Los puntos representan la media de las 6 células de cada grupo utilizadas en la figura 30A y B, las barras representan la desviación estándar. En abscisas X tiene el mismo significado que en la figura 29. A. Relación frecuencia instantánea-intensidad, para el PDA más cercano al instante = 250 ms. B. Variación del número total de espigas que se generan en pulsos de 300 ms, al aumentar la intensidad del pulso.

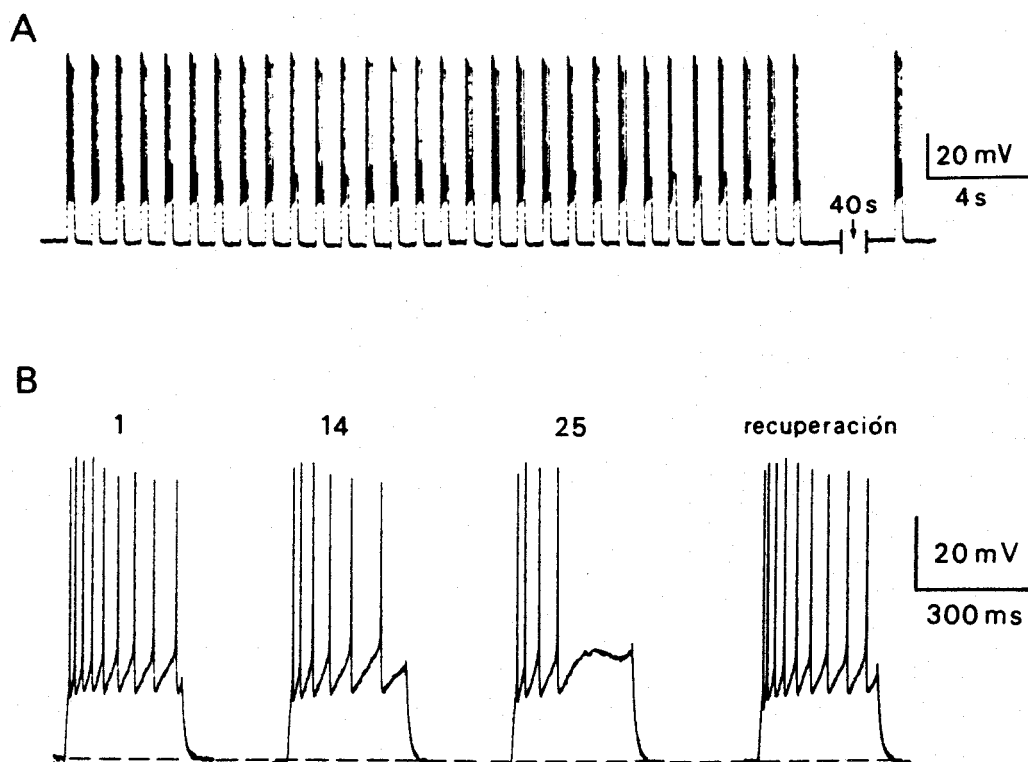
Los resultados presentados en este apartado establecen una clara diferencia en la adaptación a corto plazo de las CAI y CT. Además sugieren que la respuesta subumbral a pulsos de corriente es muy similar en CAI y CT (como ya se comentó en el apartado 2.1), pues la pendiente de la relación FI-I para el primer PDA es prácticamente idéntica en ambos tipos celulares, y por lo tanto es la activación de conductancias que realiza este primer potencial de acción y en menor proporción el resto de PDA, lo que determina el diferente patrón de disparo.

#### 4. Adaptación a largo plazo en la corteza visual

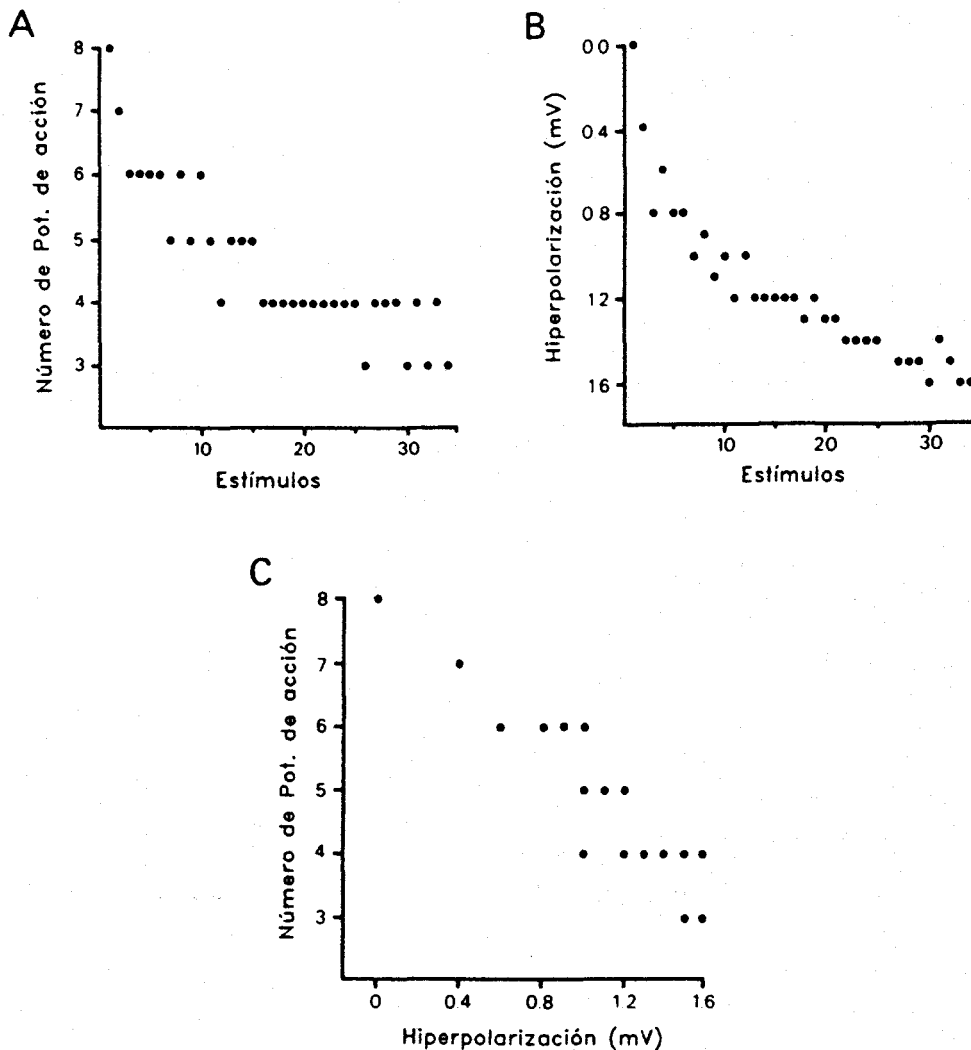
La adaptación a largo plazo, según se definió en el apartado anterior, es la que se origina al aplicar un estímulo constante de forma repetida. Este tipo de adaptación ha sido descrita en otras estructuras del sistema visual (Llinás y López-Barneo, 1988), en las que se ha relacionado con la adaptación encontrada en la respuesta del

sistema visual a los estímulos sensoriales en el animal intacto (Horn y Hill, 1966; Oyster y Takahashi, 1975). Para estudiar esta adaptación el protocolo experimental elegido consistió en un pulso rectangular de corriente de 300 ms repetido hasta que la respuesta originada tenía un número constante de espigas. Se presentan los resultados en células tónicas, si bien en las CAI los resultados fueron similares cualitativamente pero de menor intensidad.

Un ejemplo del protocolo de estimulación se presenta en la figura 32, donde los pulsos se aplicaron a una frecuencia de 1 Hz. Gradualmente el número de PDA en cada pulso disminuyó de 9 al comienzo a 4 ó 5 en los últimos pulsos. Paralelamente a esta adaptación se produjo una hiperpolarización del PDM de 1 mV. A los 43 s de terminar esta estimulación repetitiva el PDM volvió a su valor inicial y la respuesta fué como inicialmente de 9 PDA. La figura 32B muestra 4 barridos representativos



**Figura 32.** Adaptación a largo plazo en una célula tónica con un pulso de 0,75 nA y 300 ms. A. Desarrollo del protocolo experimental con estimulación a una frecuencia de 1 Hz. B. Pulsos 1°, 14°, 25° y de recuperación de la secuencia mostrada en A. La línea discontinua representa el potencial de membrana de reposo (-61 mV).

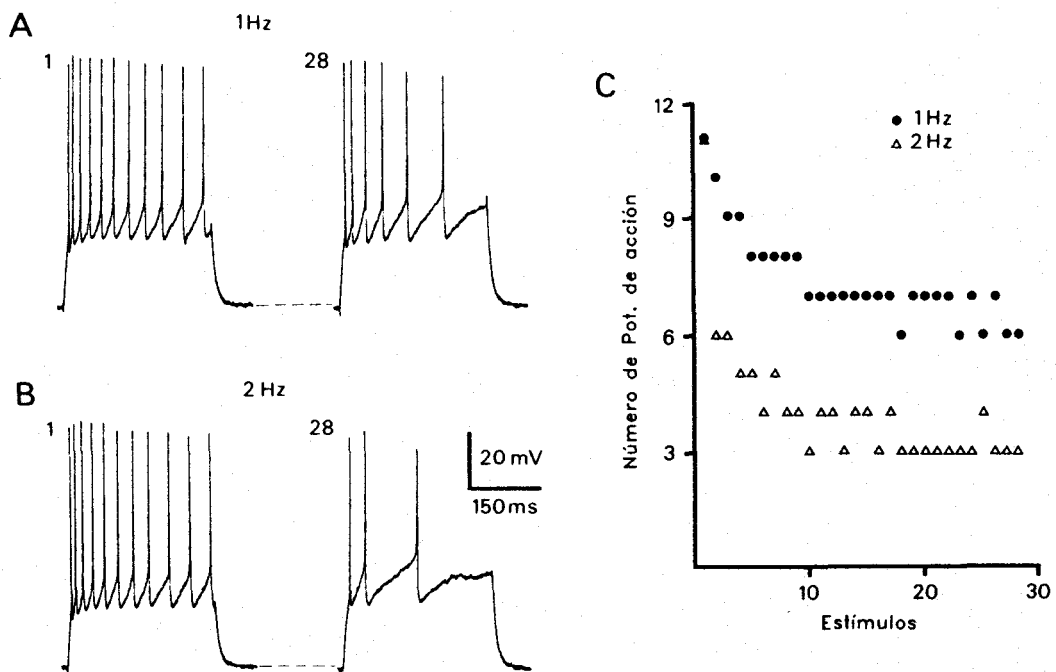


**Figura 33.** Relación entre la adaptación a largo plazo y la hiperpolarización que se produce en una célula tónica. El estímulo fué de 300 ms y 0,5 nA, a una frecuencia de 1 Hz. En A se muestra la relación entre el número de estímulos aplicados y el número de espigas que se obtienen en cada pulso. B. Relación entre el número de estímulos y la hiperpolarización alcanzada. C. Relación entre el número de espigas en cada pulso y la hiperpolarización alcanzada.

del protocolo desarrollado en la parte A de la figura. Se aprecia que la duración del intervalo entre los PDA, depende de la pendiente de la fase de subida previa a alcanzar el umbral del 2º PDA de cada intervalo. Cuanto menor sea esta pendiente, menor será la FI y mayor la adaptación. Se puede observar asimismo el fenómeno denominado acomodación, consistente en que durante esta pendiente parte de los canales de Na<sup>+</sup> se activan e inactivan antes de producirse el PDA, con lo que el umbral ocurre a potenciales más despolarizados y la amplitud de los PDA es menor,



lo que se observa claramente en el registro 14° de la figura 32B. En el barrido 25°, se aprecia que después de la 4ª espiga, la acomodación que se produce en la siguiente fase de subida es tan intensa, que la corriente hiperpolarizante llega a ser de la misma intensidad que la de  $\text{Na}^+$  antes de alcanzar el umbral, con lo que el PDA no se produce.



**Figura 34.** Adaptación a largo plazo provocada en una célula tónica por un pulso de 300 ms y 0,7 nA, a dos frecuencias de estimulación distintas. En A se muestra el pulso inicial y el 28°, de una serie con una frecuencia de estimulación de 1 Hz. B. Pulsos 1° y 28° de una serie con una frecuencia de 2 Hz. C. Relación entre el número de espigas generadas en cada pulso y el número de estímulos aplicados, para las dos frecuencias presentadas.

La evolución temporal de esta adaptación a largo plazo se muestra en la figura 33A en otra célula. Se observó una evolución similar para la hiperpolarización que se alcanzó con los estímulos repetidos (figura 33B), siendo la relación entre la adaptación y la hiperpolarización que ocurre bastante lineal (figura 33C), lo que implica que son dos fenómenos paralelos, si bien la hiperpolarización no es la única causa de la adaptación, pues cuando se hiperpolarizó la célula con corriente continua, la disminución del número de PDA que ocurrió fué menor que cuando se alcanzaba la misma hiperpolarización mediante la aplicación de estímulos repetidos.

La frecuencia de estimulación condicionó la evolución temporal de la adaptación. Un aumento de la frecuencia de estimulación, como el mostrado en la figura 34, hizo que el mismo estímulo indujese una mayor adaptación. Los pulsos de la figura 34B muestran, que la mayor adaptación se debe a una disminución de la pendiente de subida del potencial de membrana hacia el umbral de disparo, según se comentó anteriormente y que provoca que en el pulso 28° de la serie de estimulación a 2 Hz no se alcance el umbral de disparo tras el tercer potencial de acción. La evolución temporal de la adaptación a largo plazo para las dos frecuencias de estimulación se muestra en la figura 34C.

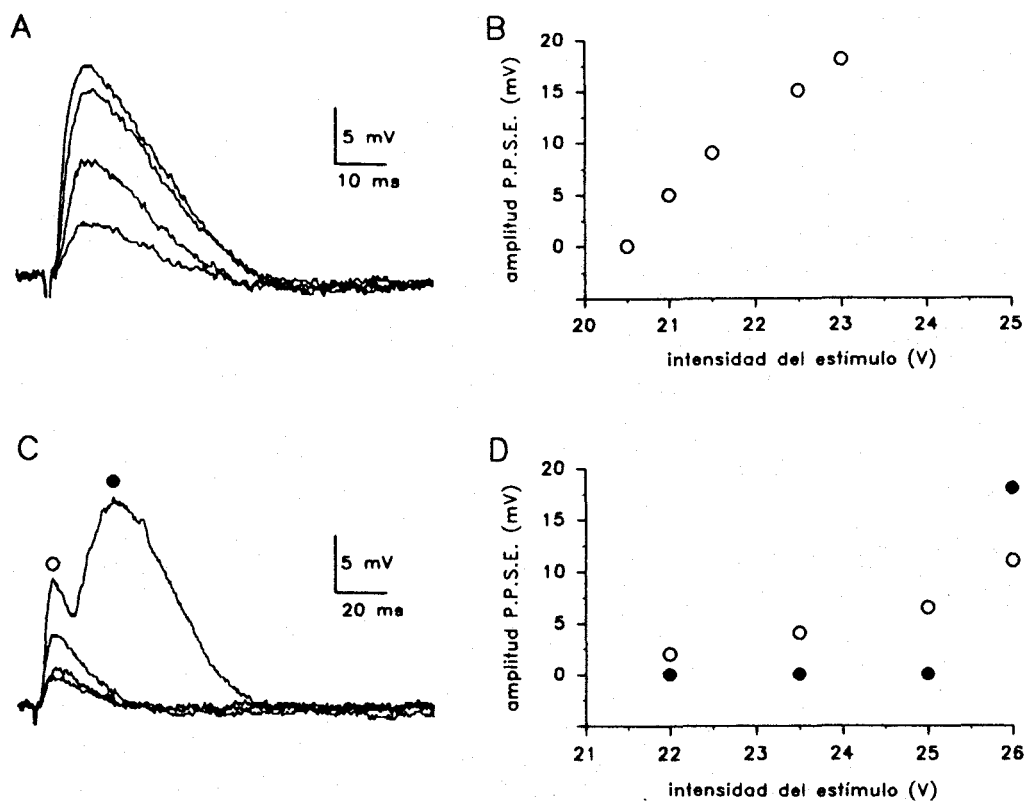
En resumen, en neuronas del cortex visual del cobaya existen dos tipos celulares atendiendo a su patrón de disparo que si bien pertenecen al grupo denominado en la literatura como "neuronas de disparo regular" (Connors y Gutnick, 1990), se pueden diferenciar de forma clara atendiendo a su "adaptación a corto plazo", a la morfología del 2° PDA originado en cada pulso y a la relación frecuencia instantánea-intensidad del pulso, para el 2° PDA. En ambos tipos celulares existe otro tipo de adaptación denominada "a largo plazo" que se desarrolla cuando se estimula a las neuronas de forma repetitiva, tiene un curso temporal paralelo a la hiperpolarización que ocurre en el potencial de membrana durante la misma estimulación y depende de la frecuencia de la estimulación.

## B) POTENCIALES POSTSINAPTICOS EN CELULAS HIPOCAMPICAS, CARACTERISTICAS GENERALES Y MODIFICACIONES POR LA APLICACION DE NMDA Y LA DESPOLARIZACION

Al igual que el patrón de disparo de los PDA que una neurona genera durante una despolarización, provocada por un pulso rectangular de corriente intracelular, depende de los tipos de canales dependientes de voltaje que la célula exprese en la membrana celular, la respuesta sináptica ante un mismo estímulo también puede modificarse en el tiempo dependiendo del tipo y estado funcional de los diferentes canales dependientes de ligando que exprese la célula en la región sináptica. A esta propiedad de modificación de la respuesta sináptica en el tiempo se le llama plasticidad sináptica (ver Aoki y Siekevitz, 1988; Rauschecker, 1991). Entre los receptores que participan en los fenómenos de plasticidad sináptica, se encuentra un subtipo de los activados por el glutamato, los que se activan selectivamente con el N-metil-D-aspartato (NMDA), que se denominan receptores NMDA. La activación de estos receptores es necesaria para la generación de la potenciación de larga duración (LTP) que ocurre en la sinapsis que se establece entre la colateral de Schaffer y las células CA1 del hipocampo (Schwartzkroin y Wester, 1975). La LTP se consigue cuando se estimulan las fibras aferentes a una alta frecuencia (típicamente 60-100 Hz). Sin embargo, la aplicación directa de NMDA a una sección donde se encuentre esta relación sináptica resulta sólo en una potenciación transitoria (Collingridge, Kehl y McLennan, 1983; Kauer, Malenka y Nicoll, 1988). En este apartado se estudian las características funcionales y farmacológicas de la respuesta sináptica obtenida en células CA1 del hipocampo, al estimular extracelularmente en el *stratum radiatum* (SR), y la modificación de esta respuesta sináptica por la aplicación de NMDA y la despolarización.

### 1. Componentes de la aferencia sináptica a células CA1 del hipocampo, al estimular en el stratum radiatum

Se estudiaron las características generales de la respuesta sináptica que se genera en las células CA1 del hipocampo, cuando se realizaba una estimulación extracelular en el SR, con lo que se estimula la colateral de Schaffer y otras aferencias que a

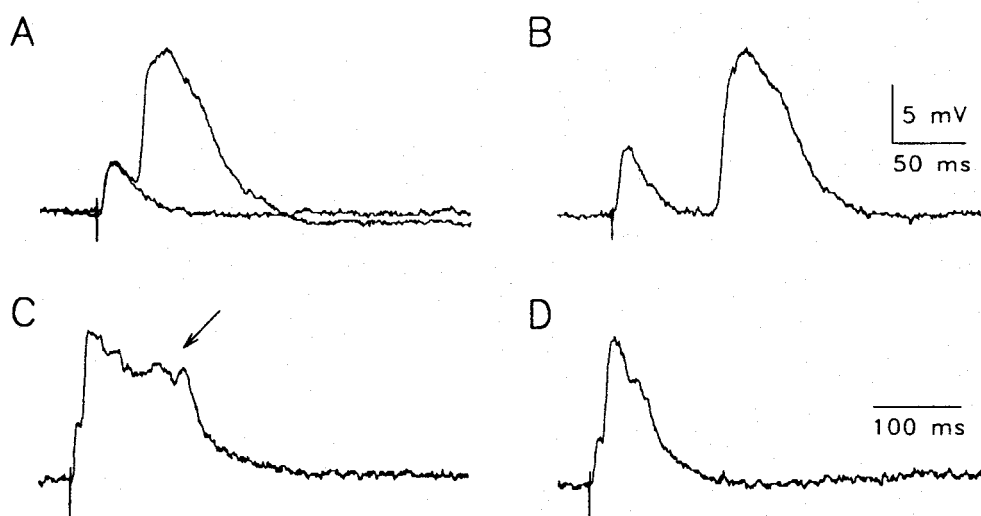


**Figura 35.** Tipos de respuestas postsinápticas obtenidas en células CA1 del hipocampo al estimular en el *stratum radiatum*. A. Componente monosináptico de la respuesta, que muestra una graduación de la amplitud en relación a la intensidad de estimulación. B. Relación entre los picos máximos de la respuesta obtenida y la intensidad del pulso extracelular que la originó. La célula mostraba un potencial de membrana de  $-56$  mV, pero los registros están efectuados a  $-70$  mV para evitar la aparición de potenciales de acción. C. Aparición en otra célula del componente polisináptico (círculo negro) con un umbral mayor al del monosináptico (círculo blanco). D. Relación entre el pico máximo del componente monosináptico (círculos blancos) y polisináptico (círculos negros) con la intensidad de estímulo que los originó. En esta 2ª célula el PDM era de  $-62$  mV, realizándose el registro a  $-76$  mV.

través de la fimbria llegan al área CA1. En nuestras condiciones experimentales las neuronas del área CA1 mostraron un PDM de  $-62,5 \pm 3,5$  mV (media  $\pm$  desviación estándar,  $n = 60$ ), una amplitud de potencial de acción medida desde el PDM de  $88,6 \pm 5,9$  mV y una resistencia de entrada de  $42,1 \pm 9,2$  M $\Omega$ . En todas la células se obtuvo respuesta sináptica al estimular el SR, consistente en un potencial postsináptico excitador (PPSE) seguido en la mayoría de las ocasiones de un potencial postsináptico inhibitor (PPSI) de pequeña amplitud. Esta respuesta sináptica no se modificó durante el período de registro cuando la estimulación se

mantuvo a una frecuencia de 0,1 Hz. En el 57 % de los casos el PPSE consistió en una respuesta graduada y con un retardo sináptico de  $2,7 \pm 1,2$  ms (figura 35A y B) lo que sugiere que este componente es monosináptico. En el 43 % restante de los casos, además de este componente inicial se pudo obtener otro componente en la respuesta excitatoria, generalmente con un umbral mayor que el componente monosináptico y que no aparecía de forma graduada sino más bien como un fenómeno todo o nada (figura 35C y D). Este segundo componente mostró una serie de características, que indican un origen polisináptico:

i) la aparición de forma todo o nada (figura 35C y D), lo que se puede explicar si para que se genere este componente, es necesario que en otra(s) célula previa se produzca un potencial de acción.



**Figura 36.** Refractoriedad y variabilidad de latencia y duración del 2º componente de la respuesta sináptica obtenida en neuronas del área CA1, al realizar estimulaciones repetidas en el *stratum radiatum*. A. Estimulando a una frecuencia de 1 Hz, el 2º estímulo no induce el componente polisináptico (trazos superpuestos). B. Una tercera estimulación a 1 Hz genera un 2º componente con una latencia mayor que en la 1ª estimulación. C y D. Desaparición de algunos picos del 2º componente (indicados por una flecha en C) en otra célula al realizar la estimulación a una frecuencia de 1 Hz.

ii) la latencia de aparición tras la estimulación fué muy grande oscilando entre 16 y 74 ms.

iii) esta latencia tuvo una gran variabilidad para cada célula (ver figura 36), incluso con la misma intensidad de estimulación. Al aumentar la intensidad de estimulación la latencia del segundo componente disminuyó tendiendo a fundirse

ambos componentes. Al aumentar la intensidad del estímulo la latencia, además de disminuir, se hizo menos variable.

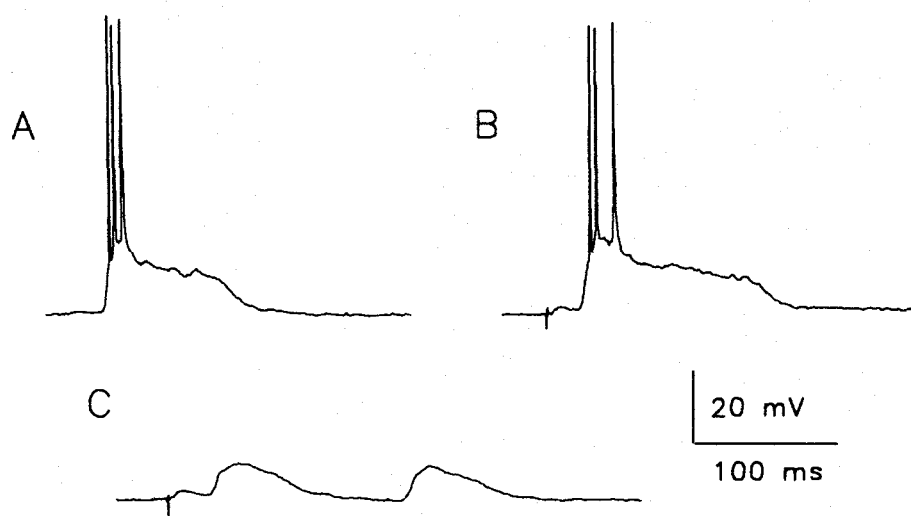
iv) la estimulación a una frecuencia de 1 Hz o superior, determinó una tendencia a aumentar la latencia (ver figura 36A y B). Es de destacar que aún con latencias distintas la amplitud del este segundo componente se mantuvo constante.

v) a esta frecuencia de 1 Hz en algunas estimulaciones no aparecía el segundo componente, es decir aparecían intervalos refractarios (figura 36A, trazos superpuestos)

vi) cuando el 2º componente mostraba varios picos, su duración se vió reducida si los intervalos entre las estimulaciones eran breves (figura 36C y D).

vii) algunas células (n=8) presentaron en ocasiones este segundo componente espontáneamente, sin aplicar ningún estímulo (figura 37A), cosa que no ocurrió nunca con el primer componente.

viii) en algunas células (n=3) la estimulación provocó la aparición repetida del componente polisináptico (figura 37C).

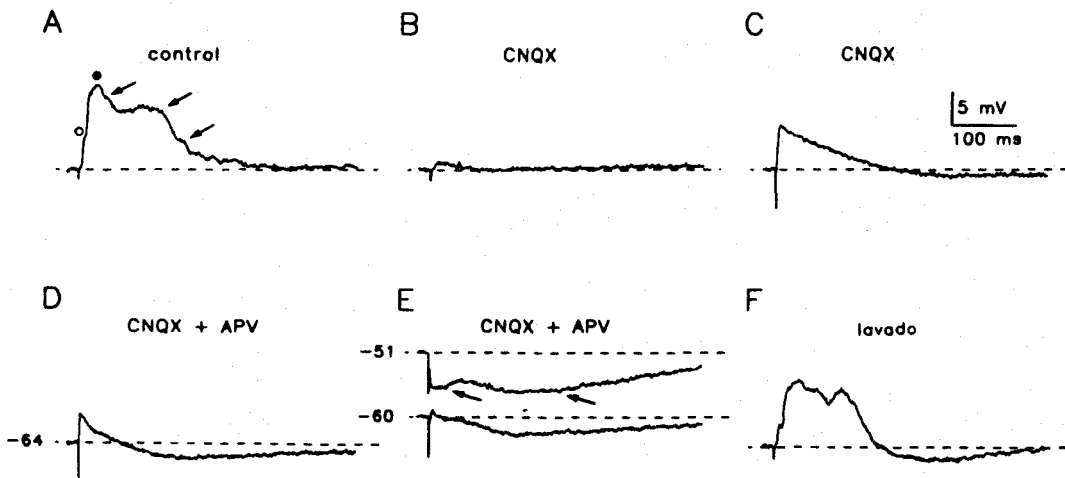


**Figura 37.** Características del 2º componente de la respuesta sináptica obtenida en neuronas CA1 del hipocampo. A. Aparición espontánea de un potencial postsináptico excitatorio que como se puede observar en B, es muy similar al 2º componente de la respuesta a la estimulación. C. Aparición repetida del 2º componente tras una única estimulación en el *stratum radiatum* en otra célula.

## 2. Tipos de receptores glutamatergicos responsables de los dos componentes de la aferencia sináptica a células del área CA1

Puesto que en las células de la región CA1 se han descrito tanto receptores NMDA como no-NMDA (Collingridge, Herron y Lester, 1988; Andreasen, Lambert

y Jensen, 1989), se analizó la participación de estos dos tipos de receptores glutamatergicos en los componentes de la respuesta sináptica. En la figura 38A se muestra una respuesta sináptica con los dos componentes (círculos blanco y negro), advirtiéndose varios picos en el componente polisináptico (indicados por flechas en la figura), que presenta una larga duración. La adición de 6-ciano-7-nitroquinoxalina-

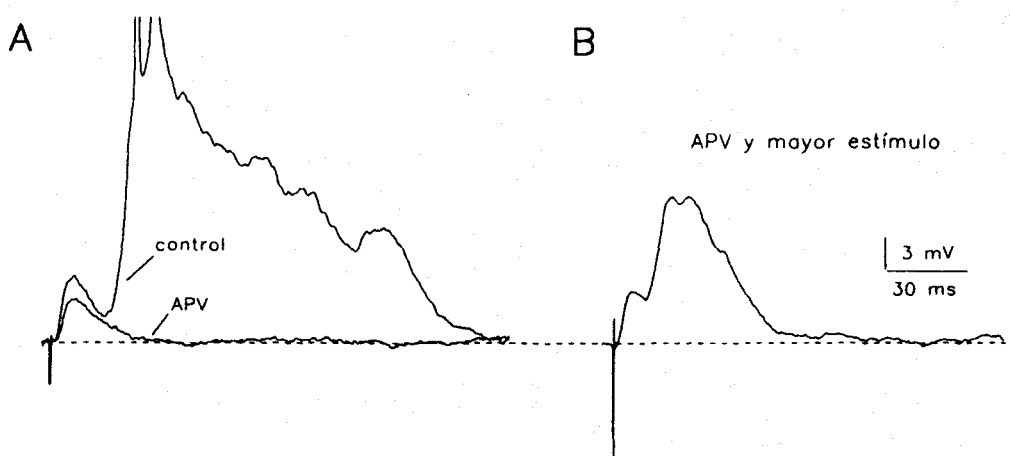


**Figura 38.** Análisis farmacológico de los potenciales postsinápticos obtenidos en las neuronas del área CA1. En una célula que presentaba ambos componentes (A) (círculo blanco = componente monosináptico, círculo negro = componente polisináptico), se añadió CNQX  $10 \mu\text{M}$ , obteniéndose a los 10 min una casi total abolición de la respuesta (B). El aumento de la intensidad de estimulación (C) consigue no obstante un aumento en la respuesta sináptica, que es reducida tras la adición de APV  $100 \mu\text{M}$  (D). En E se muestra que la respuesta residual en D, era debida a un potencial postsináptico inhibitorio parcialmente revertido. F. El patrón inicial de respuesta se recupera tras 30 min de lavado.

2,3-diona (CNQX), un bloqueante de los receptores glutamatergicos tipo no-NMDA, origina la abolición del componente polisináptico y una disminución drástica del monosináptico (figura 38B), no obstante si se aumenta la intensidad del estímulo aún se puede obtener una clara respuesta despolarizante resistente al CNQX (figura 38C). La adición posterior a la sección de D,L-2-amino-5-fosfonovalerato (APV), un bloqueante selectivo de los receptores NMDA, resultó en una clara disminución de la respuesta despolarizante (figura 38D) y la aparición de un componente hiperpolarizante. La respuesta sináptica que permanece en presencia de CNQX y APV, se observa despolarizando la célula (figura 38E), que son los dos componentes de un potencial postsináptico inhibitorio mediados por el neurotransmisor ácido gamma-aminobutírico, descritos previamente en estas células (Alger y Nicoll, 1982; Newberry y Nicoll, 1984). Tras 30 min de lavado del CNQX y APV, la respuesta se

recuperó casi totalmente (figura 38F). Resultados similares se encontraron en 8 células estudiadas si bien la aparición de PPSI no fué constante.

En otro tipo de experimentos el protocolo experimental consistió en el bloqueo inicial del receptor NMDA con APV, lo que originó la desaparición del componente polisináptico y una disminución de la amplitud del componente monosináptico (figura 39A). No obstante, en algunas células, al aumentar la intensidad de estimulación se obtuvo de nuevo el componente polisináptico, aunque de menor amplitud (figura 39B).



**Figura 39.** Efecto del bloqueo de los receptores NMDA en la respuesta sináptica de las neuronas del área CA1 del hipocampo. A. En una respuesta sináptica con ambos componentes la adición de APV 20  $\mu$ M a la solución origina la desaparición del componente polisináptico y la disminución en amplitud del monosináptico (los potenciales de acción han sido truncados). B. El aumento en la intensidad de estimulación permite la obtención de nuevo del componente polisináptico, ahora de menor amplitud.

### 3. Efecto de N-metil-D-aspartato en la respuesta postsináptica obtenida en células CA1

La participación de los receptores NMDA ha sido demostrada en fenómenos de plasticidad sináptica como son el "kindling" (Gean, Shinnick-Gallager y Anderson, 1989; Mody y Heinemann, 1987) o la potenciación a largo plazo (Artola y Singer, 1990; Harris, Gangong y Cotman, 1984). Como se ha mostrado en el apartado anterior la participación de los receptores NMDA en los dos componentes de la



respuesta sináptica que se obtuvo en la región CA1 del hipocampo fué clara, por lo que se estudió el efecto que la aplicación de NMDA podía tener en esta respuesta sináptica. El NMDA provocó, en general, una despolarización seguida de una hiperpolarización, tras la cuál se observó un aumento transitorio de la amplitud del primer componente de la respuesta sináptica y la aparición del componente polisínáptico en células que previamente no lo mostraban.

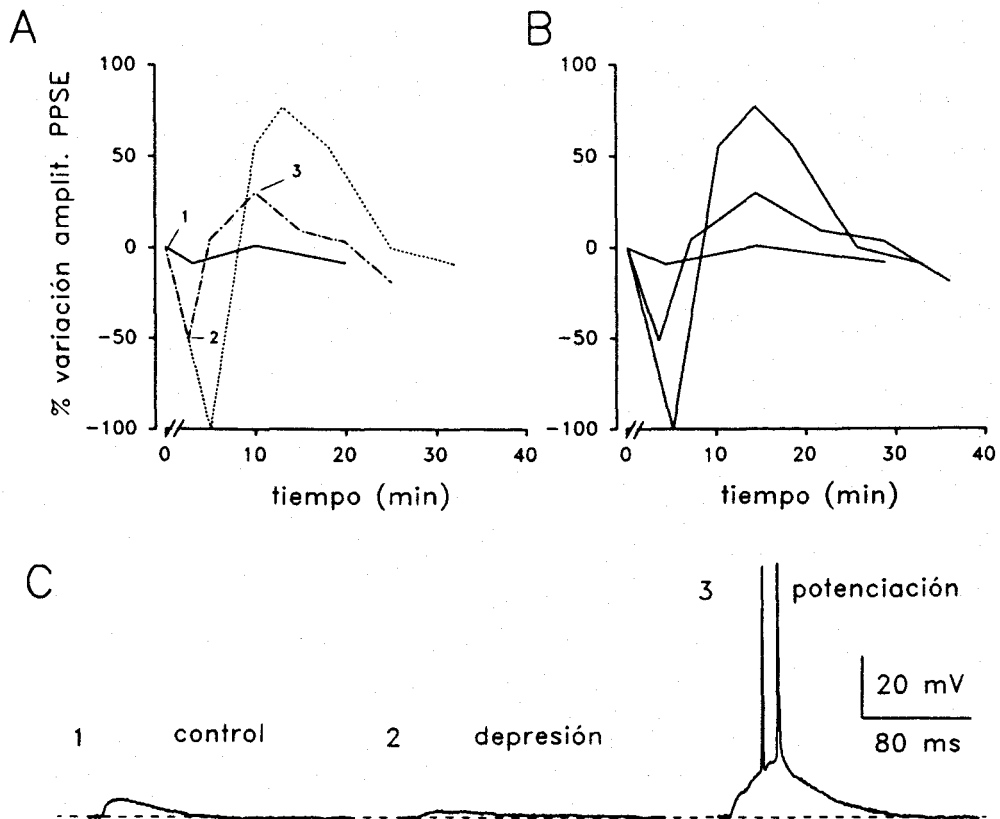
### **3.1. Evolución del potencial de membrana durante la aplicación de N-metil-D-aspartato**

Para estudiar el efecto de NMDA se comenzó estudiando la acción de una solución 100  $\mu\text{M}$ . Con esta concentración, el efecto de NMDA fué difícil de controlar, pues si la cantidad de solución que se hacía pasar era pequeña ( $\approx 1$  ml), se lavaba de la cámara antes de penetrar en la sección de cerebro, y con cantidades algo mayores las células mostraron una gran despolarización y muerte celular, o en el caso de recuperar el PDM, la respuesta quedaba deprimida, probablemente por muerte de las células aferentes en CA3. Debido a las dificultades anteriores se estudió el efecto de 6 ml de una solución de NMDA a una concentración de 20  $\mu\text{M}$ . Con este protocolo el PDM evolucionó de distintas formas, probablemente dependiendo de la profundidad a la que se encontrase la célula en la sección. De 9 casos, en uno ocurrió una hiperpolarización de 6 mV, en otro no hubo modificación y en los 7 restantes ocurrió una despolarización que osciló entre 4 y 40 mV ( $22 \pm 11$  mV). La 1ª fase de despolarización duró entre 93 y 147 s ( $114 \pm 21$  s,  $n=6$ ), tras la cuál comenzó a repolarizarse (en algunas ocasiones se ayudó a esta hiperpolarización inyectando corriente continua negativa), para luego hiperpolarizarse con respecto al PDM previo entre 2 y 10 mV ( $5,6 \pm 3,2$ ,  $n=6$ ). Durante la despolarización se observó un incremento de la actividad sináptica, luego se produjeron brotes de 3 a 5 espigas, tras lo cuál el disparo se hizo tónico y más tarde desapareció probablemente por inactivación de los canales de  $\text{Na}^+$ .

También se estudió el efecto de NMDA a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  ( $n = 3$ ) para comparar su efecto con los resultados obtenidos con NMDA a una concentración de 20  $\mu\text{M}$ . A la concentración de 10  $\mu\text{M}$  el NMDA no produjo ninguna variación en el PDM, aunque en un caso la aferencia sináptica provocó la aparición de algunos PDA. No obstante, como se comenta más adelante, sí produjo la potenciación del componente monosínáptico y la aparición del polisínáptico.

### 3.2. Variación de la amplitud del componente monosináptico tras el tratamiento con N-metil-D-aspartato

La aplicación de NMDA a la sección de hipocampo resultó en una potenciación transitoria del componente monosináptico obtenido en las neuronas del área CA1. Este efecto ha sido descrito en la literatura midiendo los potenciales de campo obtenidos en el área CA1 al estimular el SR (Collingridge et al., 1983; Kauer et al.,

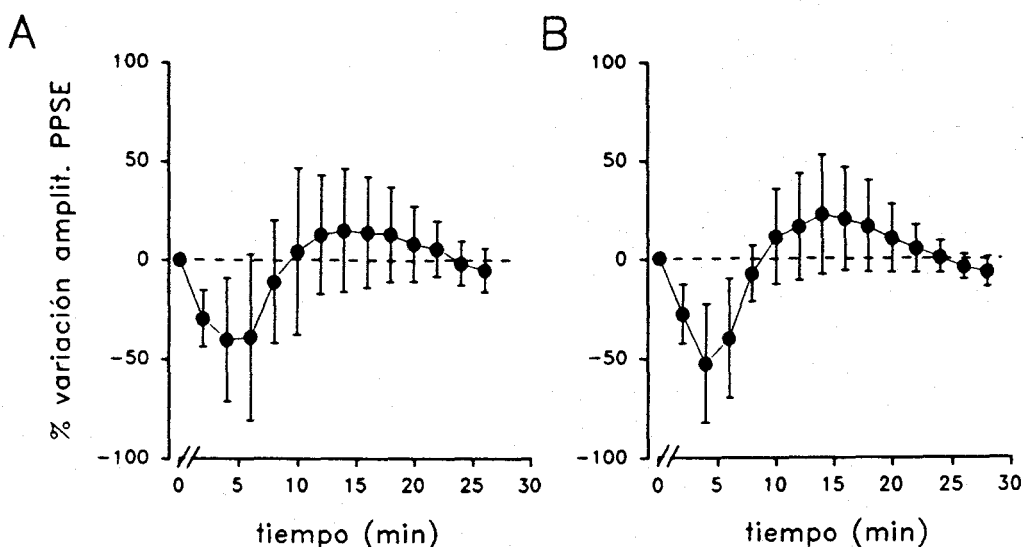


**Figura 40.** Evolución temporal de la amplitud del componente monosináptico tras la aplicación de NMDA. En A se muestra la evolución en tres células con distintos grados de depresión y potenciación. En B se muestra esta misma evolución normalizada en abcisas con respecto al instante en que se alcanza el máximo de la potenciación. La ruptura en el eje de abcisas indica la fase de despolarización-hiperpolarización que se produce durante la fase de aplicación y lavado del NMDA. Ver texto para mayor detalle. C. Registros de la célula representada por trazo discontinuo en A, en las fase de control (1), depresión (2) y potenciación (3).

1988). Las variaciones en la amplitud del componente monosináptico fueron medidas una vez que el potencial de membrana había recuperado su valor original según se ha indicado anteriormente y consistieron según se aprecia en la figura 40 en una inicial depresión que duró  $9,6 \pm 5,5$  min ( $n = 9$ ), seguida de una potenciación que duró

$14 \pm 8,8$  min ( $n = 9$ ) y tras la cual ocurre una nueva depresión. En tres células no se observó depresión tras la potenciación, probablemente porque las células se perdieron antes de que la depresión ocurriera.

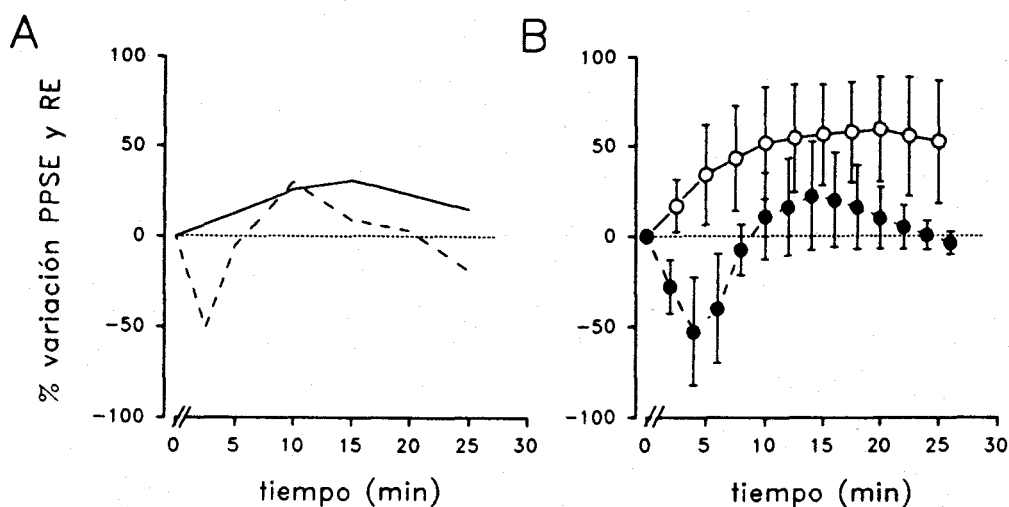
Como se puede observar en la figura 40A, la duración de estas oscilaciones en la amplitud del PPSE, es muy diferente para distintas células. No obstante se puede apreciar como una depresión inicial más duradera y con un pico por tanto más retrasado se corresponde con una potenciación asimismo más duradera y con un pico también retrasado. Debido a esto en la figura 40B se han normalizado todas las duraciones con respecto a la media del tiempo en el que se alcanzó el máximo de la potenciación del 1<sup>er</sup> componente ( $14,4$  min, D.E. =  $4,5$  min,  $n = 9$ ), es decir, en cada curva se ha multiplicado su evolución temporal por el factor necesario para que coincidiera su máximo con la media antes mencionada. Se puede observar como esta normalización provoca también una normalización en los picos de las depresiones, de lo que se deduce que efectivamente la duración de la potenciación depende de la duración de la depresión previa o bien que ambas duraciones dependen de un factor común. También se puede apreciar que una mayor depresión suele originar una mayor potenciación, aunque en este sentido se observaron grandes diferencias. En la figura 40C se muestran tres registros del componente monosináptico de la célula



**Figura 41.** Evolución temporal media de la amplitud del componente monosináptico tras la aplicación de NMDA. A. Evolución temporal obtenida a partir de los valores de 6 células. B. Evolución de las mismas 6 células con los valores de abcisas normalizados como en la figura 40B. Los puntos indican la media y las barras la desviación estándar. La ruptura en el eje de abcisas indica la fase de despolarización-hiperpolarización, que se produce durante la aplicación y lavado del N-metil-D-aspartato.

indicada por trazo discontinuo en la figura 40A en la fase inicial (figura C1), durante la depresión (figura C2) y durante la potenciación (figura C3). En esta última fase además se generó el componente polisináptico (flecha) que no se obtenía antes de la aplicación de NMDA.

En la figura 41A, se muestra la evolución temporal de la amplitud del PPSE, tomando el valor medio de 6 células obtenidos cada 2 min. Según esta gráfica la depresión duraría 9,6 min y la potenciación 14 min. El máximo de la potenciación se alcanzaría a los 14,2 min lo que está muy cerca al valor calculado numéricamente a partir de cada uno de los máximos (14,4 min), pero debido a la distinta evolución temporal de cada célula el máximo de la depresión y potenciación alcanzados en esta gráfica (40,5 y 14,3 %, respectivamente), quedan muy lejos de las medias calculadas con los valores reales (63 y 24 %, respectivamente). Unos valores más aproximados a los reales se obtienen a partir de la gráfica representada en la figura 41B, que se halló como la 41A pero con la duración normalizada con respecto al tiempo en el que se alcanza el máximo de potenciación. Esta curva muestra una depresión máxima del 52,8 % y una potenciación máxima del 21,4 % y sería pues una representación aproximada de la evolución temporal media de la amplitud del componente monosináptico tras la aplicación de NMDA a la sección.



**Figura 42.** Variación de la resistencia de entrada tras la aplicación de NMDA. A. Comparación de la variación de la amplitud del potencial monosináptico excitatorio (línea de puntos) registrado en una célula tras la aplicación de NMDA ( $20 \mu\text{M}$ ) y la modificación de la resistencia de entrada (línea continua) durante el mismo período. B. Gráfica de evolución de ambas variables normalizadas en el tiempo como en la figura 40B, obtenida a partir de los valores obtenidos de las mismas 6 células. Los puntos y las barras indican la media y la desviación estándar respectivamente.

### **3.3. Variación de la resistencia de entrada de la membrana tras la aplicación de N-metil-D-aspartato**

Un factor importante durante la variación de la amplitud de los PPSE es la resistencia eléctrica de entrada de la membrana (RE): si ésta aumenta, el PPSE que se origine será mayor por dos razones, por una parte porque la misma intensidad de corriente a través de la membrana producirá un cambio mayor en el PDM. Por otra parte, lo que ocurra en las dendritas se transmitirá al soma con menor decremento electrotonico. Es decir, se obtendría una mayor amplitud del PPSE, pero no por una potenciación en la transmisión sináptica propiamente dicha (mayor liberación de neurotransmisores, mayor número de receptores o mayor conductividad de los canales iónicos asociados a éstos) sino por un cambio en las propiedades pasivas de la membrana postsináptica. En la figura 42A, se muestra simultáneamente en una célula la variación de la amplitud del PPSE (línea discontinua) y de la RE (línea continua), la cual tras la recuperación del PDM no muestra ninguna disminución, sino todo lo contrario. Esta diferente evolución inicial de ambas variables se observó siempre, por lo que la depresión sináptica inicial del PPSE debe ser en realidad aún mayor de lo que se registra, pues parte de la depresión está compensada por el aumento en la RE, mientras que la potenciación sináptica debe ser en realidad menor pues en parte se debe al aumento de la RE.

En la figura 42B se muestra la evolución media de ambas variables. En ella se aprecia como el máximo de la potenciación se alcanza 6 min antes que el máximo del aumento de la RE, es decir que la potenciación comienza a disminuir aún cuando la RE sigue aumentando. De todo lo anterior se deduce que ni la depresión ni la potenciación observadas tras la aplicación de NMDA tienen su causa en las variaciones que ocurren en la resistencia de entrada de la membrana postsináptica.

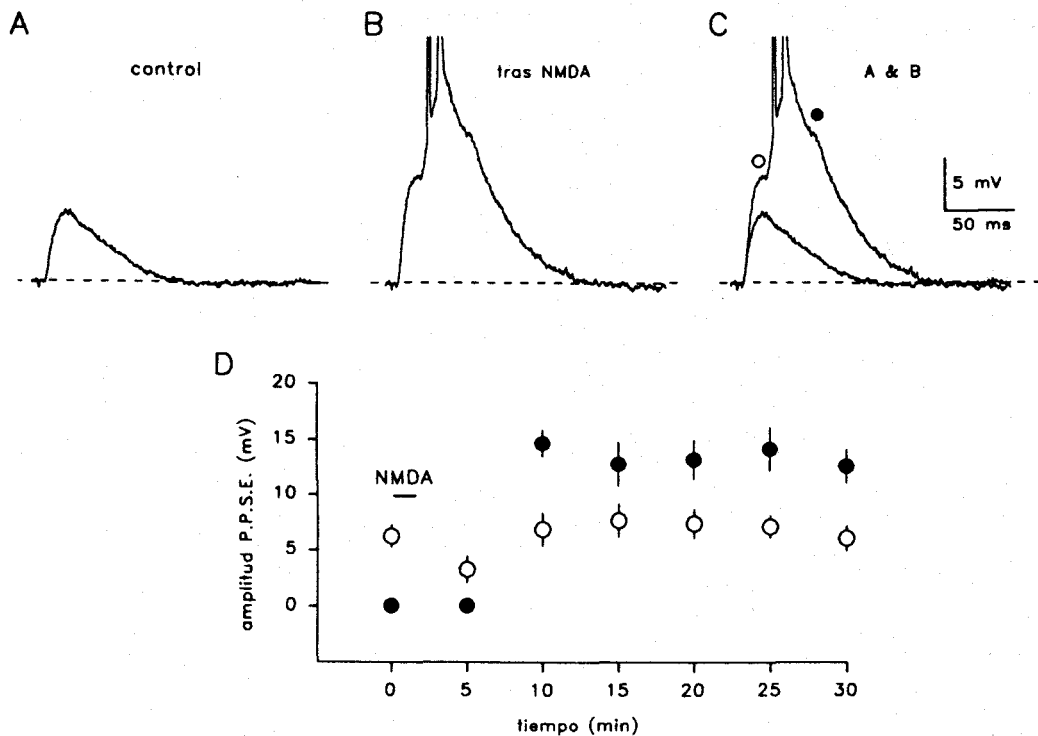
### **3.4. Aparición del componente polisínáptico tras la exposición a N-metil-D-aspartato**

El efecto más sobresaliente tras la aplicación transitoria de NMDA (tanto 20 como 10  $\mu$ M), fué la obtención del componente polisínáptico en células que inicialmente sólo mostraban el componente monosínáptico. La figura 43A muestra una célula con la respuesta monosínáptica, en la que se aplicó NMDA a una



concentración de 20  $\mu\text{M}$  durante 80 s, lo que indujo una despolarización de 20 mV seguida de una hiperpolarización de 4 mV, todo lo cuál duró aproximadamente 5 min. Cuatro minutos después de haber recuperado el PDM inicial apareció un nuevo componente (figura 43B y C), que como se muestra más adelante tiene las características del componente polisináptico descrito anteriormente para algunas células que no habían sido sometidas a ningún tratamiento farmacológico, y que no se obtuvo antes de la aplicación de NMDA a ninguna intensidad de estimulación en esta célula. En la figura 43C se puede apreciar como además de la aparición de este nuevo componente (círculo negro), existe también un aumento de la amplitud del componente monosináptico (círculo blanco).

La latencia de aparición del componente polisináptico tras la normalización del PDM, estuvo entre 5 y 30 min, con una media de  $13,2 \pm 9$  min ( $n = 8$ ). Esta



**Figura 43.** Modificación en la respuesta sináptica producida por la aplicación de NMDA. En una célula con una respuesta sináptica consistente en un componente monosináptico (A), tras la aplicación de NMDA 20  $\mu\text{M}$  se induce la aparición del componente polisináptico (círculo negro) y la potenciación del monosináptico (círculo blanco) (B). En C se superponen ambos trazos para comparar las respuestas antes y después del tratamiento con NMDA. En D se muestra la evolución temporal de los cambios obtenidos tras NMDA. La duración de la aplicación de NMDA (80 s) se indica por la barra horizontal. Cada símbolo representa la media de la amplitud obtenida en 4 a 7 respuestas. Las barras verticales indican la desviación estándar. Los potenciales de acción han sido truncados.

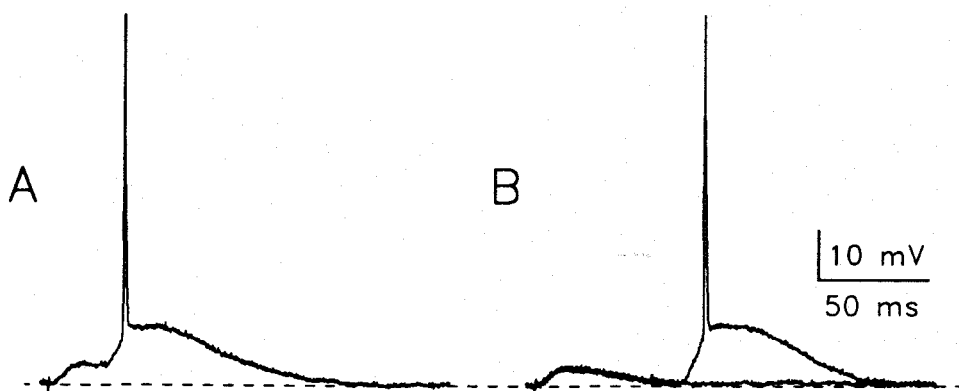
media es algo menor que el tiempo que tarda en alcanzarse el máximo de potenciación del componente monosináptico (14,4 min). A diferencia de lo que ocurre con el componente monosináptico, el componente polisináptico no disminuye en amplitud con el tiempo (figura 43D). No obstante, tras 40-50 min de haberse obtenido el componente polisináptico en algunas estimulaciones no aparecía este componente, pero cuando lo hacía mantenía su amplitud. En tres células 10 min antes y durante la exposición de la sección a NMDA 20  $\mu$ M, se añadió a la solución externa 50  $\mu$ M APV. El resultado fué que NMDA no produjo despolarización en la célula registrada y no se observó potenciación del componente monosináptico ni la aparición del componente polisináptico tras estas exposiciones.

Este 2º componente que apareció tras la aplicación de NMDA presentó las características del componente polisináptico obtenido sin ningún tratamiento farmacológico:

i) fué una respuesta todo o nada. Como se puede observar en las figuras 44 y 45, el 2º componente puede no generarse en algunas ocasiones, pero cuando lo hace su amplitud varía poco.

ii) la latencia de aparición es muy grande, llegando a ser de 100 ms (figuras 44 y 45).

iii) la latencia de aparición fué variable para una misma célula (figuras 44 y 45).



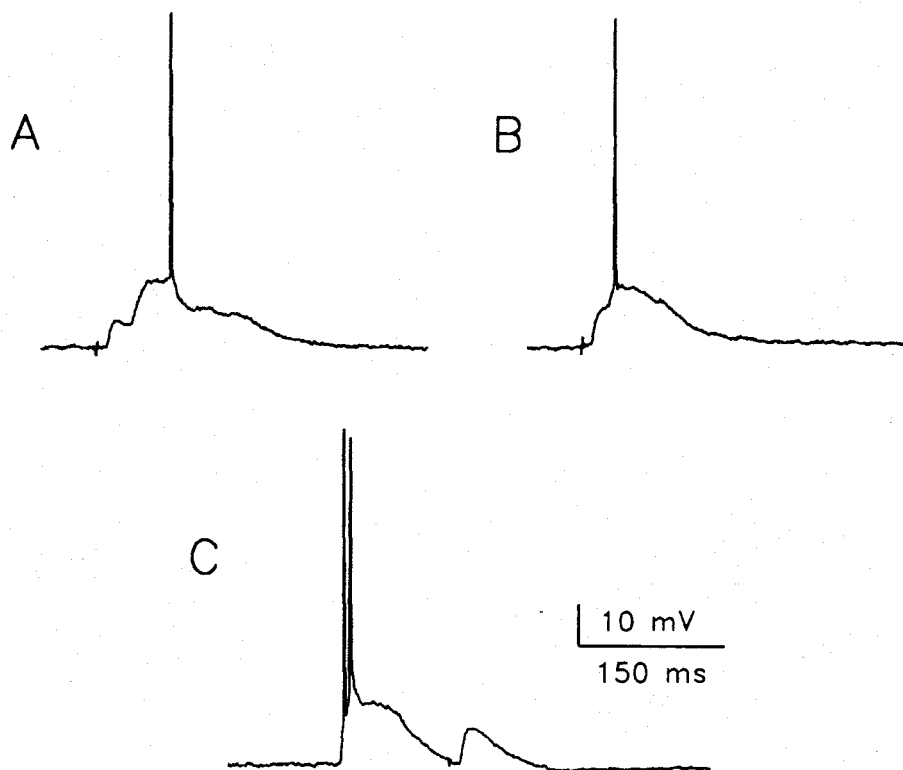
**Figura 44.** Variación en latencia del componente obtenido tras la aplicación de NMDA y refractariedad del mismo. En A y B se muestran dos registros obtenidos a una frecuencia de 1 Hz, donde el 2º componente muestra dos latencias de aparición distintas. En B un tercer estímulo a la misma frecuencia no logra originar este componente.

iv) al aumentar la frecuencia de estimulación (a 1 Hz), se observaron variaciones en la latencia de aparición, que tendía a aumentar (figura 44A y B).

v) a esta frecuencia de estimulación el 2º componente se hacía en ocasiones refractario a la estimulación (figura 44B). Esta refractariedad también ocurrió cuando el 2º componente se originó sin aplicar ninguna estimulación (figura 45C), y era más fácil de obtener cuanto más tiempo pasara desde que se había aplicado NMDA.

vi) también dependió de la duración del intervalo interestímulo, la duración del 2º componente obtenido en el caso de que éste presentara varios picos y por tanto una larga duración (figura 45A y B). La duración de este componente estuvo comprendida entre 80 y 250 ms.

vii) este 2º componente obtenido tras NMDA a veces se registró sin ninguna estimulación (figura 45C), cosa que no ocurrió nunca con el primer componente.

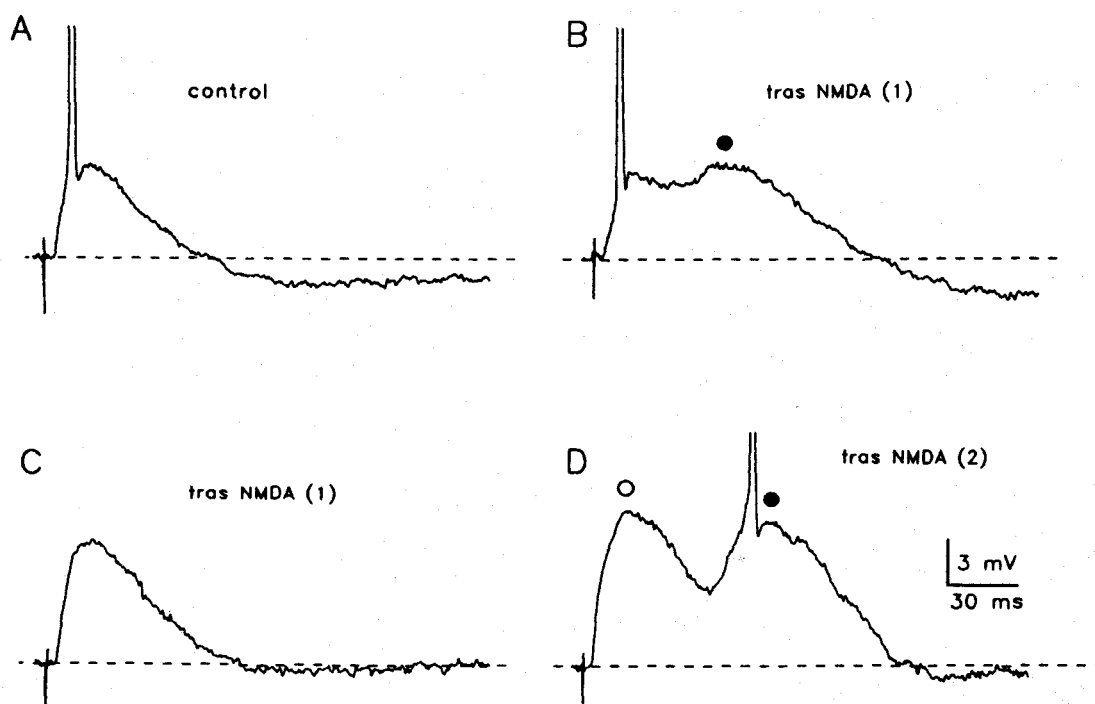


**Figura 45.** Variación en duración del componente obtenido tras la aplicación de NMDA a la sección y refractariedad del mismo a la estimulación tras su aparición espontánea. En A la duración de este componente es de 200 ms, habiendo transcurrido 5 min desde la última estimulación. En B habían pasado sólo 10 s obteniéndose una duración de 160 ms. C. Este componente que no se obtenía con ninguna intensidad de estimulación antes de NMDA ahora aparece a veces espontáneamente, originando en este caso un período refractario para su generación mediante la estimulación extracelular.



### 3.5. La aplicación repetida de N-metil-D-aspartato tiene un efecto aditivo

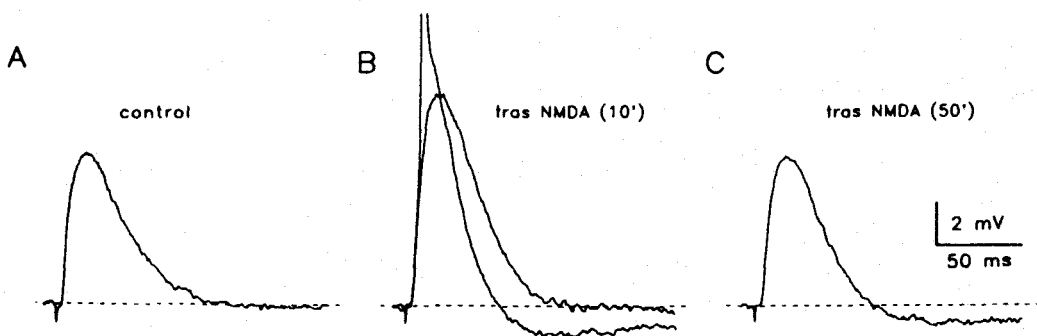
Un aspecto interesante del efecto de la aplicación de NMDA fué que sucesivas aplicaciones de la misma cantidad de este agente, consiguieron un 2º componente más robusto y que tardaba más tiempo en comenzar a desaparecer. En la figura 46D se muestra un componente polisináptico que se obtenía con cada estimulación 20 min después de una segunda aplicación de NMDA (10  $\mu$ M), mientras que con el mismo estímulo 20 min después de la primera aplicación de NMDA, en muchas ocasiones no se obtenía el 2º componente. Este efecto aditivo ocurrió en las tres células que se probó.



**Figura 46.** Efecto aditivo en el potencial postsináptico, de la aplicación repetida de NMDA. A. Potencial excitador monosináptico, seguido de un potencial postsináptico inhibitorio en una célula con un potencial de membrana de -60 mV. B. Respuesta 20 min después de haber sido tratada la sección durante 2 min con NMDA 10  $\mu$ M. El componente polisináptico (círculo negro) sólo se obtenía en algunas ocasiones. C. La célula se hiperpolarizó a -66 mV para evitar la aparición del potencial de acción. El registro está efectuado a los 23 min de la 1ª aplicación de NMDA, en una ocasión en que no apareció el componente polisináptico. D. Tras una idéntica aplicación de NMDA, aparece de nuevo el 2º componente. El registro se ha tomado 20 min después de esta 2ª aplicación, obteniéndose ahora siempre el componente polisináptico.

### 3.6. El componente polisináptico no se obtiene si se seccionan las conexiones entre CA1 y CA3

Para poder saber si el componente polisináptico obtenido tras el tratamiento con NMDA se debe a una aferencia sináptica desde la misma región CA1, debido a las interrelaciones existentes entre las neuronas de esta región (Christian y Dudek, 1988a), o bien a una aferencia sináptica proveniente de áreas anteriores en el circuito hipocámpico, en algunas secciones ( $n = 3$ ) se separaron quirúrgicamente el área CA1 y el área CA3, de forma que las aferencias que recibe CA1 desde CA3 por la colateral de Schaffer quedaran interrumpidas. Tras la aplicación de NMDA  $20 \mu\text{M}$  en estas secciones, que tuvo como efecto una despolarización dentro de los valores usuales, con formación de brotes de espigas en el inicio de esta despolarización, no se obtuvo en ninguna ocasión el componente polisináptico. Así la célula mostrada en la figura 47 se despolarizó  $25 \text{ mV}$  con la aplicación de NMDA, y tras la usual evolución de despolarización-hiperpolarización volvió al PDM original, tras lo cuál se pudo observar la secuencia de depresión-potenciación-depresión, durando la potenciación del componente monosináptico (figura 47B) en este caso  $18 \text{ min}$ , pero sin que apareciera el  $2^{\circ}$  componente durante los  $90 \text{ min}$  que se estuvo registrando esta célula tras la aplicación de NMDA.

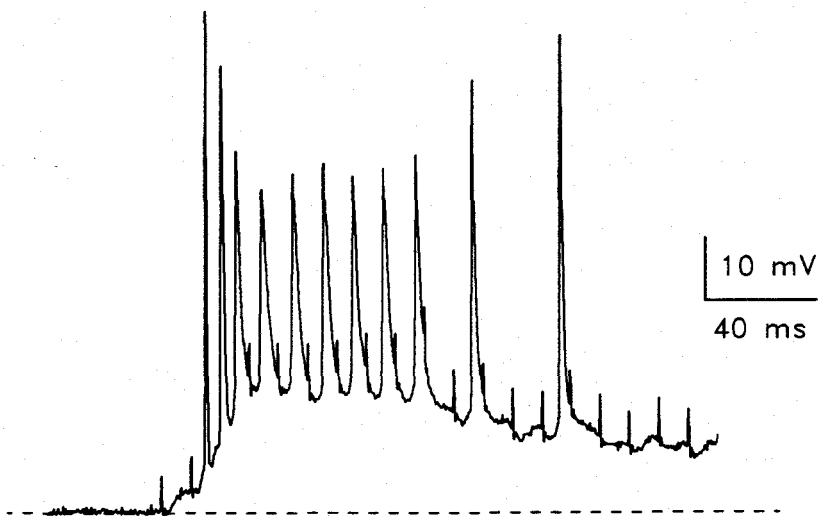


**Figura 47.** Efecto de NMDA ( $20 \mu\text{M}$ ) en una sección cortada entre el área CA1 y CA3. A. Potencial postsináptico excitatorio registrado en condiciones control. B. Tras la aplicación de NMDA se puede registrar un aumento de la amplitud del potencial postsináptico excitatorio pero no la aparición del  $2^{\circ}$  componente. C La potenciación es transitoria y  $50 \text{ min}$  después de la aplicación la amplitud está normalizada. La célula tenía un potencial de membrana de  $-60 \text{ mV}$ .

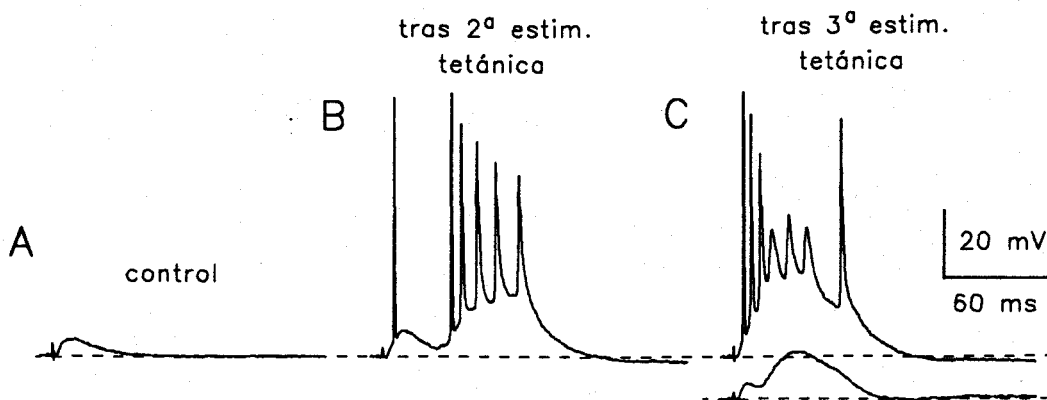
### 3.7. La estimulación tetánica repetida puede tener un efecto idéntico a la aplicación de N-metil-D-aspartato

La estimulación de los receptores NMDA de las células piramidales del área CA1, se realiza clásicamente mediante una estimulación tetánica (alrededor de 100 Hz) extracelular en el SR, lo que resulta en la estimulación tetánica de la aferencia que llega a CA1 desde CA3 por la colateral de Schaffer. Esta estimulación tetánica permite mantener la membrana postsináptica despolarizada (por sumación temporal de los PPSE que se originan), con lo que el bloqueo dependiente de voltaje ejercido por los iones de  $Mg^{2+}$  en el canal asociado al receptor NMDA se hace menos intenso (Mayer y Westbrook, 1987) y se hace posible el paso de iones de  $Ca^{2+}$  hacia el interior celular. Estos iones de  $Ca^{2+}$  a su vez activan cascadas enzimáticas intracelulares que resultan en la potenciación del PPSE a largo plazo (Malenka, Kauer, Perkel, Mauk, Kelly, Nicoll y Waxham, 1989). Se realizó pues el protocolo de estimulación tetánica en el *stratum radiatum* para comprobar el efecto en la sección completa de hipocampo.

Se aplicó un estímulo de 100  $\mu s$  de duración, a una frecuencia de 100 Hz, durante 2s, con lo que el PDM se despolarizó como se muestra en la figura 48, originando en algunos casos PDA. La media de la despolarización alcanzada fué de  $15,8 \pm 6,9$  mV ( $n = 9$ ). El transcurso temporal de esta despolarización fué siempre de una despolarización inicial mayor, para luego disminuir según se puede observar



**Figura 48.** Efecto postsináptico en una neurona piramidal del área CA1 de una estimulación tetánica en el *stratum radiatum*. Se utilizó un pulso de 100  $\mu s$ , a 100 Hz, durante 2 s. La célula se despolariza por la sumación temporal de los potenciales postsinápticos originados.



**Figura 49.** Obtención del componente polisináptico mediante la aplicación repetida de un estímulo tetánico. A. Inicialmente en esta célula sólo se obtenía el componente monosináptico. La 1ª aplicación del estímulo tetánico, sólo consiguió una potenciación de este componente del 19 %. B. Tras una 2ª aplicación del estímulo tetánico se obtuvo un claro componente polisináptico. C. La aplicación de un tercer estímulo tetánico, resulta en una potenciación del 2º componente y una disminución de su latencia (trazo superior), no obstante una hiperpolarización de 12 mV permite objetivar claramente los dos componentes (trazo inferior).

en la figura 48. Con este protocolo se consiguieron potenciaciones del  $23 \pm 11$  %. Independientemente de esta potenciación, la repetición del estímulo tetánico varias veces en una misma célula, a intervalos de aproximadamente 30 min, originó la aparición del 2º componente en 4 de los 6 casos en los que se realizó este protocolo. La 1ª estimulación tetánica nunca generó la aparición del 2º componente, no obstante una segunda o tercera estimulación lo conseguían (figura 49B), y una vez generado una nueva estimulación tetánica produjo el acortamiento de la latencia del 2º componente (figura 49C). Esta disminución de la latencia del 2º componente podía hacer que ambos componentes resultaran indistinguibles (figura 49C, trazo superior). No obstante hiperpolarizando la célula, para evitar la generación de PDA, se obtenía una clara diferenciación entre ambos componentes (figura 49C, trazo inferior).

#### 4. Cambios inducidos por la despolarización

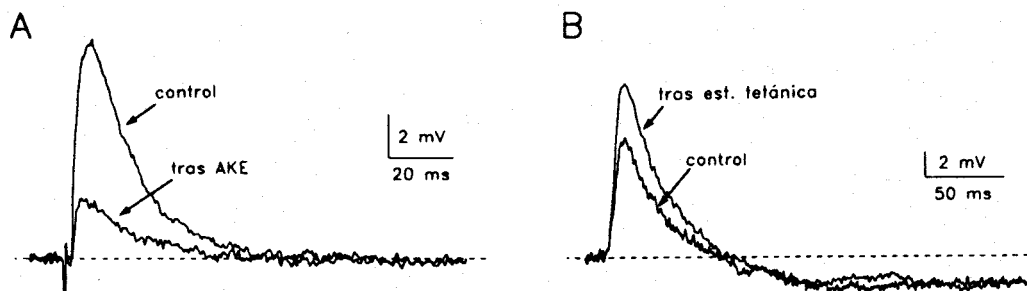
##### 4.1. Cambios en la respuesta sináptica inducidos por alto $K^+$ extracelular

Dado que NMDA provocó una despolarización en las células del área CA1, y probablemente en todo el hipocampo pues se han descrito receptores NMDA en el

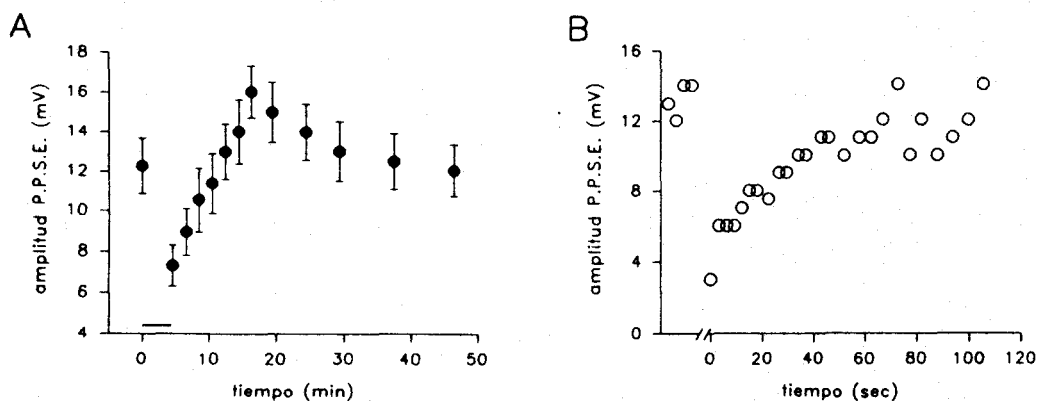
área CA3 (Zalutsky y Nicoll, 1990), giro dentado (Bliss y Lomo, 1973) y corteza entorrinal (Alonso, De Curtis y Llinás, 1990), se comparó su efecto con otro protocolo que también provocase una despolarización generalizada de la sección. Para ello se utilizó una solución extracelular con una concentración elevada de  $K^+$ , con lo que se desplaza el potencial de equilibrio para este ión hacia valores más positivos, lo que determina una despolarización de la célula, al ser el ión para el que existe una mayor permeabilidad en la membrana al PDM de reposo.

Para obtener una despolarización de características parecidas a la que se obtuvo con NMDA  $20 \mu M$ , se utilizó 1 ml de solución con  $129 \text{ mM } K^+$  (todos los solutos a la misma concentración que anteriormente excepto que se había sustituido equimolarmente el ClNa por ClK). La duración de la despolarización que se produjo con este protocolo osciló entre 156 y 480 s, con una media de  $288 \pm 102 \text{ s}$  ( $n=14$ ). La despolarización que se obtuvo fue de  $26 \pm 6 \text{ mV}$ , alcanzándose un PDM de  $-37 \pm 6,2 \text{ mV}$ . Tras recuperar su PDM inicial las células mostraron una depresión del PPSE del  $45 \pm 27 \%$ . En la figura 50A se muestra un PPSE antes y después del protocolo con alto potasio externo (AKE). En este caso la depresión fue del 68 %. Para comprobar la funcionalidad de la sinapsis a pesar de la depresión originada, se aplicó en algunos casos un estímulo tetánico obteniéndose entonces una potenciación de la respuesta sináptica (figura 50B). Así pues esta depresión puede ser revertida mediante la aplicación de un estímulo tetánico.

De los 14 casos en que se utilizó el protocolo de AKE, se produjo depresión en 12 casos y se registró una potenciación en otros dos. Esta ausencia de efecto



**Figura 50.** Depresión obtenida mediante alto  $K^+$  externo en la respuesta sináptica obtenida en células CA1 del hipocampo. A. Potencial postsináptico excitatorio antes de la aplicación de  $129 \text{ mM } K^+$  y tras recuperarse el potencial de membrana de reposo. B. Un estímulo tetánico (100 Hz, 2 s), potencia una respuesta deprimida previamente un 54 % por el protocolo de alto potasio extracelular.



**Figura 51.** Curso temporal de la recuperación de la depresión inducida por alto  $K^+$  externo. A. Evolución de una depresión tras una despolarización que duró 330 s (representados por la barra cercana al eje de abscisas). Cada punto representa la media y desviación estándar obtenidas de 6 medidas. B. Tras una despolarización de 156 s (representados por el corte en el eje de abscisas) la recuperación del potencial postsináptico excitador se realiza mucho más rápidamente. En este caso cada punto representa una única medida.

depresivo en estos dos casos, se puede explicar porque tras la depresión se origina una potenciación, probablemente por la acción del glutamato liberado de los terminales presinápticas durante la despolarización, de forma que si la recuperación del PDM es muy lenta, cuando alcanza su valor inicial, el potencial postsináptico puede haber evolucionado hasta la fase de potenciación descrita en el apartado 3,2. En la figura 51A se indica la evolución de una recuperación típica de la depresión originada por AKE. En la figura 51B se muestra una recuperación mucho más rápida en una ocasión en que la duración de la despolarización fue menor. La despolarización en el 1<sup>er</sup> caso duró 330 s mientras que en el 2<sup>o</sup> sólo 156 (debido a que el flujo fue en este caso de 6 ml/min), despolarizándose en ambos casos a un PDM de -30 mV.

Se pueden destacar las siguientes diferencias cualitativas entre los resultados obtenidos con los protocolos de despolarización con AKE o con NMDA:

- i) con AKE no ocurrieron brotes durante la fase inicial de despolarización.
- ii) sólo en dos células de las 14 con AKE ocurrió una hiperpolarización tras la despolarización mientras que con NMDA ocurrió siempre.
- iii) con AKE no se obtuvo un 2<sup>o</sup> componente polisináptico en células que no lo mostraban antes de la despolarización. Sin embargo en células que sí mostraban este 2<sup>o</sup> componente se vió potenciado tras la despolarización con AKE.

Una característica común a los dos protocolos fué el aumento de resistencia de entrada observado tras la recuperación del PDM iniciales. Estas características aparecen resumidas en la tabla 6.

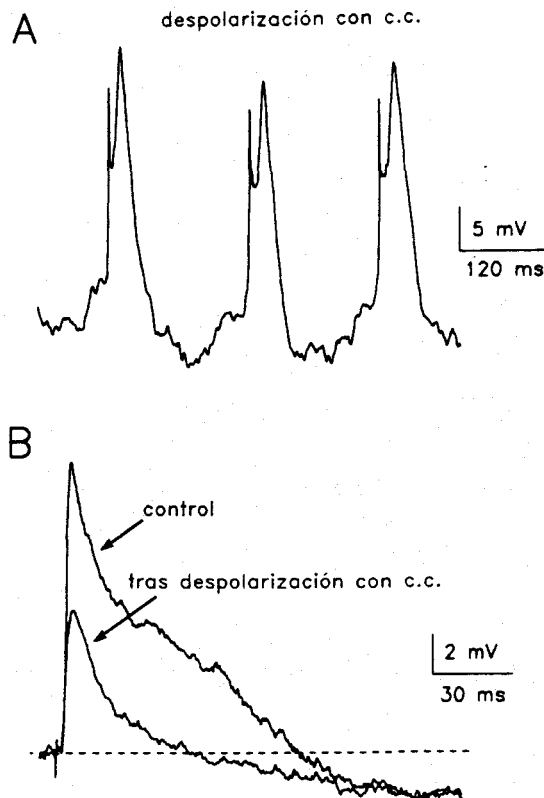
**Tabla 6.** Comparación de la despolarización con NMDA y con alto potasio externo

	NMDA	AKE
amplitud despolarización	22 ± 11 mV	26 ± 6 mV
duración despolarización	301 ± 112 s	288 ± 102 s
brotos en la despolarización	sí	no
RE tras la despolarización	aumentada	aumentada
amplitud de la depresión	63 ± 31 %	45 ± 27 %
duración de la depresión	456 ± 150 s	354 ± 115 s
aparición del 2º componente	8 de 9	no
nº de células	n = 9	n = 14

Abreviaturas: AKE, alto potasio externo; NMDA, N-metil-D-aspartato; RE, resistencia de entrada

#### 4.2. Cambios en la respuesta sináptica inducidos por la despolarización postsináptica con corriente continua

Al despolarizar las células mediante una solución extracelular con alta concentración de  $K^+$ , aunque este protocolo ejerce una acción similar a la realizada por NMDA, no permite conocer la participación respectiva del elemento presináptico y postsináptico (pues ambos se despolarizan), en los efectos observados.



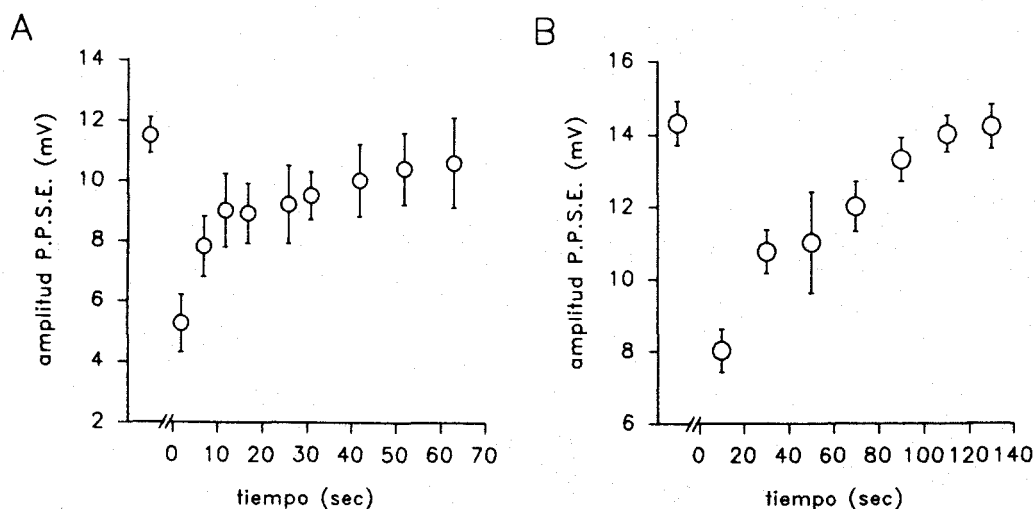
**Figura 52.** Depresión de la respuesta sináptica despolarizando la célula postsináptica con corriente continua. A. Aparición de espigas de  $Ca^{2+}$  con cada potencial de acción de sodio al despolarizar la célula 40 mV desde un potencial de membrana de -70 mV. La despolarización duró 90 s. B. Respuesta sináptica en la célula mostrada en A, antes y después de la despolarización.

Para estudiar el efecto que la despolarización del elemento postsináptico puede ocasionar en la respuesta sináptica, se despolarizó la célula postsináptica con corriente continua. El efecto fué muy diverso: en una ocasión ocurrió una potenciación, en 8 no tuvo efecto y en 8 provocó una depresión. La depresión tuvo un rango entre el 23 y 63 % con una media del 38,5 % (D.E. = 14 %, n= 8). En la aparición de la depresión no se encontró ninguna causa definitiva, no obstante se observó que a mayor duración de la despolarización la posibilidad de que se origine una depresión es mayor y que la aparición de espigas de  $Ca^{2+}$ , como las mostradas en la figura 52A, también favoreció la aparición de una depresión como la representada en la figura 52B.

La duración de la depresión fué también muy variable, oscilando entre 3 s y 2 min ( $73 \pm 45$  s, n=8), y como se puede apreciar en la figura 53 no tuvo relación



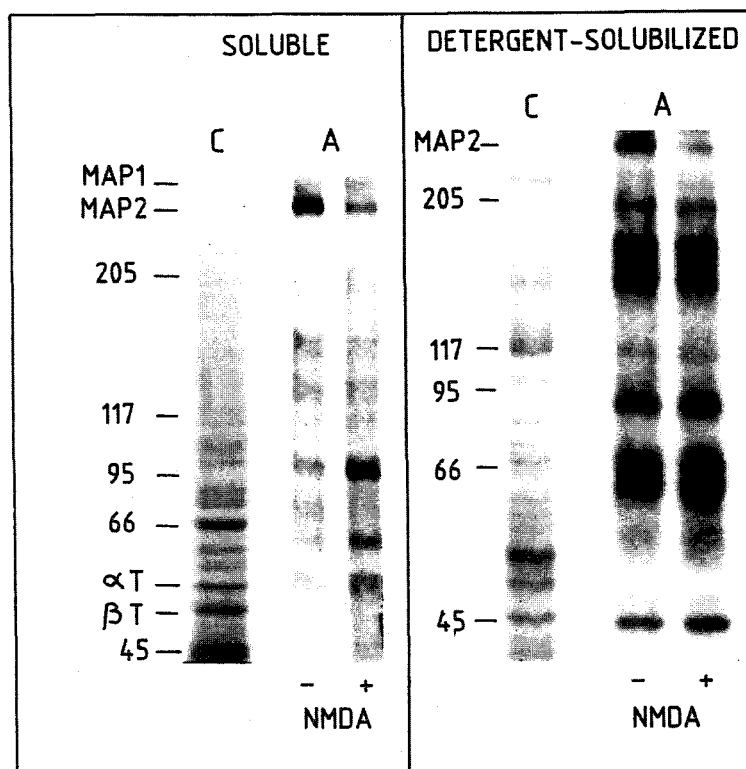
con la intensidad de la depresión si comparamos entre distintas células, probablemente porque la capacidad de tampón de  $\text{Ca}^{2+}$  varía de unas células a otras. En una misma célula tampoco se establece una relación lineal, sobre todo porque a medida que se repiten las despolarizaciones, la duración de las depresiones se hace mayor (aunque se provoque una depresión de intensidad menor), quizás por saturación de algunos de los sistemas de tamponamiento del  $\text{Ca}^{2+}$ . Sí resultó interesante que la recuperación de la depresión se realice en dos fases (figura 53A y B), con una duración que mantiene una relación aproximada de 2,5 : 1 , entre la 2<sup>a</sup> y la 1<sup>a</sup>.



**Figura 53.** Curso temporal de la recuperación de la depresión originada mediante despolarización con corriente continua en dos células en las que la depresión duró 70 s (A) y 140 s (B) respectivamente. En ambos casos la despolarización fué de 50 mV desde un p.d.m. mantenido a -70 mV, durante 90 y 80 s respectivamente en A y B. Cada punto representa la media de tres medidas, las barras indican la desviación estándar.

### C) FOSFORILACION/DESFOSFORILACION DE LA PROTEINA TIPO 2 ASOCIADA A MICROTUBULOS EN RESPUESTA A LA APLICACION DE N-METIL-D-ASPARTATO Y A LA DESPOLARIZACION

La estimulación de los receptores NMDA y la consiguiente potenciación a largo plazo de la transmisión sináptica se acompaña de cambios morfológicos en regiones postsinápticas especializadas como las espinas dendríticas (Fifkova y Van Harreveld, 1977; Chang y Greenough, 1984), que contienen grandes cantidades de la proteína tipo 2 asociada a microtúbulos (MAP2) (Matus, 1988; Morales y Fifkova, 1989). Como el estado de fosforilación de esta proteína determina su grado de unión a los microtúbulos (Yamamoto, Fukunaga, Goto, Tanaka y Miyamoto, 1985; Akiyama, Nishida, Ishida, Saji, Ogawara, Hoshi, Miyata y Sakai, 1986), se estudió cómo

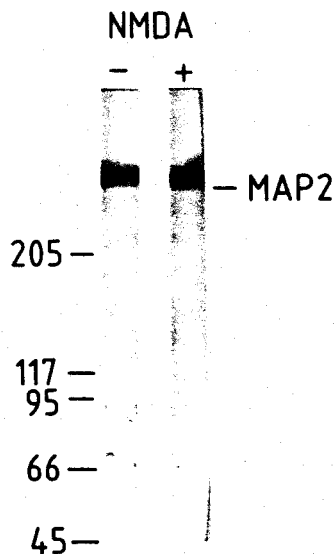


**Figura 54.** Efecto de NMDA en la fosforilación *in vitro* de proteínas de hipocampo de rata. Se muestran los geles marcados con azul de Coomassie (C) y las autorradiografías (A) correspondientes a la fracción soluble y a la solubilizada mediante Tritón. Estas autorradiografías proceden de secciones tratadas (+) o no (-) con NMDA. Las referencias colocadas a la izquierda del gel marcado con azul de Coomassie se refieren al peso molecular de los marcadores.

variaba la fosforilación de la MAP2 si se sometían las secciones de hipocampo a tratamientos paralelos a los llevados a cabo en el anterior estudio electrofisiológico.

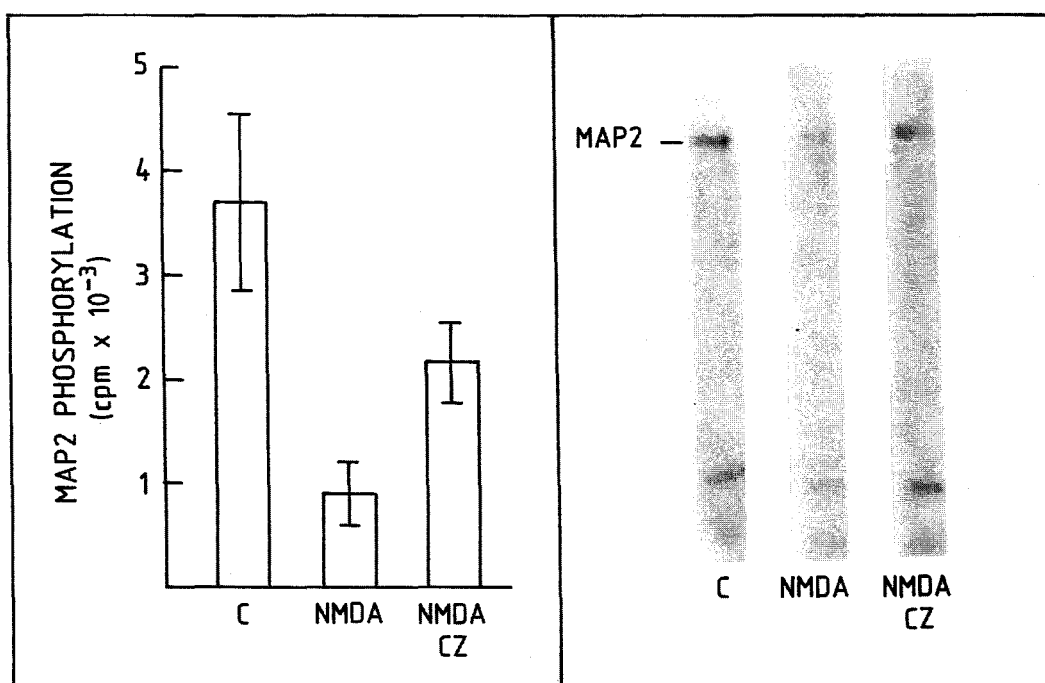
### 1. N-metil-D-aspartato induce la desfosforilación de la proteína tipo 2 asociada a microtúbulos

Un protocolo similar al expuesto para ver el efecto de NMDA en la respuesta sináptica se utilizó para estudiar el efecto que la aplicación de NMDA tiene en el estado de fosforilación de la proteína tipo 2 asociada a microtúbulos (MAP2). Para ello las secciones de cerebro premarcadas con  $^{32}\text{P}$  (ver sección "Material y Métodos", apartado 1) se incubaron durante 1 min en solución control o en otra con NMDA  $100\ \mu\text{M}$ . Después de homogeneizarlas, las proteínas celulares se separaron en dos fracciones, las proteínas celulares solubles en el citosol y las solubilizadas mediante tratamiento con Tritón. En la figura 54 se muestran las bandas electroforéticas correspondientes a las dos fracciones, en las que se puede apreciar como NMDA (columna NMDA +) produjo una clara disminución de la fosforilación en la proteína que tiene la movilidad de la MAP2. Este efecto no se debió a una desfosforilación inespecífica pues, como se observa en la fracción soluble, otras proteínas resultaron más fosforiladas tras el tratamiento con NMDA.



**Figura 55.** Immunodetección de MAP2 en secciones tratadas (+) o no (-) con NMDA. Una proteína de 270 KDa es detectada en ambas muestras mediante un anticuerpo policlonal antiMAP2, no apreciándose una diferencia significativa.

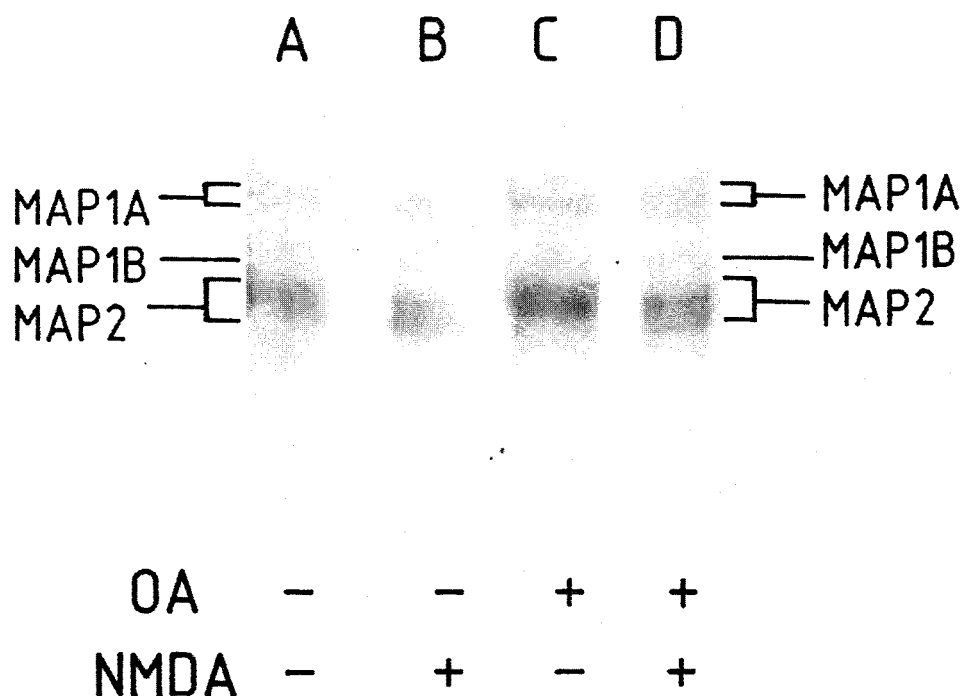
Esta disminución en la radioactividad de la banda correspondiente a MAP2 tampoco fué el resultado de una proteólisis inducida por la acción de NMDA, pues cuando se estudió mediante un anticuerpo policlonal antiMAP2 la cantidad de MAP2 existente en secciones tratadas o no con NMDA (figura 55) no se encontró una diferencia apreciable.



**Figura 56.** Inhibición por calmidazolium de la desfosforilación inducida en MAP2 por NMDA. En el panel de la izquierda se muestra la media y la D.E. de la radioactividad encontrada en tres experimentos, en la banda proteica correspondiente a MAP2, procedente de secciones control (C), tratadas con NMDA (NMDA) y tratadas con NMDA y calmidazolium (NMDA CZ). A la derecha se muestra las autorradiografías correspondientes a uno de los experimentos.

Puesto que la activación de los receptores NMDA, permite el paso de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior celular, cuando la célula está suficientemente despolarizada para disminuir el bloqueo por  $\text{Mg}^{2+}$  de estos canales (Mayer y Westbrook, 1987; Ascher y Nowak, 1988), se estudió la dependencia de la desfosforilación que sufrió la MAP2 con la activación del complejo  $\text{Ca}^{++}$ /calmodulina. Para ello se añadió a la solución que baña la sección calmidazolium 25  $\mu\text{M}$ , un fármaco que inhibe la interacción de la calmodulina con otras proteínas. Como se muestra en la figura 56 la desfosforilación provocada por la acción de NMDA (comparar los valores control (C) y tras NMDA

(NMDA), se inhibe parcialmente por la adición de calmidazolium a la solución que baña la sección 10 min antes del tratamiento con NMDA (columna NMDA CZ). Un ejemplo de esta inhibición se muestra en la parte derecha de la figura.

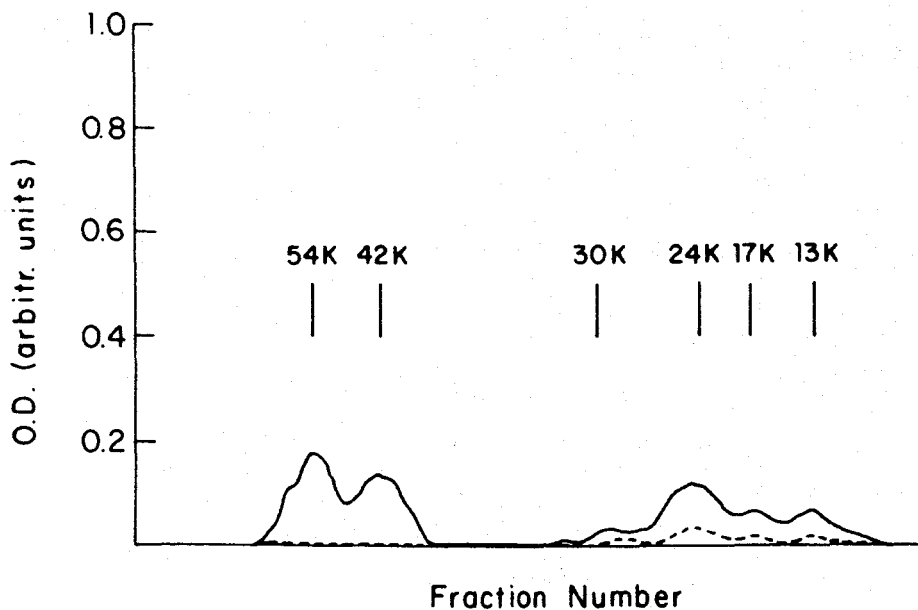


**Figura 57.** Efecto del ácido okadaico (OA) en la desfosforilación que NMDA induce en la MAP2. Se muestran los gels obtenidos de secciones control (A), tratadas con NMDA (B), tratadas con ácido okadaico (C) y tratadas con NMDA y ácido okadaico (D).

La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior celular puede activar distintas fosfatasa de proteínas como la proteína fosfatasa 1, la 2A y la calcineurina, que es una isoenzima de la proteína fosfatasa 2B. Para analizar la participación de las proteína fosfatasa 1 y 2A se estudió el efecto que el ácido okadaico (un inhibidor de estas dos fosfatasa), tenía sobre la desfosforilación inducida por NMDA en la MAP2. En la figura 57 se aprecia cómo el ácido okadaico (OA) indujo un aumento de la fosforilación de la MAP2 (compárese columnas A y C), pero no inhibió la desfosforilación inducida por NMDA (compárese columnas C y D).

La MAP2 es una fosfoproteína con múltiples lugares susceptibles de fosforilación (Hernández, Wandosell y Avila, 1987), por lo se estudió si la desfosforilación que produjo NMDA era uniforme o existía una diferencia entre los distintos péptidos que componen la proteína. Para estudiar este aspecto se sometió la

MAP2 separada previamente por SDS-PAGE a una proteolisis por la proteasa V8 de *S. aureus*. Los péptidos resultantes se separaron mediante electroforesis, midiéndose entonces la radioactividad correspondiente a las distintas movilidades electroforéticas. Como se muestra en la figura 58 donde la línea continua corresponde a una sección control y la línea discontinua a una sección tratada con NMDA, la desfosforilación se realiza preferentemente en los péptidos de 54 y 42 kDa, si se compara con la que se obtiene en los péptidos de mayor movilidad.

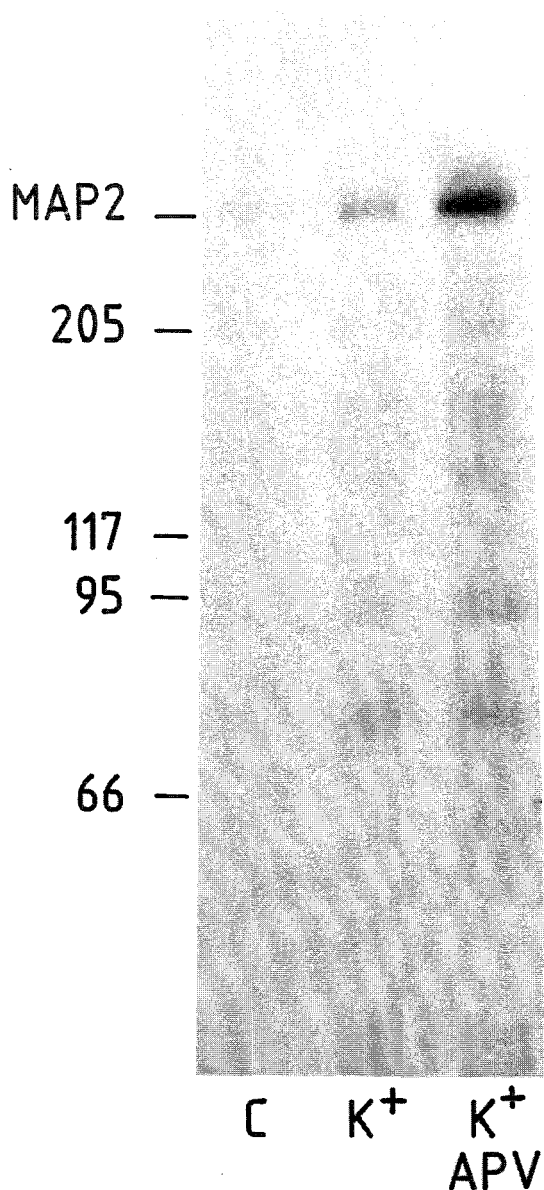


**Figura 58.** Medida densitométrica de las autorradiografías correspondientes a los fosfopéptidos obtenidos de la MAP2 fosforilada *in vitro* y tratada con la proteasa *S. aureus* V8. La línea continua corresponde a una sección control y la línea discontinua a una sección tratada con NMDA.

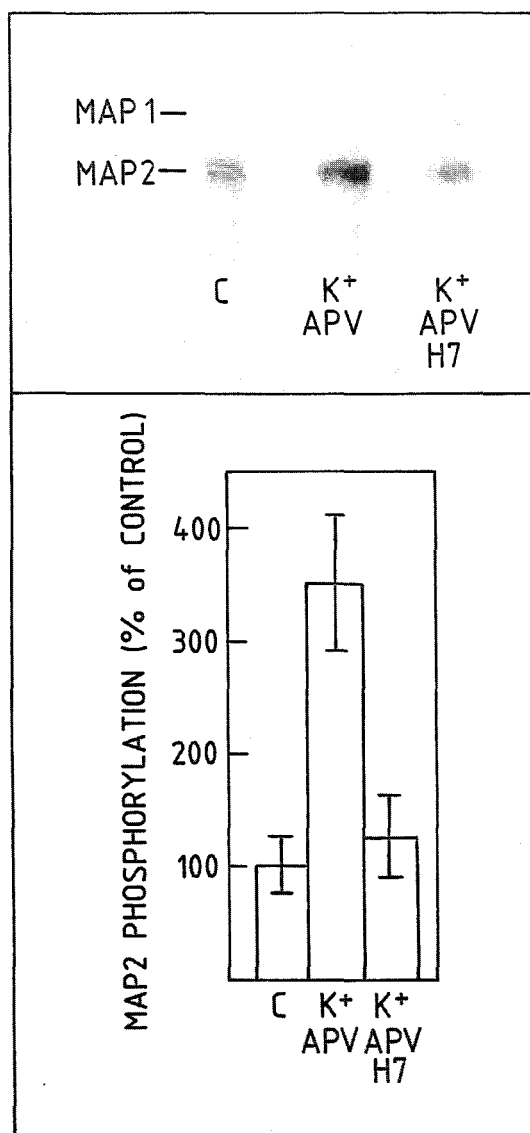
## 2. La despolarización con alto potasio extracelular induce la fosforilación de la proteína tipo 2 asociada a los microtúbulos

Como en los experimentos de electrofisiología, también aquí se comparó los efectos producidos por NMDA y alto potasio externo (AKE) en la fosforilación de la MAP2. Con este segundo protocolo se quiso comparar el estado de fosforilación de MAP2 cuando el  $\text{Ca}^{2+}$  accede al interior celular fundamentalmente a través de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje, con el estado de fosforilación obtenido al entrar el  $\text{Ca}^{2+}$  por los canales asociados a los receptores NMDA. El protocolo seguido fué la inmersión de la sección de hipocampo durante 1 min, en una solución

con una concentración extracelular de  $K^+$  de 40 mM, en la que se había sustituido equimolarmente el ClNa por ClK. Como se observa en la figura 59 comparando la columna control (C) y la procedente de una sección despolarizada con



**Figura 59.** Aumento en la fosforilación de la MAP2, cuando se despolariza la célula con AKE. Se observa una menor fosforilación en la MAP2 obtenida de una sección control (C) que en la obtenida de una sección sometida a despolarización ( $K^+$ ). En la columna de la derecha ( $K^+$  APV) se muestra la fosforilación cuando 10 min antes y durante la aplicación de alto  $K^+$ , las soluciones contenían APV 100  $\mu$ M.



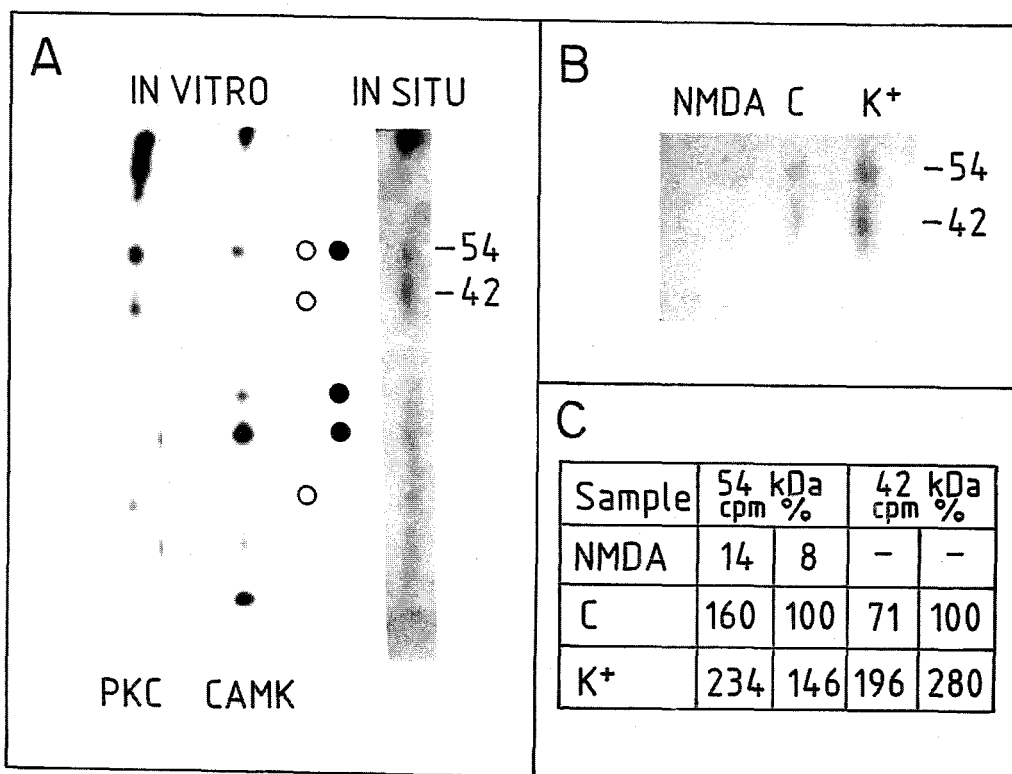
**Figura 60.** Inhibición por H7 de la fosforilación producida por AKE en la MAP2. En el panel superior se muestra la autorradiografía de un experimento típico en el que se observa que el aumento de la fosforilación que se obtiene en la sección tratada con  $K^+$  y APV ( $K^+$  APV) en relación a la sección control (C) es inhibido cuando se aplica H7 previamente ( $K^+$  APV H7). En la parte inferior se muestra la cuantificación (media y desviación estándar) obtenida de cuatro experimentos.

AKE ( $K^+$ ), este protocolo produjo un aumento en la fosforilación de varias proteínas incluyendo una de 270 KDa. La despolarización con AKE debió inducir la liberación desde los terminales presinápticos de diversos neurotransmisores, entre ellos glutamato, que al actuar en los receptores NMDA, produciría una desfosforilación de la MAP2, como se describió anteriormente. Para evitar esto, en algunos



experimentos la despolarización con AKE se realizó en presencia de APV 100  $\mu$ M y como se muestra en la figura 59, el resultado fué, como se esperaba, un incremento en la fosforilación inducida por el AKE (columna  $K^+$  APV).

La fosforilación inducida puede ser debida a la activación de kinasas dependientes de  $Ca^{2+}$ , como son la proteína kinasa C (PKC) y la  $Ca^{2+}$ /calmodulinakinasa tipo II (CAMKII). Como la PKC ha sido implicada en la fosforilación de la MAP2 que se produce in vivo (Tsuyama, Bramblett, Huang y Flavin, 1986; Díaz-Nido et al., 1990), se estudió el efecto de un inhibidor de esta enzima, el 1-(5-isoquinolinasulfonil)-2-metil piperazina dihidrocloruro (H7). Como se observa en la figura 60, cuando las secciones fueron incubadas 30 min en una solución que contenía 200  $\mu$ M H7, y entonces tratadas durante 1 min con una solución con  $K^+$  40 mM y APV 100  $\mu$ M, la fosforilación de la MAP2 fué casi completamente inhibida.



**Figura 61.** Comparación de la fosforilación de los péptidos de 54 y 42 KDa realizada con distintos protocolos. A. Comparación de la fosforilación producida por proteína kinasa C (PKC) y  $Ca^{2+}$ /calmodulina kinasa tipo II (CAMK) en MAP2 purificada y la fosforilación de MAP2 en secciones de hipocampo (columna in situ). B. Fosforilación de los péptidos de 54 y 42 KDa de la MAP2 en secciones control (C), tratadas con NMDA (NMDA) y con alto potasio externo en presencia de APV ( $K^+$ ). C muestra la cuantificación de B.

Para determinar los péptidos que se encuentran fosforilados en la MAP2 tras el tratamiento con AKE, se obtuvo la banda correspondiente a la movilidad electroforética de esta proteína de un gel de electroforesis como los presentados anteriormente, y se realizó una digestión enzimática parcial de esta proteína con la proteasa V8 de *S. aureus*, sometiendo el resultado de esta proteólisis a una nueva electroforesis. El estado de fosforilación de los péptidos obtenidos se comparó con el de los péptidos obtenidos mediante la fosforilación con PKC o CAMK II de MAP2 purificadas. Como se muestra en la figura 61 el patrón de fosforilación de la MAP2 en secciones tratadas con AKE (columna "in situ" en la figura 61A), fué una combinación del obtenido con la PKC (puntos blancos en la figura 61A) y la CAMK II (puntos negros en la figura 61A). No obstante los péptidos de 54 y 42 KDa que han sido propuestos como la zona de unión de la MAP2 a la tubulina (Hernández et al. 1987), y que sufren una gran fosforilación con el protocolo de AKE (figura 61B y C), aparecen más fosforilados en el patrón que induce la PKC (figura 61A, columna PKC y puntos blancos).

## DISCUSION

En el presente trabajo se ha estudiado en secciones de cerebro mantenidas *in vitro*, la adaptación que ocurre durante pulsos rectangulares de corriente transmembranaria, en neuronas de la capa II-III de la corteza visual del cobaya. Se han encontrado dos tipos de patrones de disparo atendiendo a la adaptación a corto plazo que ocurre durante pulsos de corriente despolarizante, y una adaptación a largo plazo similar a la descrita en otras estructuras del sistema visual (Llinás y López Barneo, 1988). Como ejemplo de los cambios de larga duración que ocurren en la actividad neuronal, se han estudiado las modificaciones de los potenciales postsinápticos excitadores registrados en células del área CA1 del hipocampo de rata, por el tratamiento de una sección con N-metil-D-aspartato (NMDA) o con alto potasio extracelular. Ambos tratamientos provocan una depresión seguida de una potenciación del potencial monosináptico excitador registrado en CA1. El NMDA induce además la aparición de un potencial polisináptico. En paralelo al estudio electrofisiológico se analizó el efecto del NMDA y de alto potasio extracelular sobre el estado de fosforilación de la proteína tipo 2 asociada a microtúbulos (MAP2). El NMDA provocó una disminución del estado de fosforilación de la MAP2 y el alto potasio extracelular un aumento, siendo la zona de unión de la MAP2 a la tubulina la que más se afectó por estas modificaciones bioquímicas.

## 1. Tipos celulares según el patrón de disparo en la corteza visual

Dependiendo del patrón de disparo en respuesta a un pulso transmembranario rectangular de corriente, las neuronas del neocortex de mamíferos se han clasificado en neuronas de disparo rápido, de disparo regular y neuronas generadoras de brotes de PDA (McCormick et al., 1985; Connors y Gutnick, 1990). Dentro del grupo de neuronas de disparo regular, en este trabajo se han diferenciado dos subgrupos, de forma similar a las subclasificaciones realizadas en el núcleo del tracto solitario, atendiendo a la latencia de aparición del 1<sup>er</sup> PDA (Dekin y Getting, 1987) o en el núcleo paraventricular del hipotálamo, atendiendo a la morfología de las espigas y a la curva corriente/voltaje (Tasker y Dudek, 1991). No se encontró ninguna célula con un patrón de disparo asimilable al de "disparo rápido" de Connors y Gutnick (1990), probablemente por el menor tamaño del soma de estas células y la consiguiente dificultad en acceder a su interior sin que los electrodos causen daño. También fué muy escasa la proporción de células que disparasen siempre en brotes, posiblemente porque este tipo celular se encuentra fundamentalmente en la capa V de la corteza (Connors y Gutnick, 1984; Connors, Gutnick y Prince, 1982; Silva, Amitai y Connors, 1991) donde apenas se realizaron registros.

La elección de la capa II-III para realizar este estudio se debió a que no está claro el papel funcional de la capa I (Gilbert, 1983; Bolz, Gilbert y Wiesel, 1989), y a que en capas más profundas a la III, la obtención de registros con una alta calidad fué más difícil, quizás debido a que la hipoxia que ocurre durante el corte produce un mayor daño en estas capas, al tardar más tiempo en enfriarse por estar más profundas. La elección del grosor de las secciones en 500  $\mu\text{m}$ , se debió a la mayor proporción de células sanas que se ha descrito que es posible obtener en éstas respecto a otras secciones más delgadas (Connors y Gutnick, 1984), y para intentar preservar las columnas perpendiculares a la superficie cortical que se comportan como unidades funcionales y que tienen un diámetro entre 200 y 500  $\mu\text{m}$  (Mountcastle, 1957; Woolsey y Van der Loos, 1970; Hubel y Wiesel, 1977).

Los dos subgrupos encontrados dentro del denominado como "neuronas de disparo regular", se han llamado "células tónicas" (CT) y "células con agrupamiento inicial" (CAI). Su diferenciación se ha basado en la morfología del 2<sup>o</sup> PDA de un pulso de corriente intracelular, la adaptación en el disparo que ocurre durante un pulso de 300 ms, el valor de la relación frecuencia instantánea-intensidad del pulso para el 2<sup>o</sup> PDA y la modificación del patrón de disparo por TEA.

La **distribución** de los dos tipos celulares fué bastante homogénea en el área de cortex visual explorado, según se ha mostrado en la tabla 2, obteniéndose un 53 % de CT y un 45 % de CAI. En cambio sí hubo diferencias en la proporción de cada tipo celular en relación al peso del animal (tabla 3), siendo las CAI más frecuentes en animales que pesaran entre 250 y 300 gr, peso que se corresponde con una edad del animal entre 4 y 5 semanas. Este predominio de las CAI durante este período puede tener relación con las modificaciones transitorias que tienen lugar en el cortex visual en desarrollo tanto en la producción de neurotransmisores (Robertson, Hanes, y Yu, 1988; Prusky, Arbuckle y Cynader, 1988), como en su acción postsináptica (Walch y Schliebs, 1989; Shaw, Prusky, Huizen y Cynader, 1989; Morrisett, Mott, Lewis, Wilson, y Swartzwelder, 1990). Especialmente la riqueza de receptores NMDA tiene un pico en las primeras semanas de vida (Gordon, Daw, y Parkinson, 1991), que está claramente ligado a los cambios funcionales que ocurren en el cortex visual, mediando la aparición de las bandas de dominancia ocular (Rauschecker, Egert, y Kossel, 1990) y retrasándose la disminución de receptores NMDA si el animal crece en oscuridad (Fox, Daw, Sato y Czepita, 1991).

Además de lo indicado anteriormente también se estudió si existía un predominio en el tipo celular en las células obtenidas en el mismo día de experimentación, que por lo tanto tendrían en común el animal del que se obtuvieron, la dosis y el tiempo de anestésico, la duración del tiempo de extracción y la temperatura de las distintas soluciones. Sólo el 14 % de los días se encontró un solo tipo celular, por lo que no parece que sea ésta una fuente de error apreciable.

Las **características electrofisiológicas** de ambos tipos celulares, presentadas en las tablas 4 y 5, son parecidas a las encontradas en secciones de neocortex de gato (Stafstrom, Schwint y Crill, 1984), cobaya (Connors et al., 1982) o rata (Bindman, Meyer, y Prince, 1988). La referencia de que se dispone en el cortex visual (Ogawa, Ito y Kato, 1981) describe también valores similares, excepto para el PDM, que fué de -58 mV, pero esta discrepancia probablemente se debe al pequeño tamaño de la muestra ( $n = 15$ ) y a que no se hizo ninguna selección de las células, con un rango para el PDM de -45 a -79 mV. Es muy interesante que cuando se han comparado las características electrofisiológicas de neuronas neocorticales registradas "in vivo" e "in vitro" (Bindman et al., 1988), se encontraron valores parecidos excepto para la RE que se duplicó en el caso de las secciones, la capacidad de la membrana, que se redujo, y el umbral del PDA, que fué 5 mV menos negativo.

En nuestro caso se estudió si los dos grupos de CT y CAI eran estadísticamente diferentes, atendiendo a alguno de los parámetros electrofisiológicos. Esto fué así ( $p < 0,05$ ) para 5 parámetros muy relacionados entre sí: el PDM, el umbral para el disparo de PDA, la máxima pendiente de subida, la máxima pendiente de bajada y la duración del PDA. Si se relacionan estos parámetros se pueden comprender mejor las diferencias entre los dos grupos. El valor del umbral es de  $-43,7$  mV para las CAI y de  $-37,2$  mV para las CT, es decir existiría una diferencia de  $6,5$  mV. Esto puede explicar porqué la duración de la espiga es menor en el caso de las CAI, pues habría menos canales inactivados en el momento del inicio de la espiga y la subida y bajada de la espiga sería más rápida. Esta mayor rapidez explica una duración menor del PDA y una mayor mayor pendiente de subida y bajada en las CAI. El umbral más alto en las CT se podría deber a que al tener un PDM más despolarizado que las CAI, parte de los canales de  $\text{Na}^+$  se encontrasen inactivados. No obstante el umbral de activación para la corriente de sodio clásica (Hodgkin y Huxley, 1952) es de  $-50$  mV en neuronas del septum (Castellano y López-Barneo, 1991), de  $-55$  mV en células neocorticales (Huguenard, Hamill y Prince, 1988) y de  $-60$  mV en neuronas del hipocampo (Sah, Gibb y Gage, 1988), valores todos mucho más despolarizados que el PDM de las células tónicas. De hecho, hiperpolarizando las células tónicas  $10$  mV (figura 6D), el umbral de disparo apenas cambia  $0,5$  mV, lo que implica que la deinactivación de los canales de  $\text{Na}^+$  a PDM de reposo en las CT es prácticamente total. Otra posibilidad sería que las CAI tuviesen una mayor proporción del tipo de canal de  $\text{Na}^+$  llamado "canal umbral" (Gilly y Armstrong, 1984). Este canal tiene un umbral de activación cercano a los  $-75$  mV, y podría ser por tanto el responsable del inicio de la despolarización que conduce a la generación del PDA. También podría existir en las CAI una mayor riqueza de los canales de  $\text{Na}^+$  denominados de "inactivación lenta" (Stafstrom, Schwint y Crill, 1982; Stafstrom, Schwint, Chubb y Crill, 1985; Huguenard et al., 1988; French, sah, Buckett y Gage, 1990), que han sido postulados también como un comportamiento especial en brote, del tipo clásico de canal de  $\text{Na}^+$  (Gähwiler y Llano, 1989). En cualquier caso este tipo de conductancia permitiría una despolarización más mantenida en el rango de voltaje cercano al umbral y por tanto la generación del PDA a potenciales más hiperpolarizados.

Independientemente de sus características electrofisiológicas, el rasgo diferencial que primero aparece entre las CT y las CAI es la **capacidad para agrupar dos PDA** al inicio del pulso de corriente, cuando se inyecta éste al PDM en reposo (compárense las figuras 6B y 9B). De forma interesante con pulsos de

intensidad pequeña, el patrón de disparo de las CAI es también tónico (ver figuras 9A, 21A y 22A), pero al alcanzar un cierto grado de despolarización se consigue el agrupamiento de las dos primeras espigas (en algunas células con una mayor intensidad de estimulación se llegan a agrupar 3 espigas). Este mismo comportamiento se obtiene si la despolarización se consigue inyectando corriente positiva, según se puede apreciar en la figura 10 y 28C y D. El agrupamiento o brote inicial de espigas se debe en otras estructuras del SNC a la activación de una conductancia de  $\text{Ca}^{2+}$  de bajo umbral (Llinás y Yarom, 1981; Alvarez de Toledo y López-Barneo, 1988), pudiendo generarse en la corteza visual mediante mecanismos diversos (Montoro, López-Barneo y Jassik-Gerschenfeld, 1988). En las CAI no parece ser la conductancia para el  $\text{Ca}^{2+}$  de bajo umbral la responsable del agrupamiento pues la despolarización en el rango de los -40 mV (algo por encima del umbral) lo favorece, activándose la conductancia de  $\text{Ca}^{2+}$  de bajo umbral a los -70 mV (Tsien, Lipscombe, Madison, Bley y Fox, 1988) y como se comentó en el apartado 2.2.1 de "Resultados" en estas células no se encontró este tipo de conductancia para el  $\text{Ca}^{2+}$  tras el bloqueo de las conductancias para el  $\text{Na}^+$  con TTX (figura 17B).

El segundo rasgo diferencial que se encontró entre los dos tipos celulares fué la distinta morfología del 2º PDA, una vez que se habían agrupado los dos primeros PDA en las CAI (compárense las figuras 7A y 11A). La diferencia consistió en que mientras en las CT el aumento de duración de los PDA, fué progresiva a lo largo del pulso, en el caso de las CAI, fué la 2ª espiga la más duradera. Esto se debió a tener en su fase de bajada una inflexión mucho mayor (ver figura 11A), inflexión que se ha atribuido en otras preparaciones a la activación de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de alto umbral situados en las dendritas, que se activarían por la despolarización que origina el PDA (Llinás y Hess, 1976; Wong, Prince y Basbaum, 1979; Llinás y Sugimori, 1980b; Llinás y Yarom, 1981; López-Barneo y Llinás, 1988). En las CAI la abolición de las conductancias de  $\text{Ca}^{2+}$  originaron un enlentecimiento de la fase de bajada de los PDA, que en las figuras 18, 19, 20 y 21 se reconoce por un ensanchamiento de la base de los PDA. Este aumento de la duración de los PDA hizo que la 2ª espiga dejase de ser la más ancha, pero más que por una disminución de la duración de ésta por un aumento de la duración de las demás. De todas formas la inflexión que ocurre en la fase de bajada no se abolió completamente en 0  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular o en la solución con  $\text{Co}^{2+}$ , por lo que quizás intervengan otras conductancias además de la de calcio de alto umbral, como la conductancia para el  $\text{Na}^+$  de inactivación lenta antes referida.

También fué distinta la **morfología de los postpotenciales** en los dos tipos celulares, sobre todo del 1<sup>er</sup> PDA. En las células tónicas (ver figura 7B), el postpotencial del 1<sup>er</sup> PDA consistió en una posthiperpolarización cóncava hacia arriba y cuya concavidad siempre aumentó con la intensidad del pulso, debido al aumento de la pendiente de la despolarización que generaba el 2<sup>o</sup> PDA. En las CAI (ver figura 11B), esta concavidad disminuyó al formarse el agrupamiento de los dos primeros PDA, llegando a hacerse convexa como puede observarse en el trazo 3 de la figura 11B, y ocasionando en algunos casos una postdespolarización (ver figura 10B y D).

El estudio de la **respuesta celular subumbral** (ver figuras 8 y 12), no reveló diferencias significativas entre las CT y las CAI. Con pulsos hiperpolarizantes se observó una disminución de la pendiente de la curva I/V, probablemente debida a la activación de la conductancia para el  $K^+$  denominada "rectificación anómala" y que se activa con la hiperpolarización. Se han descrito dos tipos de conductancias de  $K^+$  con las características de rectificación anómala, uno de activación instantánea (Sholfield, 1978; Constanti y Galvan, 1983) y otra que presenta una marcada dependencia de la duración de la activación, originando una deflexión en los pulsos hiperpolarizantes (Wilson y Goldner, 1975; Adams y Halliwell, 1982). En nuestro caso parece existir una mayor proporción de la de tipo instantáneo pues apenas si existe deflexión en la respuesta a pulsos hiperpolarizantes (figuras 8A y 12A) y las pendientes son prácticamente idénticas a los 20 y a los 120 ms del inicio del pulso (rombos blancos y negros en las figuras 8B y 12B), siendo similar por tanto a lo encontrado en el cortex frontal de la rata (Sutor y Zieglgänsberger, 1987). El aumento de la pendiente en los voltajes más hiperpolarizados se debe a la rectificación en sentido contrario que presentan los electrodos a partir de una cierta intensidad de corriente (ver "Material y Métodos", apartado 4.2).

La inflexión que ocurre en el sentido despolarizante en la curva I/V de los potenciales subumbrales (figuras 8B y 12B), fué objeto de un estudio más detallado. Esta inflexión es una característica de la mayoría de las neuronas del sistema nervioso central (Nelson y Frank, 1967; Llinás y Sugimori, 1980a; Connors et al., 1982; Constanti, Galvan, Franz y Sim, 1985; Jahnsen, 1986a). Se han descrito dos conductancias como responsables de este comportamiento: la conductancia para el  $Na^+$  de inactivación lenta (Llinás y Sugimori, 1980a; Stafstrom, Schwint y Crill, 1984; Jahnsen, 1986b) y la de  $Ca^{2+}$  de bajo umbral (Johnston, Hablitz y Wilson, 1980; Schwint y Crill, 1980; Sutor et al., 1987). En todos estos trabajos se destaca



la importancia de esta inflexión en la regulación del disparo neuronal. Como se ha señalado anteriormente no se observaron diferencias significativas en esta inflexión entre ambos tipos celulares. En la figura 13 se muestra como el resultado de la activación de las conductancias que originan esta deflexión es la generación de una onda inicial despolarizante en pulsos subumbrales. La activación de esta onda puede ser fundamental en la regulación del disparo neuronal en la capa II-III de la corteza visual, pues como se observa en la figura 14A, B y C su activación tiene un umbral muy similar al del PDA. En nuestro caso se obtuvo una abolición total de esta inflexión cuando se impidió el paso de  $\text{Na}^+$  al interior celular, bloqueando la conductancia con TTX o sustituyendo la solución externa por una sin  $\text{Na}^+$  (ver figuras 14 y 15). Por el contrario, cuando se anularon las conductancias para el  $\text{Ca}^{2+}$  (figura 16), la inflexión se hizo mayor. Este último hecho resulta relevante pues se produjo incluso cuando ocurría una disminución de la RE (en el caso de una solución con 0  $\text{Ca}^{2+}$  externo). Una posible explicación es una más fácil activación de los canales de  $\text{Na}^+$  al disminuir el  $\text{Ca}^{2+}$  externo (Hille, 1992).

Una vez iniciado el disparo, la despolarización que produce el PDA activa una serie de conductancias que regulan el patrón de disparo (Llinás, 1988), originando la **respuesta supraumbral**. Entre las conductancias que intervienen en esta respuesta supraumbral es común en las neuronas del sistema nervioso central la existencia de conductancia de  $\text{Ca}^{2+}$  de alto umbral (Llinás y Hess, 1976; Wong et al., 1979; Llinás y Yarom, 1981). Esta conductancia se encontró en todas las células en que se investigó su existencia, fuesen CT o CAI (figura 17). No se encontró en cambio la conductancia de  $\text{Ca}^{2+}$  de bajo umbral (Llinás y Yarom, 1981; Llinás y Jahnsen, 1982) en la capa II-III, que sí se obtuvo en la capa V, de forma similar a lo referido en otras áreas del neocortex (Connors y Gutnick, 1984; Silva et al., 1991). La conductancia de  $\text{Ca}^{2+}$  de alto umbral, puede participar en la inflexión que se produce en la fase de bajada del PDA, (independientemente de que puedan participar otras conductancias como antes se ha comentado), igual que ocurre en otras estructuras del sistema nervioso central (Wong et al., 1979; López-Barneo y Llinás, 1988). De hecho la abolición de esta conductancia mediante una solución con 0  $\text{Ca}^{2+}$ , o con bloqueantes como el  $\text{Co}^{2+}$  o la nifedipina (ver figuras 18-22), cambian completamente el patrón de disparo, agrupándose las espigas en brotes y obteniéndose una respuesta muy similar para las CT y las CAI. Así pues la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior celular parece mediar la activación de otras conductancias (probablemente de  $\text{K}^+$ ), que permiten una disminución progresiva de la frecuencia instantánea durante la estimulación con un pulso de corriente transmembranario.

El bloqueo de algunas conductancias de  $K^+$  mediante el empleo de TEA, originó el resultado opuesto al bloqueo de conductancias de  $Ca^{2+}$  comentado anteriormente: las diferencias no sólo no desaparecieron entre los dos tipos celulares sino que se hicieron más patentes (figura 23). Las CT, siguieron mostrando un patrón tónico aunque la duración de las espigas aumentó considerablemente, probablemente por una mayor activación de la conductancia de  $Ca^{2+}$  de alto umbral en las dendritas (al existir un menor decremento electrotónico), y una disminución de la repolarización al bloquearse los canales de  $K_{Ca}$  de gran conductancia (Rudy, 1988). En las CAI, en cambio, el TEA aumentó su capacidad para agrupar las dos primeras espigas, no siendo posible obtener un patrón tónico con estimulaciones de pequeña intensidad. Un efecto idéntico al descrito en las CT, se ha observado para el TEA en el neocortex del cobaya (Franz, Galvan y Constanti, 1986), mientras que un aumento de fascicidad bajo TEA, similar a lo encontrado en las CAI, ha sido referido en el neocortex sensorial de gato (Schwindt, Spain, Foehring, Stafstrom, Chubb y Crill, 1988b).

## **2. Adaptación en el disparo repetitivo en el cortex visual**

Para estudiar de forma aproximada la integración que realiza una neurona con la corriente sináptica, transformándola en una determinada frecuencia de disparo, se estudia su respuesta en el tiempo con distintas intensidades de corriente transmembranaria, modificando también el PDM al que se le inyectan los pulsos de corriente. Aunque en la integración real que realiza la célula, tiene una gran importancia el lugar en su compleja geometría donde se desarrolla la corriente sináptica, y la relación temporal entre las distintas aferencias sinápticas (Rall, Burke, Holmes, Jack, Redman y Segev, 1992), un estudio como el indicado con pulsos intracelulares de corriente permite caracterizar las diferentes propiedades intrínsecas de las células e intentar deducir cómo cada neurona elabora la información en el circuito sináptico donde se encuentra. Ante un pulso rectangular supraumbral de corriente la mayoría de las neuronas muestran un adaptación o disminución de la frecuencia de generación de PDA durante el pulso. Como se indicó en la sección "Resultados", en este trabajo se ha estudiado de forma separada la adaptación inicial que sufre una neurona ante un pulso breve de corriente (adaptación a corto plazo), con aquella que se desarrolla si el estímulo se realiza de forma repetida (adaptación a largo plazo).

**La adaptación a corto plazo** que se desarrolla en las CT y CAI es otra de las características que permite diferenciar estos dos tipos celulares (figuras 24-28). En las CAI la adaptación se realiza en los primeros 100 ms, siendo luego la frecuencia de disparo muy constante. Este comportamiento se debe a que tras el 2º PDA, ocurre una gran hiperpolarización (ver figura 9B, 23D y 24B), que determina una frecuencia instantánea (FI) para el 3º PDA muy inferior al 2º y que apenas se modifica ya en los posteriores PDA. Esto es así una vez que se agrupan los dos primeros PDA independientemente de la intensidad del pulso inyectado o el PDM al que se encuentre la célula. Esta adaptación rápida es similar a la encontrada en algunas neuronas del cortex sensoriomotor (Stafstrom et al., 1984a) o en motoneuronas (Jodhowsky, Viana, Dick y Berger, 1988). También como en estos casos las CAI del presente trabajo agrupaban con estimulación altas o a ciertas despolarizaciones tres PDA al inicio del pulso (ver figura 28D), pero consiguiéndose en todo caso la adaptación final en los primeros 100 ms. En estos casos de agrupación de tres espigas al inicio del pulso la disminución de la FI no fué progresiva durante el pulso pues el 4º PDA presentó una frecuencia instantánea menor al 5º PDA (figura 28C y D, círculos blancos). En las CT por el contrario la adaptación fué progresiva durante pulsos de 300 ms y probablemente habría continuado si los pulsos hubiesen tenido una duración mayor. Esta adaptación más lenta fué similar a la descrita en el cortex sensoriomotor (Stafstrom et al., 1984a; Schwindt et al., 1988b). No obstante esta diferencia entre CT y CAI, ambos grupos mostraron un aumento de la adaptación relativa (referida a la máxima en cada pulso), al aumentar la intensidad del estímulo.

Según se indicó antes, en el estudio de la elaboración que realiza una neurona con la información aferente, importa no sólo su respuesta en el tiempo, sino también cómo se modifica ésta con la intensidad del estímulo. En las figuras 29-31, se puede apreciar que no existieron grandes diferencias entre ambos grupos excepto para la FI del 2º PDA (ver figura 30A). Esto es tanto más relevante cuando la pendiente de la FI del 1º PDA es prácticamente idéntica para ambos grupos (figura 30B). El 2º PDA presentó además la máxima frecuencia instantánea en todos los casos estudiados, resultado que coincide con la mayoría de los datos descritos en células de disparo regular (Ogawa et al., 1981; Stafstrom et al., 1984a; Jodkowsky et al., 1988; Moore y Appenteng, 1990) excepto en un grupo de neuronas del cortex sensoriomotor del gato (Stafstrom et al., 1984a), donde la máxima pendiente la tuvo el 3º PDA. Como en estos trabajos, excepto para el grupo de neuronas del cortex sensoriomotor citado por Stafstrom (1984a), la pendiente de la relación FI-I, fué

menor cuanto más lejos del inicio del pulso ocurriese el PDA. Los valores obtenidos para la pendiente de la FI, fueron muy superiores a los descritos en otras áreas del SNC (Stafstrom et al., 1984a; Jodkowsky et al., 1988; Moore y Appenteng, 1990), aunque similares en el caso de las CT a un trabajo previo realizado en la corteza visual del gato (Ogawa, 1981). A pesar de esta mayor pendiente en la relación FI-I, la máxima FI alcanzada no superó los 240 Hz, cuando en motoneuronas se registran frecuencias de hasta 450 Hz (Jodkowsky et al., 1988).

Es muy interesante observar que la curva FI-I para el 2º PDA de las CAI tiene una forma aproximadamente sigmoide. Esto se aprecia en la figura 30 (puntos negros) y en las CAI representadas en la figura 29. En el caso de las CT, la forma de la curva FI-I, se puede interpretar como una sigmoide de pendiente mucho más suave (figuras 29 y 30B), pero en la que se llega al punto de inflexión en el rango de intensidades de estimulación mostrado (CTs de la figura 29). Aunque en la literatura la curva FI-I, se ha interpretado siempre como aproximadamente lineal aunque con distintas fases o pendientes en el rango de estimulaciones probado (Ogawa et al., 1981; Stafstrom et al., 1984a; Jodkowsky et al., 1988; Moore y Appenteng, 1990), en algunos casos presenta una clara morfología sigmoide (Jodkowsky et al., 1988, figura 5C; Moore y Appenteng, 1990, figura 11). La interpretación de la curva como una sigmoide puede ser útil para comprender los mecanismos que originan esta morfología, pues la activación de las conductancias dependientes de voltaje se realiza también según una sigmoide (Hille, 1992).

Con los resultados discutidos hasta ahora se puede elaborar un modelo aproximado de cómo las conductancias iónicas regulan el patrón de disparo en las CAI y CT. En ambos tipos existe la posibilidad de activar con pulsos positivos conductancias subumbrales que llevan el PDM al umbral para la generación del 1º PDA. Esta 1ª parte de la respuesta a pulsos positivos de corriente es muy similar en ambos tipos celulares como lo demuestra el hecho de que no existe ninguna diferencia en la pendiente de la relación FI-I, para el 1º PDA. Una vez generado éste, en las CAI se activa una conductancia despolarizante, que evita una poshiperpolarización como la que se produce en las CT tras este 1º PDA. Esta conductancia despolarizante permite que el 2º PDA, se genere cerca del 1º, produciéndose el agrupamiento de estos dos PDA. La conductancia despolarizante que media este acercamiento no ha sido determinada aunque podría ser una conductancia de alto umbral para el  $Ca^{2+}$  como en el caso de las neuronas piramidales de hipocampo (Traub y Llinás, 1979). También podría intervenir la

conductancia para el  $\text{Na}^+$  de inactivación lenta que ha sido descrita en neocortex (Huguenard et al., 1988). En todo caso, el que el 2º PDA se genere próximo al 1º debe permitir que active más que ningún otro PDA a las conductancias despolarizantes que producen la inflexión de su fase de bajada. Estas conductancias de nuevo pueden ser el  $\text{Ca}^{2+}$  de alto umbral localizado en las dendritas y quizás el  $\text{Na}^+$  de inactivación lenta. La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  activaría a conductancias de  $\text{K}_{\text{Ca}}$  y es posible que la entrada de  $\text{Na}^+$  active a una conductancia de  $\text{K}_{\text{Na}}$  (Schwindt, Spain y Crill, 1989), que originarían la hiperpolarización que sucede tras el 2º PDA. A partir de aquí se debe establecer un equilibrio entre el  $\text{Ca}^{2+}$  que entra a la célula y el que captan los sistemas de tamponamiento de  $\text{Ca}^{2+}$ , con lo que la posthiperpolarización apenas aumenta durante el pulso y por tanto tampoco aumenta la adaptación. En el caso de las CT, parece existir una conductancia para el  $\text{Ca}^{2+}$  de alto umbral mayor que en las CAI, según se puede deducir de la mayor duración de las espigas con TEA. Esta mayor conductancia para el  $\text{Ca}^{2+}$  y quizás una mayor conductancia  $\text{K}_{\text{Ca}}$  o de cinética mas lenta, determina que se desarrolle una corriente hiperpolarizante progresivamente mayor, que determina una pendiente de subida hacia el umbral de disparo cada vez más lenta y por tanto una disminución de la frecuencia de generación de los PDA. El que en las CT los PDA originan una mayor corriente hiperpolarizante, se manifiesta en que el mínimo que alcanza el PDM en cada intervalo interespiga, se encuentra en este grupo celular mucho más desplazado hacia el PDA de la izquierda del intervalo, de lo que lo está en las CAI (compárese figura 13B y D).

No obstante esta diferencia clara en el patrón de disparo de las CT y las CAI en base a su diferente adaptación, a la morfología de los PDA, a la pendiente de la relación FI-I para el 2º PDA y a su modificación con la adición de TEA, hay que señalar que se encontraron algunas células con características intermedias entre los dos grupos. Algunas presentaron adaptación aún después del brote par inicial, o un 2º PDA más duradero que el 3º, pero prácticamente igual al 5º o al 6º, o una pendiente de la relación FI-I del 2º PDA, intermedia entre los valores señalados para las CT y CAI. Por otro lado algunas de las CAI, generaban las dos primeras espigas ya agrupadas para estimulaciones de poca intensidad, de forma que no había en su patrón de disparo una transición de patrón tónico con poca intensidad de estimulación a un patrón con agrupamiento inicial para mayores intensidades. Se puede decir por tanto que existe un gradiente en el patrón de disparo de las células que se registraron en la capa II-III de la corteza visual del cobaya. Este gradiente puede ser el reflejo de una maduración neuronal, como se ha apuntado antes o/y puede deberse a que las

células gracias a su distinto patrón de disparo, forman un circuito sináptico que realiza una función compleja, como ocurre en la formación reticular del puente donde el disparo de neuronas con disparo agrupado, neuronas con agrupamiento inicial, neuronas tónicas y neuronas de pausa, forman un circuito que origina los movimientos sacádicos en el plano horizontal (Goldberg, Eggers y Gouras, 1991). En la corteza visual del gato la estimulación visual origina oscilaciones del PDM de una frecuencia entre 30 y 60 Hz, estando sincronizadas células pertenecientes a columnas distintas (Jadadeesh, Gray y Ferster, 1992). En nuestras condiciones experimentales las CAI podrían actuar como un generador de una frecuencia de  $\approx$  20 Hz, pues como se observa en las figuras 27 y 28, tienden a disparar a esa frecuencia independientemente de la intensidad de estimulación o el PDM al que se encuentren. Las CT en cambio tendrían una respuesta lineal a la intensidad de la corriente originada por sus aferencias sinápticas.

Además de la adaptación inicial en un pulso de corriente intracelular que se ha analizado en los párrafos anteriores, las neuronas presentaron también una **adaptación a largo plazo**, es decir una disminución en la frecuencia de generación de PDA, cuando se las estimula de forma repetida (Llinás y López-Barneo, 1988; Schwindt, Spain, Foehring, Chubb y Crill, 1988; Schwindt et al., 1989). Se ha postulado que la causa de esta disminución en la excitabilidad de las neuronas puede ser el desarrollo de conductancias hiperpolarizantes que se activen lentamente (Schwindt et al., 1988a). Esta adaptación a largo plazo puede ser por tanto uno de los mecanismos implicados en la habituación sensorial. En algunos casos, la habituación se debe fundamentalmente a un mecanismo de depresión presináptica (Furakawa, Hayashida y Masuura, 1978), en otros casos en cambio, una disminución de la excitabilidad postsináptica puede jugar también un papel fundamental (Schwindt et al., 1988a; Schwindt et al., 1989).

Para estudiar la adaptación a largo plazo en la corteza visual, se aplicó un estímulo repetido de 300 ms, de forma similar a lo realizado en otras estructuras de la vía visual (Llinás y López-Barneo, 1988), donde esta adaptación a largo plazo del elemento postsináptico reveló tener un curso temporal muy parecido al mostrado por las mismas células en el animal intacto (Horn y Hill, 1966; Oyster y Takahashi, 1975). Se encontró una disminución de la excitabilidad de las células (ver figura 32), que fué paralela a la hiperpolarización que se desarrollaba con el estímulo repetido (figura 33). No obstante, en la disminución de excitabilidad debieron intervenir también otros factores como una disminución de la RE de la célula, pues cuando se

hiperpolarizaba la neurona con corriente negativa la disminución en el número de PDA fué menor. El desarrollo de esta adaptación se ha relacionado con la activación de conductancias de  $K_{Ca}$  (Llinás y López-Barneo, 1988) y también de  $K_{Na}$  (Schwindt et al., 1988a; Schwindt et al., 1989). Esto concuerda con el resultado de que al aumentar la frecuencia de estimulación, aumenta la adaptación obtenida por el mismo estímulo, pues probablemente los iones de  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$  alcanzan mayores concentraciones intracelulares con una frecuencia de estimulación mayor. Aunque los resultados relativos a la adaptación a largo plazo se presentaron en células tónicas, resultados similares se obtuvieron en las células de agrupamiento inicial.

Por lo tanto, en la capa II-III del cortex visual del cobaya se pueden distinguir dos tipos de patrones de disparo atendiendo a la adaptación inicial que muestran con pulsos rectangulares de corriente transmembranaria, a la morfología de los PDA, a la relación FI-I del 2º PDA y al efecto que se obtiene con TEA. Estos diferentes patrones de disparo podrían tener relevancia en el procesado de la información a nivel central y/o podrían ser el resultado de distintos grados de maduración neuronal. Por otro lado ambos tipos mostraron una adaptación a largo plazo similar a la descrita en otras estructuras del sistema nervioso central.

### 3. Componentes de la respuesta postsináptica en células del área CA1 del hipocampo

Se estudiaron las características de los potenciales postsinápticos obtenidos en neuronas del área CA1 del hipocampo, al estimular extracelularmente en el *stratum radiatum*, siguiendo el protocolo expuesto en la sección "Material y Métodos" (apartado 4.3). Los valores obtenidos en estas células para el PDM (-62,5 mV), la amplitud del PDA (88,6 mV) y la RE (42,1 M $\Omega$ ), son similares a los descritos previamente en la literatura (Collingridge et al., 1988; Andreasen et al., 1989). En la respuesta postsináptica se pudieron distinguir dos componentes excitatorios. El 1º apareció en todos los casos, mostró una latencia de 2,7 ms, su amplitud dependió de la intensidad de estimulación y nunca presentó refractariedad a la estimulación, todo lo cual sugiere un origen monosináptico. El 2º componente se encontró en el 43 % de los casos y generalmente tuvo un umbral de aparición mayor que el componente monosináptico. Presentó además una serie de características propias de un origen polisináptico (Berry y Pentreath, 1976). Así su aparición en forma todo o nada, sugiere que era necesaria la activación de una célula intermedia entre las fibras

estimuladas y la célula que se estaba registrando. Su gran amplitud además sugiere que es el resultado de la aferencia sincrónica de un grupo de células. Su latencia de aparición osciló entre 16 y 74 ms, tiempos que permiten la activación de una estructura intermedia. La latencia tuvo una gran variabilidad incluso para una misma célula, lo que puede depender del tiempo que tarde en producirse un brote sincrónico en la estructura intermedia. La disminución de esta latencia al aumentar la intensidad de estimulación, concuerda con la interpretación dada. Asimismo el aumento de latencia y en ocasiones refractariedad del 2º componente con una frecuencia de estimulación de 1 Hz se pueden explicar por la hiperpolarización que sufriría la estructura intermedia tras la terminación del brote (Traub y Dingledine, 1990; Ben-Ari y Gho, 1988). La aparición de varios picos en el 2º componente y su reducción con la estimulación a 1 Hz, sugieren la participación de distintos circuitos polisinápticos convergiendo en el área CA1. Por otra parte la aparición espontánea de este componente polisináptico, indica que sus características no dependen de nuestra estimulación. Que en ocasiones aparezca de forma repetida tras una estimulación se puede deber a que el circuito polisináptico sea reverberante cerrándose en sí mismo.

En el hipocampo las distintas estructuras que lo componen cierran un circuito polisináptico, formado por el área CA3, área CA1, subiculum, cortex entorrinal, giro dentado y área CA3, cerrando el circuito (Bayer, 1985). Además de estas conexiones existen otras intermedias, así el área CA1 también proyecta sobre el cortex entorrinal y éste lo hace sobre las áreas CA1 y CA3 (Bayer, 1985). Existen por tanto las estructuras anatómicas necesarias para que ocurra una activación polisináptica y ésta ha sido la explicación dada al componente polisináptico que aparece en el área CA3, tras el tratamiento de la sección con ácido kaínico (Ben-Ari y Gho, 1988) o bloqueando la inhibición gabaérgica (Wong y Traub, 1983), aunque las propiedades intrínsecas de algunas neuronas podrían contribuir a este tipo de respuesta (Johnston y Brown, 1981; Dingledine et al., 1986).

El estudio de la participación de receptores NMDA y no-NMDA en la respuesta sináptica, se realizó mediante la aplicación de antagonistas específicos. La adición a la solución externa de CNQX (antagonista de receptores glutamatérgicos no-NMDA), originó la desaparición del componente polisináptico y una gran disminución del monosináptico (ver figura 38). La aplicación de APV (antagonista de los receptores NMDA), resultó en una disminución menor del componente monosináptico y también abolió el componente polisináptico, si bien en este caso se



pudo obtener de nuevo aumentando la intensidad de estimulación presináptica. La participación de ambos tipos de receptores en el componente monosináptico y polisináptico, y que aún con los receptores NMDA bloqueados, se pueda obtener el componente polisináptico ha sido descrito también en amígdala de rata (Gean y Chang, 1991a; Gean y Chang, 1991b). La participación de los receptores NMDA, en la aferencia normal sináptica al área CA1 fué en principio negada (Collingridge et al., 1988), dándose como explicación el bloqueo que el  $Mg^{2+}$  ejercería a PDM de reposo en el canal iónico asociado con el receptor NMDA. No obstante nuestros resultados concuerdan con datos más recientes en los que se ha descrito la participación de los receptores NMDA en la aferencia normal a las células CA1 (Bashir, Alford, Davies, Randall y Collingridge, 1991; Berretta, Berton, Bianchi, Brunelli, Capogna y Francesconi, 1991).

Los resultados del análisis farmacológico indican que en los dos componentes de la respuesta sináptica participan receptores de tipo NMDA y no-NMDA. Por otra parte apoyan el origen polisináptico del 2º componente de la respuesta sináptica, pues cualquier disminución de la excitabilidad de las células intermedias, puede resultar en que no se genere disparo en ellas con lo que el circuito queda interrumpido. Un origen polisináptico es además la única explicación a que con APV desaparezca este 2º componente, pero que se pueda volver a obtener en algunas ocasiones aumentando la intensidad de estimulación, bastando por tanto los receptores no-NMDA para mantener el circuito polisináptico, de forma similar a lo descrito en la amígdala (Gean y Chang, 1991a; Gean y Chang, 1991b).

#### **4. Variación de la aferencia sináptica al área CA1 tras el tratamiento con NMDA o alto potasio extracelular**

Dada la participación de los receptores NMDA en la respuesta sináptica (ver apartado anterior) y la implicación de este tipo de receptor glutamatérgico en fenómenos de plasticidad sináptica (Goddard, McIntire y Leech, 1969; Bliss y Lomo, 1973; Schwartzkroin y Wester, 1975; King, Dingledine, Giacchino y McNamara, 1985), se estudió si la aplicación de NMDA a la sección resultaba en alguna modificación de la respuesta sináptica. La adición de NMDA 20  $\mu M$  a la solución externa originó una despolarización que se debió probablemente por una parte a su acción en los receptores NMDA de las propias células CA1 y por otra a la aferencia sináptica desde el área CA3 pues sus neuronas piramidales también tienen

receptores NMDA (Ben-Ari y Gho, 1988; King, Cherubini y Ben-Ari, 1989). Los brotes que se observaron durante la despolarización antes de mostrar un disparo tónico, probablemente se debieron a despolarizaciones sincrónicas en el área CA3 (Ben-Ari y Gho, 1988), pues en 2 células en que se hiperpolarizó el PDM cuando se tenía un disparo tónico, no se obtuvo de nuevo el disparo en brotes, como cabría esperar si se debieran a la acción del NMDA en la célula que se estaba registrando. Por lo tanto cabe pensar que las células CA3, se encontraran lo suficientemente despolarizadas como para presentar un disparo tónico, similar al registrado en la célula CA1.

El efecto de la aplicación de agonistas de los receptores NMDA en el área CA1, en secciones de cerebro, ha sido estudiado anteriormente utilizando técnicas de registro extracelular, encontrándose una potenciación transitoria de la respuesta sináptica (Collingridge et al., 1983; Kauer et al., 1988; Thibault, Joli, Muller, Schottler, Dudek y Lynch, 1989). Mediante registro intracelular en el presente estudio se ha mostrado que este efecto se debe a una potenciación de la respuesta postsináptica obtenida en las células CA1. Como en los trabajos anteriores, se encontró que tras la administración de NMDA, se producía una depresión de la respuesta sináptica, probablemente debida a desensibilización de los receptores (Kislin, Krishtal y Tsyndrenko, 1986) y no sólo a la despolarización causada por los agonistas como se había postulado (Thibault et al., 1989), pues en nuestro estudio se reinició la estimulación sólo cuando se había recuperado el PDM inicial. En este estudio se ha podido constatar además que en cada célula la duración de la depresión observada estaba en relación directa con la duración de la potenciación que se alcanzaba después.

Otro aspecto interesante que permitió analizar el registro intracelular y que no se puede estudiar mediante registro extracelular fué la relación de las modificaciones en la amplitud del potencial postsináptico con la variación de la resistencia de entrada (RE). De esta forma se puede saber si parte de la potenciación sináptica se debe a cambios generales en la membrana postsináptica o, si no existen estos, a modificaciones en la relación sináptica. Tras la vuelta al PDM original, se encontró siempre una RE incrementada, que continuó aumentando hasta 20 min después del restablecimiento del PDM (ver figura 42). Como el máximo de la potenciación del componente monosináptico se alcanzó a los 14,4 min, resulta que en los  $\approx 6$  min después de que ocurriera este máximo, el PPSE comenzó a disminuir en amplitud a pesar de que la RE continuaba aumentando. Todo lo anterior implica que tanto la

depresión inicial como la potenciación sináptica no dependieron de las modificaciones que ocurrían de forma paralela en la RE de la membrana postsináptica. También se deduce que la depresión fué mayor de lo registrado, pues estaba compensada por el aumento de RE, y la potenciación menor, pues se debía en parte a una RE incrementada.

Además del efecto sobre el PPSE monosináptico, el resultado más sobresaliente de la aplicación de NMDA fué la aparición de un 2º componente en la respuesta sináptica, en células que previamente no lo mostraban. Este resultado no ha sido referido anteriormente en el área CA1 (Collingridge et al., 1983; Kauer et al., 1988; Thibault et al., 1989) quizás porque el subiculum y el cortex entorrinal habían sido eliminados de la sección, mientras que en nuestro estudio se conservaban. Por otra parte la aparición de un 2º componente en la respuesta sináptica ha sido descrita en el área CA3 del hipocampo tras la aplicación de ácido kaínico (Ben-Ari y Gho, 1988) o de NMDA (King et al., 1989) y puesto que las neuronas piramidales del área CA3 proyectan en CA1, el componente polisináptico obtenido en este estudio sería consecuencia de la activación de un 2º componente en el área CA3.

La obtención en la respuesta sináptica de componentes adicionales al inicial monosináptico, se ha utilizado como modelos experimentales de epilepsia, tanto en hipocampo como en neocortex. Esto se consigue utilizando antagonistas gabaérgicos como la picrotoxina (Dingledine et al., 1986; Lee y Hablitz, 1991), la penicilina (Schwartzkroin y Prince, 1978; Gutnick, Connors y Prince, 1982) o la bicuculina (Gutnick et al., 1982; Dingledine et al., 1986), por lo que uno de los mecanismos que se ha postulado como responsable de la aparición de epilepsia ha sido la disminución de la inhibición. No obstante en la exploración de animales en los que se ha realizado "kindling" (protocolo experimental en el que mediante una estimulación tetánica diaria, generalmente a una frecuencia de 60 a 100 Hz durante 1 s, en una zona epileptogénica del SNC de un animal completo, se consigue que éste responda de forma epiléptica a la estimulación), se ha encontrado una disminución de la inhibición gabaérgica (King et al., 1985; Gean et al., 1989), un aumento (Tuff, Racine y Adamec, 1983; Oliver y Miller, 1985) o ningún cambio (Mody, Stanton y Heinemann, 1988). De forma interesante en el estudio realizado por Ben-Ari y Gho (1988) con el ácido kaínico en el área CA3, no encontraron ninguna modificación en los potenciales postsinápticos inhibitorios y se han establecido modelos matemáticos que permiten predecir la aparición de brotes epilépticos en presencia de inhibición (Traub, Miles y Wong, 1987; Traub, Miles, Wong, Schulman y Scheneiderman,

1987), aunque naturalmente el umbral de aparición de estos brotes disminuye si se modela una inhibición menor. En nuestro estudio tampoco se encontró una disminución de los potenciales postsinápticos inhibitorios tras la aplicación de NMDA (ver figuras 43, 46 y 47), existiendo en general un pequeño aumento, lo que se puede explicar porque la aferencia a las interneuronas que median la inhibición en CA1, es también glutamatérgica (Hablitz y Langmoen, 1986; Andreasen et al., 1989; Andreasen y Lambert, 1991) y por tanto susceptible de potenciación con el tratamiento con NMDA. Por otra parte aún no existiendo ningún cambio en la corriente sináptica inhibitoria, el aumento de la RE determinaría un aumento del potencial inhibitorio que se registre. No obstante no se puede descartar que exista una disminución de la inhibición en otras áreas de la sección.

Otro posible mecanismo de generación del componente polisináptico, es una potenciación similar a la obtenida en el componente monosináptico en CA1, en los potenciales postsinápticos que ocurran en otras áreas, como la CA3, en la que existe un complejo circuitaje reverberante (Christian y Dudek, 1988b), y que ha sido propuesta como la zona de inicio de los brotes epilépticos en el hipocampo (MacVicar y Dudek, 1980; Miles y Wong, 1986). En este sentido es interesante resaltar el hecho de que, en promedio, el 2º componente apareció en promedio a los 13,2 min de la normalización del PDM, es decir 1,2 min antes de que ocurriese el máximo de la potenciación del componente monosináptico, lo que apoya la idea de que su generación se deba a una potenciación sináptica similar en otras estructuras previas del hipocampo (Montoro, Díaz-Nido, Avila y López-Barneo, 1993).

Un resultado que también vincula la etiopatología de la epilepsia con la activación de los receptores NMDA, fué el efecto aditivo que tuvo la aplicación de dosis bajas de NMDA (figura 46). Un resultado paralelo se obtuvo mediante la aplicación del estímulo tetánico de forma repetida (ver figura 49). Estos resultados apoyan la hipótesis de que la base celular del fenómeno conocido como "kindling", sea la aparición de potenciales polisinápticos reverberantes, que en el animal completo pueden integrarse en circuitos sinápticos más complejos debidos a las interacciones que ocurren según el eje longitudinal del hipocampo (Miles, Traub y Wong, 1988). En este sentido es interesante resaltar el hecho de que se encuentren estos componentes polisinápticos en secciones de amígdala de animales sometidos a "kindling" (Gean et al., 1989) y que la estimulación tetánica repetida ha originado en secciones de hipocampo de cobaya (Slater et al., 1985), componentes polisinápticos sensibles a APV de forma similar a lo expuesto en el presente trabajo.

Las características del componente obtenido tras la aplicación de NMDA fueron las de una respuesta polisináptica (ver figuras 44 y 45), siendo indistinguible del componente polisináptico que se encontraba en algunas células sin ningún tratamiento farmacológico, por lo que es posible que en estas últimas sea inducido durante el proceso de obtención de las secciones, debido a la hipoxia y al daño que supone el corte del tejido (Choi, 1990). No obstante el reclutamiento de circuitos latentes es un proceso que se ha relacionado con la reorganización que ocurre en el cortex somatosensorial tras una extensa deaferentación (Pons, Garraghty, Ommaya, Kaas, Taub y Mishkin, 1991), en la corteza motora tras la sección de nervios periféricos (Jacobs y Donoghue, 1991) y la aparición de circuitos polisinápticos tras la estimulación tetánica en el hipocampo (Miles y Wong, 1987).

En el hipocampo se han descrito relaciones sinápticas excitadoras entre neuronas pertenecientes al área CA1 (Christian y Dudek, 1988b) y también entre neuronas del área CA3 (Christian y Dudek, 1988a). Para saber si las relaciones sinápticas contenidas en el área CA1 eran las responsables de la aparición del componente polisináptico tras el tratamiento de la sección con NMDA, se realizó el protocolo en algunas ocasiones con la sección cortada entre el área CA1 y CA3. El resultado (figura 47) fué una potenciación del componente monosináptico según lo descrito anteriormente, pero sin que se obtuviese el componente polisináptico. Esto concuerda con lo encontrado en el hipocampo de cobaya, donde el corte de la sección entre el área CA1 y CA3, evita la aparición de actividad epiléptica en el área CA1 tras la adición de penicilina, pero no en el área CA3 (Schwartzkroin y Prince, 1978). Asimismo ha sido descrita la capacidad de una única célula piramidal del área CA3, para iniciar un brote sincrónico en este área (Miles y Wong, 1986). Aunque en nuestro estudio no se puede descartar que el componente polisináptico también se pueda originar en estructuras anteriores al área CA3 según se indicó anteriormente, sí parece necesaria esta estructura para permitir que la activación polisináptica alcance el área CA1.

La adición de NMDA a la solución externa, probablemente indujo una despolarización generalizada de la sección, pues también se han descrito este tipo de receptor glutamatérgico en el área CA3, giro dentado y corteza entorrinal (Zalutsky y Nicoll, 1990; Bliss y Lomo, 1973; Alonso et al., 1990), por lo que se estudió la especificidad de los efectos del NMDA, comparando sus efectos con los de la aplicación de otra sustancia que provocase una despolarización de similares

características. Esta despolarización se consiguió con una solución externa con una alta concentración de  $K^+$  (AKE), en la que se había reemplazado el  $ClNa$  por  $ClK$  (tabla 1). Aún con una despolarización de amplitud y duración semejantes, tras la recuperación del PDM inicial, la depresión que se registró tras AKE fué de menor amplitud y duración a la obtenida tras el NMDA (ver tabla 6). Esto se pudo deber a una menor entrada de  $Ca^{2+}$  al interior celular con el protocolo de AKE, pues el NMDA, además de ocasionar la despolarización debió mediar la entrada de este ión a través de los canales iónicos asociados a los receptores NMDA (Jahr y Stevens, 1987; Mayer y Westbrook, 1987; Asher y Nowak, 1988), y también se pudo producir una mayor desensibilización (Kiskin et al., 1986).

Como en el caso de la aplicación de NMDA, el AKE originó tras la depresión inicial una potenciación de la respuesta sináptica (figura 51). Esta potenciación se debió probablemente a la acción del glutamato liberado desde los terminales presinápticos durante la despolarización. No obstante estas similitudes entre los dos protocolos, tras el AKE no se obtuvo el componente polisináptico en células que no lo presentaban previamente, de lo que se deduce que el efecto de ambos protocolos fué distinto en las estructuras responsables de la aparición del componente polisináptico. En este sentido con el AKE no se originaron brotes durante la fase de despolarización, probablemente porque el NMDA y la consiguiente activación de este receptor glutamatérgico, facilite el disparo sincrónico en el área CA3 (King et al., 1989), que a su vez originan los brotes en las células CA1. Es también interesante que con una despolarización algo mayor en el caso de la despolarización con AKE, sólo en dos células ocurrió luego una hiperpolarización, lo que puede deberse a que esta hiperpolarización se deba a una liberación retrasada de  $Ca^{2+}$  de compartimentos intracelulares, según se ha descrito para el NMDA en células aisladas de hipocampo (Connors, Wadman, Hockberger y Wong, 1988). La necesidad de la activación de mensajeros intracelulares para la generación del componente polisináptico también parece deducirse de su retraso de aparición con respecto al momento de estímulo.

Para estudiar el efecto que la despolarización tenía en el elemento postsináptico se despolarizó éste con corriente continua. Aunque el resultado no fué constante en las distintas células en que se realizó el protocolo, parece que efectivamente la entrada de  $Ca^{2+}$  en el elemento postsináptico por canales dependientes de voltaje originó una depresión, pues cuando se obtenían espigas de  $Ca^{2+}$  como las mostradas en la figura 52A, se favoreció la aparición de una depresión. Esta depresión fué

menor a la que se obtuvo con AKE, aún con despolarizaciones de amplitud y duración similares, probablemente por no afectarse con la despolarización con corriente continua el elemento presináptico, con lo que no hubo liberación de neurotransmisores durante la despolarización, ni acción de estos por tanto en los receptores postsinápticos. La recuperación de la depresión presentó una morfología en doble fase parecida a la encontrada durante la normalización de la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  en el cono de crecimiento en neuronas simpáticas, cuando se realiza una despolarización con alto  $K^+$  extracelular (Lipscombe, Madison, Poenie, Reuter, Tsien y Tsien, 1988).

### **5. Variación del estado de fosforilación de la proteína tipo 2 asociada a los microtúbulos por la aplicación de N-metil-D-aspartato y alto potasio extracelular**

Se realizaron experimentos paralelos a los electrofisiológicos para determinar las variaciones que producían en el estado de fosforilación de la proteína tipo 2 asociada a microtúbulos (MAP2). Este estado de fosforilación regula la asociación de esta proteína a los microtúbulos (Murthy y Flavin, 1983; Akiyama et al., 1986; Díaz-Nido et al., 1990; Hoshi, Ohta, Gotoh, Mori, Murofushi, Sakai y Nishida, 1992). Así la desfosforilación de la MAP2, permite una mayor asociación de esta proteína a los microtúbulos (Tsuyama, Terayama y Matsuyama, 1987; Díaz-Nido et al., 1990), con lo que se obtiene un citoesqueleto más estable (Matus, 1988).

La aplicación de NMDA produjo la desfosforilación de la MAP2 de una forma bastante selectiva, pues la mayoría de las proteínas no modificaron su estado de fosforilación o lo aumentaron (ver figura 54). Este aumento de fosforilación en algunas bandas quizás tenga repercusión funcional, pero no fué analizado en mayor profundidad. La disminución de la fosforilación de la banda con la movilidad electroforética de la MAP2, no se debió a una proteólisis de esta proteína, pues la cantidad de MAP2 existente en secciones tratadas o no con el NMDA, resultó ser la misma cuando se estudió mediante un anticuerpo policlonal antiMAP2 (figura 55). Aunque se ha indicado que la activación de los receptores NMDA puede activar unas proteasas dependientes de  $Ca^{2+}$ , las calpaínas (Siman, Noszek y Kegerise, 1989), no se ha encontrado ninguna proteólisis de las proteínas del citoesqueleto tras realizar "kindling" (Wu, Wasterlain, Sachs y Siekevitz, 1990) o tras un tratamiento similar al nuestro en secciones de cerebro (Halpain y Greengard, 1990). Así pues parece que la

proteolisis sólo ocurriría tras una prolongada activación de los receptores NMDA (Siman et al., 1989).

Puesto que la activación de los receptores NMDA produce un aumento de la permeabilidad para el  $\text{Ca}^{2+}$  (Mayer y Westbrook, 1987; Ascher y Nowak, 1988), se estudió la posibilidad de que la desfosforilación producida por NMDA, estuviese mediada por fosfatasas dependientes del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina. Para ello se aplicó NMDA en presencia de calmidazolium, que bloquea la interacción de la calmodulina con otras proteínas, encontrándose una inhibición parcial de la desfosforilación inducida por NMDA (ver figura 56). El complejo  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina puede activar diversas fosfatasas de proteínas como la proteína fosfatasa 1, la 2A y la calcineurina, una isoenzima de la proteína fosfatasa 2B. La participación de las dos primeras fué descartada utilizando un inhibidor de ambas, el ácido okadaico, en presencia del cual la desfosforilación inducida por NMDA tuvo una magnitud similar. Independientemente de no inhibir esta desfosforilación, el ácido okadaico produjo un aumento del estado de fosforilación de la MAP2 (figura 57, parte C), esto pudo ser debido no sólo a la inhibición de las proteína fosfatasas 1 y 2A, sino también por la activación de kinasas de MAPs, de forma similar a lo descrito *in vitro* (Miyasaka, Miyasaka y Saltiel, 1990).

La desfosforilación de la MAP2 se realizó fundamentalmente en los péptidos de 54 y 42 KDa (figura 58), lo cual tiene una gran importancia funcional pues estos péptidos contienen la zona de unión de la MAP2 a la tubulina (Hernández et al., 1987), e *in vitro* se ha demostrado que la fosforilación de esta zona resulta en una disminución de la capacidad de unión de la MAP2 a la tubulina (Hoshi et al., 1988; Hoshi et al., 1992), lo que originaría un citoesqueleto más inestable (Matus, 1988). La desfosforilación de la MAP2 resultaría lógicamente en el efecto opuesto y esto puede tener relevancia en la modificación del citoesqueleto de las densidades postsinápticas de las espinas dendríticas, dada la abundancia de MAP2 en esta localización (Cáceres, Banker, Steward, Binder y Paine, 1984; Matus, 1988; Morales y Fifkova, 1989).

El otro protocolo utilizado en los experimentos de electrofisiología, el empleo de una solución externa con una alta concentración de  $\text{K}^+$ , tuvo el efecto opuesto en el estado de fosforilación de la MAP2: originó un aumento de su fosforilación. Con este protocolo se quiso inducir una entrada selectiva de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior celular a través de los canales dependientes de voltaje de alto umbral, para comparar su efecto con la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  por los canales asociados a los receptores NMDA. Como se



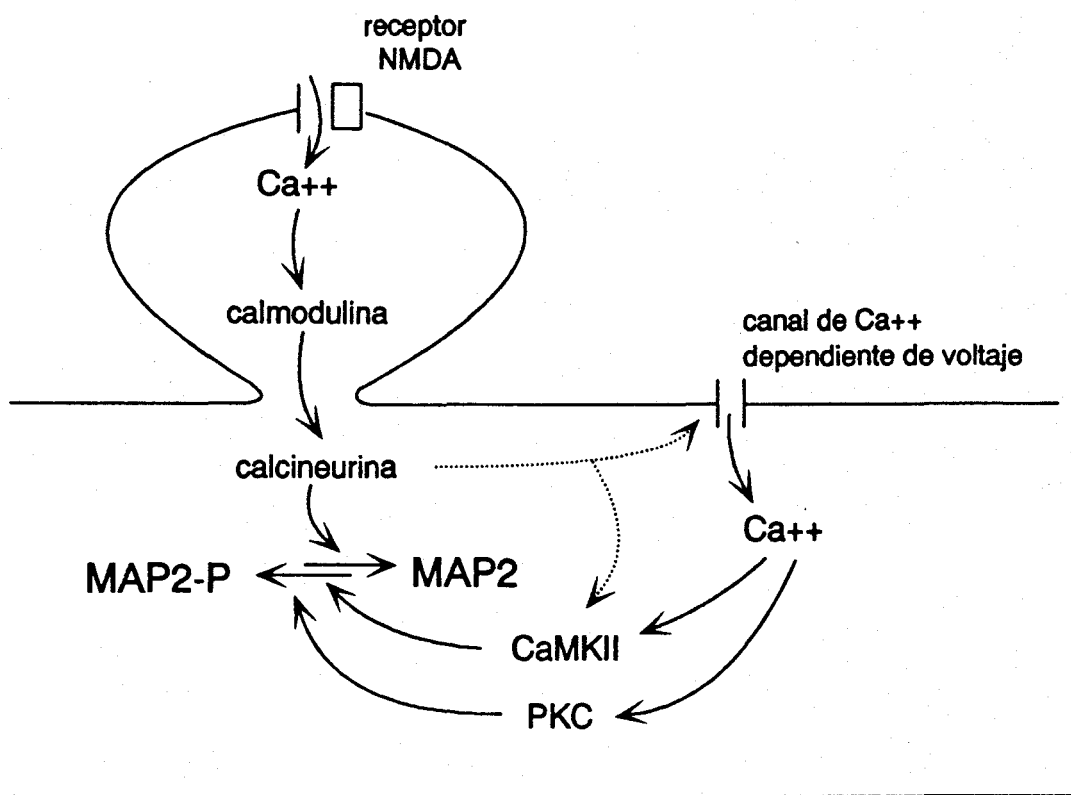
indicó en la discusión de los experimentos de electrofisiología, este protocolo puede liberar glutamato de los terminales presinápticos. Para evitar que este glutamato actuase en los receptores NMDA a nivel postsináptico, se realizó también el tratamiento con AKE, en presencia de APV. El resultado fué un aumento aún mayor de la fosforilación producida por AKE, lo que indica que efectivamente, el glutamato liberado por la despolarización que el AKE produce en el terminal presináptico, al actuar sobre los receptores NMDA, induce una desfosforilación de la MAP2, de la misma forma que hemos mostrado que hace el NMDA aplicado a la solución externa.

La entrada de  $Ca^{2+}$  al interior celular puede activar a la proteína kinasa C (PKC) y a la  $Ca^{2+}$ /calmodulina kinasa tipo II (CaMKII). El H7, un inhibidor de la PKC pero no de la CAMKII (Kawamoto y Hidaka, 1984; Hidaka, Hagiwara y Chijwa, 1990), inhibió la fosforilación producida por el tratamiento con AKE. Este resultado implica a la PKC en esta fosforilación lo que coincide con lo obtenido para la fosforilación de la MAP2 *in vivo* (Tsuyama et al., 1986; Díaz-Nido et al., 1990). Por otra parte si se compara el mapa peptídico de la MAP2 obtenida tras la fosforilación que la PKC o la CAMKII realizaron sobre la MAP2 purificada, con el mapa peptídico de la MAP2 fosforilada en las secciones de cerebro (figura 61A), éste parece resultar de la combinación de los obtenidos con PKC y CAMKII, pero los péptidos de 54 y 42 KDa, que han sido propuestos como la zona de unión a la tubulina (Hernández et al., 1987), están más fosforilados tras la acción de la PKC que en la fosforilación producida por la CAMKII.

Una posible explicación de los resultados opuestos obtenidos en la fosforilación de la MAP2 con NMDA y AKE, sería que con cada protocolo se alcanzaran distintas concentraciones intracelulares de  $Ca^{2+}$ , activándose con una concentración las kinasas y con otra las fosfatasas (Lissman, 1989; Klee, 1991). Otra posibilidad se muestra en el modelo esquematizado en la figura 62, según el cuál lo importante para determinar la acción del  $Ca^{2+}$  sería el lugar por donde accede al interior celular (Díaz-Nido, Montoro, López-Barneo y Avila, 1993), si lo hace a través del canal asociado a un receptor NMDA, encontraría fundamentalmente fosfatasas de la MAP2, mientras que si lo hace a través de una canal de  $Ca^{2+}$  dependiente de voltaje, activaría de forma predominante a las kinasas, según los resultados presentados en el presente trabajo. Es interesante destacar la acción inhibitoria que la vía de las fosfatasas puede ejercer sobre la vía de las kinasas (líneas de puntos en el esquema). En este sentido se ha descrito que la activación de la calcineurina resulta

en una inactivación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje, mediante la desfosforilación de los mismo (Armstrong, 1989), inhibiendo por otra parte a la CaMKII (Wu et al, 1990).

Para el modelo anterior es por tanto necesaria una localización espacial separada de los dos tipos de canales para el  $\text{Ca}^{2+}$  y una distribución heterogénea de las enzimas, con una mayor riqueza de las fosfatasas de MAP2 en la proximidad del receptor de NMDA y un predominio de kinasas cerca del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  de alto umbral. El receptor de NMDA parece que se localiza en la espina dendrítica, pues la



**Figura 62.** Modelo de la fosforilación de la MAP2 dependiendo de si la vía de entrada del  $\text{Ca}^{2+}$  al interior celular es el canal asociado al receptor NMDA (localizado en la espina dendrítica) o el canal de  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente de voltaje (localizado en el tallo dendrítico). Aunque se ha representado la MAP2 en el tallo dendrítico para conjugar ambas vías enzimáticas en el esquema, también se localiza en la espina dendrítica. Las flechas con línea continua expresan activación, mientras que las de línea discontinua expresan inactivación o inhibición.

estimulación presináptica origina un aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular restringido a las espinas (Müller y Connor, 1991). Por otro lado los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de alto umbral tipo L, se localizan sobre todo en el soma y tallo

proximal de las dendritas (Westenbroek, Ahlijanian y Catterall, 1990; Ca<sup>2+</sup>), mientras que los canales de Ca<sup>2+</sup> tipo N y P se distribuyen fundamentalmente en el tallo distal de las dendritas (Jones, Kunze y Angelides, 1989; Llinás, Sugimori, Hillman y Cherksey, 1992). No obstante también se han encontrado en las espinas dendríticas canales de Ca<sup>2+</sup> voltaje dependientes tipo P (Llinás et al., 1992) y N (I. Fariñas, comunicación personal), cuya activación podría contribuir en esta localización con el receptor NMDA a la activación de la calcineurina a nivel de la espina. Por otra parte, aunque no se sabe si existe una distribución preferencial de las enzimas que participan en el modelo propuesto, se ha descrito la asociación de la isoforma  $\beta$ II de la PKC con los microtúbulos del tallo dendrítico, mientras que la isoforma  $\gamma$  estaría en las espinas dendríticas (Kose, Ito, Saito y Tanaka, 1990).

En resumen, en el presente trabajo se ha expuesto como la aferencia sináptica a una determinada neurona puede modificarse, dependiendo del tipo de activación a que se vea sometida. También se ha mostrado como en paralelo a estas modificaciones, se producen variaciones en el estado de fosforilación de la proteína tipo 2 asociada a los microtúbulos, que aunque no podemos determinar su significado funcional, sí se puede asegurar que tienen una gran especificidad para el tipo de estímulo aplicado. Por otra parte en la corteza visual se ha expuesto como además de la aferencia sináptica, la integración que en cada momento realizan las neuronas de esta aferencia, depende de las conductancias dependientes de voltaje que exprese en su membrana plasmática. Estas conductancias median el paso de iones al interior celular, que a su vez pueden activar cascadas enzimáticas como las aquí consideradas que a su vez modifiquen la importancia relativa de cada aferencia sináptica. En este sentido sería muy sugestivo que la entrada de Ca<sup>2+</sup> al interior celular por distintas vías, tenga efectos opuestos en el citoesqueleto, pues podría ser uno de los mecanismos implicados en la selección que durante la ontogenia realizan las neuronas de las aferencias que les llegan, selección en la que las aferencias excitadoras que consiguen el disparo neuronal se ven reforzadas, mientras que este disparo postsináptico debilita de forma paralela a aquellas sinapsis que no intervienen en su generación (Hebb, 1949; Chiba, Shepherd y Murphey, 1988; Constantine-Paton, Cline y Debski, 1990).

## CONCLUSIONES

En el presente trabajo se han estudiado las propiedades electrofisiológicas intrínsecas de las neuronas de la capa II-III de la corteza visual del cobaya, con la técnica de registro intracelular del potencial de membrana en secciones de cerebro *in vitro*. También se han estudiado las modificaciones producidas por el tratamiento de secciones de cerebro con N-metil-D-aspartato (NMDA) o alto potasio extracelular en la respuesta sináptica obtenida en el área CA1 del hipocampo y en el estado de fosforilación de la proteína tipo 2 asociada a los microtúbulos (MAP2). Las conclusiones más importantes son:

- 1) En la capa II-III de la corteza visual del cobaya se pueden distinguir dos grupos de neuronas, que hemos denominado "células tónicas" y "células de agrupamiento inicial", atendiendo a sus propiedades electrofisiológicas intrínsecas estudiadas con pulsos de corriente transmembranaria. Esta diferenciación se basa en la adaptación que presentan en la frecuencia de disparo durante un pulso de corriente, la morfología del 2º potencial de acción (PDA), el valor para el 2º PDA de la relación frecuencia instantánea / intensidad del pulso y la modificación del patrón de disparo ocasionado por la adición al medio externo de tetraetilamonio.
- 2) Las neuronas tónicas presentan un potencial de membrana de  $-67,5 \pm 4,9$  mV (media  $\pm$  DE), una resistencia de entrada de  $36,7 \pm 10,6$  M $\Omega$  y una constante de

tiempo de 8,3 ms. El 1<sup>er</sup> PDA que se registra durante un pulso de corriente intracelular tiene un umbral de  $30,3 \pm 5,4$  mV, una amplitud de  $89,3 \pm 6,6$  mV, una duración de  $0,73 \pm 0,1$  ms, una pendiente de subida de  $148,4 \pm 21,8$  V/s y una pendiente de bajada de  $85,1 \pm 18,7$  V/s. Estas células mostraron una adaptación progresiva de la frecuencia de disparo durante un pulso de 300 ms de duración. Asimismo la duración de los PDA que se originan durante un pulso aumenta progresivamente.

3) Las células con agrupamiento inicial tienen un potencial de membrana de  $-71,2 \pm 4,7$  mV, una resistencia de entrada de  $35,4 \pm 9,7$  M $\Omega$ , y una constante de tiempo de 8,6 ms. El primer PDA que se obtiene con pulsos de corriente tiene un umbral de  $27,5 \pm 4,2$  mV, una amplitud de  $93,6 \pm 6,3$  mV, una duración de  $0,7 \pm 0,16$  ms, una pendiente de subida de  $169,7 \pm 18,1$  V/s y una pendiente de bajada de  $103 \pm 22,9$  V/s. El patrón de disparo de estas células fué tónico con pulsos de intensidad algo superior a la reobase, pero al aumentar la intensidad de estimulación, los dos primeros potenciales de acción se agrupaban, creándose un amplio intervalo entre el segundo y el tercer PDA, de forma que la frecuencia instantánea de disparo se adapta casi totalmente ya en el tercer PDA. Una vez agrupados los dos primeros PDA, el 2<sup>o</sup> resulta ser el de mayor duración de todo el pulso.

4) No existen diferencias significativas entre los dos grupos en la respuesta subumbral ante pulsos de corriente. En ambos tipos celulares se observa una inflexión hacia arriba en el sentido despolarizante de la curva corriente-voltaje, inflexión que se corresponde con la generación de una onda despolarizante en el inicio de pulsos de corriente positiva. Esta onda se activa en un rango del potencial de membrana cercano al umbral para la generación de los PDA, y parece que se debe a la activación de conductancias para el Na<sup>+</sup>, pues se abole al bloquear estas, mientras que aumenta su amplitud al bloquear las conductancias para el Ca<sup>2+</sup>. La diferencia en la respuesta supraumbral de los dos grupos neuronales se debe a la activación de conductancias para el Ca<sup>2+</sup> o de conductancias dependientes de Ca<sup>2+</sup>, pues cuando se impide el paso de Ca<sup>2+</sup> al interior celular, el patrón de disparo que se genera es indistinguible en ambos tipos celulares. La aplicación de tetraetilamonio en cambio resulta en una intensificación de las diferencias en el patrón de disparo entre ambos grupos de células.

5) En las células tónicas el valor de la pendiente de la relación frecuencia instantánea / intensidad del pulso para el 2<sup>o</sup> PDA, es de  $206 \pm 53$  Hz/nA (media  $\pm$  DE). En las

células con agrupamiento inicial se diferencian dos grupos, uno con una pendiente elevada de  $1629 \pm 230$  Hz/nA, y otro con una pendiente intermedia de  $852 \pm 278$  Hz/nA. No obstante estas diferencias para el 2º PDA, el valor de esta pendiente para el primer PDA es prácticamente idéntica en los dos grupos celulares.

6) Tanto las células tónicas como las células con agrupamiento inicial, presentan una adaptación a largo plazo cuando se estimulan con un pulso de corriente de forma repetida. Esta adaptación depende de forma directa de la frecuencia de estimulación y de la hiperpolarización progresiva que se alcanza durante la estimulación.

7) La respuesta sináptica que se obtiene en las neuronas del área CA1 del hipocampo de rata, al estimular extracelularmente en el *stratum radiatum*, presenta dos componentes. El primero tiene las características de una respuesta monosináptica, con un retardo sináptico de  $2,7 \pm 1,2$  ms y una respuesta graduada a la estimulación. En el 43 % de las células se obtiene además otro componente, que aparece de forma todo o nada, tiene una gran variabilidad en su latencia de aparición y en su duración, presenta refractariedad en algunos estímulos con una frecuencia de estimulación de 1 Hz y aparece en ocasiones sin que se realice estimulación extracelular, todo lo cual sugiere un origen polisináptico. En los dos componentes participan receptores glutamatérgicos de tipo NMDA y no-NMDA. La aplicación de antagonistas de cualquiera de los dos tipos de receptores glutamatérgicos ocasiona una disminución de la amplitud del componente monosináptico y la abolición del componente polisináptico. No obstante en presencia de antagonistas de los receptores de tipo NMDA, se puede volver a obtener el componente polisináptico aumentando la intensidad de estimulación extracelular.

8) La aplicación de NMDA a la sección de hipocampo origina una despolarización seguida de una hiperpolarización tras la cuál se recupera el valor de potencial de membrana inicial. Contando el tiempo a partir de este momento se registra una depresión en el componente monosináptico, de una duración de  $7,6 \pm 2,5$  min y que llega a alcanzar un valor del  $63 \pm 31$  %. A esta depresión sigue una potenciación de una duración de  $14 \pm 8,8$  min y que llega a ser del  $24 \pm 29$  %, tras la cual se produce una nueva depresión. El máximo de la potenciación ocurre a los  $14,4 \pm 4,5$  min. En paralelo a estos cambios la resistencia de entrada de la célula aumenta progresivamente, alcanzando su máximo 6 min después que el componente monosináptico, por lo que ni la depresión ni la potenciación observada en este

componente dependen de las variaciones que ocurren en la resistencia de entrada de la células.

9) La aplicación de NMDA a la sección de hipocampo resulta además en la aparición de un componente polisináptico en el 89 % (n = 9) de las células que no lo presentaban previamente a la aplicación. Este componente polisináptico tiene una latencia de aparición de  $13,2 \pm 9$  min (tras la normalización del potencial de membrana) y tiene las mismas características que el componente polisináptico que ocurre en células que no han sufrido ningún tratamiento farmacológico. La sección de las conexiones entre las áreas CA1 y CA3 del hipocampo, no afecta la evolución del componente monosináptico tras la aplicación de NMDA, pero impide la aparición del componente polisináptico.

10) El tratamiento de la sección con una solución con alto potasio, de forma que se origine una despolarización de amplitud y duración similares a la obtenida con NMDA, origina una depresión del componente monosináptico que en ocasiones se sigue de una potenciación el mismo, pero no induce la aparición del componente polisináptico.

11) La despolarización con corriente continua de las neuronas del área CA1 del hipocampo origina una depresión del componente monosináptico en el 47 % de los casos (n = 17), una potenciación en el 6 % y ninguna modificación apreciable en el resto.

12) La aplicación de NMDA a una sección de hipocampo, induce una desfosforilación de forma bastante selectiva de la MAP2, que no se acompaña de proteólisis de esta proteína. Esta desfosforilación se inhibe parcialmente por calmidazolium pero no por el ácido okadaico, lo que sugiere que la desfosforilación es realizada por la proteína fosfatasa denominada calcineurina.

13) El tratamiento de la sección con una solución con alto potasio, induce un aumento en el estado de fosforilación de la MAP2. Este aumento apenas ocurre cuando la aplicación de alto potasio extracelular se efectúa en presencia de un inhibidor de la proteína kinasa C, el H-7.

14) Los péptidos constituyentes de la MAP2 de 54 y 42 KDa, que median la unión de esta proteína a la tubulina, son los que sufren principalmente las modificaciones en el estado de fosforilación con los tratamientos con NMDA o alto potasio extracelular.

15) Una posible explicación de los resultados obtenidos en las modificaciones del estado de fosforilación de la MAP2, es que la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior celular, active cascadas enzimáticas distintas dependiendo de que suceda en la espina (a través de los canales asociados a los receptores NMDA) o en el tallo dendrítico (a través de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje).



## REFERENCIAS

- Adams, P.R. y Halliwell, J.V. "A hyperpolarization-induced inward current in hippocampal pyramidal cells". *J. Physiol.*, 324: 62-63P, 1982.
- Adrian, R.H., Chandler, W.K. y Hodgkin, A.L. "Voltage clamp experiments in striated muscle fibres". *J. Physiol.*, 208: 607-644, 1970.
- Akiyama, T., Nishida, E., Ishida, J., Saji, N., Ogawara, H., Hoshi, M., Miyata, Y. y Sakai, H. "Purified protein kinase C phosphorylates microtubule-associated protein 2". *J. Biol. Chem.* 261: 15648-15651, 1986.
- Alger, B.E. y Nicoll, R.A. "Feed-forward dendritic inhibition in rat hippocampal pyramidal cells studied in vitro". *J. Physiol.*, 328: 105-123, 1982.
- Alger, B.E. y Teyler, T.J. "Long-term and short-term plasticity in the CA1, CA3 and dentate region of the rat hippocampal slice". *Brain Res.*, 110: 463-480, 1976.
- Alonso, A., De Curtis, M. y Llinás, R. "Postsynaptic Hebbian and non-Hebbian long-term potentiation of synaptic efficacy in the entorhinal cortex in slices and in the isolated adult guinea pig brain". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 9280-9284, 1990.

Alvarez de Toledo, G. "Propiedades electrofisiológicas y conductancias iónicas en neuronas del septum *in vitro*". Tesis Doctoral. Sevilla. 1985.

Alvarez de Toledo, G. y López-Barneo, J. "Ionic basis of the differential neuronal activity of guinea-pig septal nucleus studied *in vitro*". J. Physiol., 396:399-415, 1988.

Andreasen, M. y Lambert, J.D.C. "Noradrenaline receptors participate in the regulation of GABAergic inhibition in area CA1 of the rat hippocampus". J. Physiol., 439: 649-669, 1991.

Andreasen, M., Lambert, J.D.C. y Jensen, M.S. "Effects of new non-N-methyl-D-aspartate antagonists on synaptic transmission in the *in vitro* rat hippocampus". J. Physiol., 414: 317-336, 1989.

Armstrong, D.L. "Calcium channel regulation by calcineurin, a  $Ca^{2+}$ -activated phosphatase in mammalian brain". Trends Neurosci., 12: 117-122, 1989.

Artola, A. y Singer, W. "The involvement of N-methyl-D-aspartate receptors in induction and maintenance of long-term potentiation in rat visual cortex". Eur. J. Neurosci., 2: 254-269, 1990.

Ascher, P. y Nowak, L. "The role of divalent cations in the N-methyl-D-aspartate responses of mouse central neurones in culture". J. Physiol., 399: 247-266, 1988.

Aoki, C. y Siekevitz, P. "Plasticity in brain development". Sci. Am. 259: 56-64, 1988.

Bashir, Z.I., Alford, S., Davies, S.N., Randall, A.D. y Collingridge, G.L. "Long-term potentiation of NMDA receptor-mediated synaptic transmission in the hippocampus". Nature, 349: 156-158, 1991.

Bayer, S.A. "Hippocampal region". En The rat nervous system. Editado por G. Paxinos, Academic Press, North Ride, pgs. 335-352, 1985.

- Ben-Ari, Y y Gho, M. "Long-lasting modifications of the synaptic properties of rat CA3 hippocampal neurones induced by kainic acid". *J. Physiol.*, 404: 365-384, 1988.
- Berretta, N., Berton, F., Bianchi, R., Brunelli, M., Capogna, M. y Francesconi, W. "Long-term potentiation of NMDA receptor-mediated EPSP in guinea pig hippocampal slices". *Eur. J. Neurosci.*, 3: 850-854, 1991.
- Berry, M.S. y Pentreath, V.W. "Criteria for distinguishing between monosynaptic and polysynaptic transmission". *Brain Res.*, 105: 1-20, 1976.
- Bindman, L.J., Meyer, T. y Prince, C.A. "Comparison of the electrical properties of neocortical neurones in slices in vitro in the anaesthetized rat". *Exp. Brain Res.*, 69: 489-496, 1988.
- Blatz, A.L. y Magleby, K.L. "Ion conductance and selectivity of single calcium-activated potassium channels in cultured rat muscle". *J. Gen. Physiol.*, 84: 1-23, 1984.
- Bliss, T.V.P y Gardner-Medwin. "Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path". *J. Physiol.*, 232: 357-374, 1973.
- Bliss, T.V.P. y Lomo, T. "Long lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path". *J. Physiol.*, 232: 331-356, 1973.
- Bolz, J., Gilbert, C.D. y Wiesel, T.N. "Pharmacological analysis of cortical circuitry". *Trends Neurosci.*, 12: 292-296, 1989.
- Brodmann, K. "Vergleichende lokalisationlehre der grosshirnrinde in ihren prinzipien dargestellt auf grund des zellenbaues". J.A. Barth, Leipzig, 1909.
- Brown, A.C. "Introduction to sensory mechanisms". En *Textbook of Physiology*. Editado por H.D. Patton, A.F. Fuchs, B. Hille, A.M. Scher y R. Steiner, 21ª ed., W.B. Saunders Company, Philadelphia, pgs. 295-296, 1990.

- Brugg, B. y Matus, A. "Phosphorylation determines the binding of microtubule associated protein (MAP2) to microtubules in living cells". *J. Cell Biol.*, 114: 735-743, 1991.
- Cáceres, A., Banker, G.A., Steward, O., Binder, L. y Payne, M. "MAP2 is localized in the dendrites of hippocampal neurons which develop in culture". *Dev. Brain Res.*, 13: 314-321, 1984.
- Cain, D.P. "Long-term potentiation and kindling: how similar are the mechanisms?". *Trends Neurosci.*, 12: 6-10, 1989.
- Calverley, R.H.S. y Jones, D.G. "Contributions of dendritic spines and perforated synapses to synaptic plasticity". *Brain Res. Rev.*, 15: 215-249, 1990.
- Carbone, E. y Lux, H.D. "A low voltage-activated, fully inactivating Ca channel in vertebrate sensory neurons". *Nature*, 310: 501-502, 1984.
- Castellano, A. y López-Barneo, J. "Sodium and calcium currents in dispersed mammalian septal neurons". *J. Gen. Physiol.*, 97: 303-320, 1991.
- Chang, F.L.F. y Greenough, W.T. "Transient and enduring morphological correlates of synaptic activity and efficacy change in the rat hippocampal slice". *Brain Res.*, 309: 34-46, 1984.
- Chiba, A., Shepherd, D. y Murphey, R.K. "Synaptic rearrangement during postembryonic development in the cricket". *Science*, 240: 901-905, 1988.
- Choi, D.W. "The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death". *Annu. Rev. Neurosci.*, 13: 171-182, 1990.
- Choudhury, B.P. "Retinotopic organization of the guinea pig's visual cortex". *Brain Res.*, 144: 19-29, 1978.
- Christian, E.P. y Dudek, F.E.. "Characteristics of local excitatory circuits studied with glutamate microapplications in the CA3 area of rat hippocampal slices". *J. Neurophysiol.*, 59: 90-109, 1988a.

- Christian, E.P. y Dudek, F.E. "Electrophysiological evidence from glutamate microapplications for local excitatory circuits in the CA1 area of rat hippocampal slices". *J. Neurophysiol.*, 59: 110-123, 1988b.
- Cleveland, D.W., Fisher, S.G., Kirschner, M.W. y Laemmli, U.K. "Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis". *J. Biol. Chem.* 252: 1102-1106, 1977.
- Collingridge, G.L. y Bliss, T.V. "NMDA receptors-their role in long-term potentiation". *Trends Neurosci.*, 10: 288-293, 1987.
- Collingridge, G.L., Kehl, S.J. y McLennan, H. "Excitatory aminoacids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus". *J. Physiol.*, 334: 33-46, 1983.
- Collingridge, G.L., Herron, C.E. y Lester, R.A.J. "Synaptic activation of N-methyl-D-aspartate receptors in the Schaffer collateral-commissural pathway of rat hippocampus". *J. Physiol.*, 399: 283-300, 1988.
- Connor, J.A., Wadman, W.J., Hockberger, P.E. y Wong, R.K.S. "Sustained dendritic gradients of  $Ca^{2+}$  induced by excitatory amino acids in CA1 hippocampal neurons". *Science*, 240: 649-653, 1988.
- Connors, B.W., Gutnick, M.J. y Prince, D.A. "Electrophysiological properties of neocortical neurons in vitro". *J. Neurophysiol.*, 48: 1302-1320, 1982.
- Connors, B.W. y Gutnick, M.J. "Neocortex. Cellular properties and intrinsic circuitry". En *Brain Slices*. Editado por R. Dingledine, Plenum Press, New York, pgs. 313-339, 1984.
- Connors, B.W. y Gutnick, M.J. "Intrinsic firing patterns of diverse neocortical neurons". *Trends Neurosci.*, 13: 99-104, 1990.
- Constanti, A. y Galvan, M. "Fast inward-rectifying current accounts for anomalous rectification in olfactory cortex neurones". *J. Physiol.*, 385: 153-178, 1983.

Constanti, A., Galvan, M., Franz, P. y Sim, J.A. "Calcium-dependent inward currents in voltage-clamped guinea-pig olfactory cortex neurones". *Pflügers Arch.*, 404: 259-265, 1985.

Constantine-Paton, M., Cline, H.T. y Debski, E. "Patterned activity, synaptic convergence, and the NMDA receptor in developing visual pathways". *Annu. Rev. Neurosci.*, 13: 129-154, 1990.

Creel, D.J. y Giolli, R.A. "Retinogeniculostriate projections in guinea pigs: albino and pigmented strains compared". *Exp. Neurol.*, 36: 411-425, 1972.

Dedman, J.R., Potter, J.D., Jackson, R.L., Jonhson, J.D. y Means, A.R. "Physicochemical properties of rat testis  $Ca^{2+}$ -dependent regulated protein of cyclic nucleotide phosphodiesterase". *J. Biol. Chem.*, 252: 8415-8422, 1977.

Dekin, M.S. y Getting, P.A. "In vitro characterization of neurons in the ventral part of the nucleus tractus solitarius. II. Ionic basis for repetitive firing patterns". *J. Neurophysiol.*, 58: 215-229, 1987.

Díaz-Nido, J., Montoro, R.J., López-Barneo, J. y Avila, J. "High external potassium induces an increase in the phosphorylation of the cytoskeletal protein MAP2 in rat hippocampal slices". *Eur. J. Neurosci.*, en prensa, 1993.

Díaz-Nido, J., Serrano, L., Hernández, M.A. y Avila, J. "Phosphorylation of microtubule proteins in rat brain at different developmental stages: Comparison with that found in neuronal cultures". *J. Neurochem.*, 54: 211-222, 1990.

Dingledine, R., Hynes, M.A. y King, G.L. "Involvement of N-methyl-D-aspartate receptors in epileptiform bursting in the rat hippocampal slice". *J. Physiol.*, 380: 175-189, 1986.

Fairbanks, G., Stech, N.C. y Wallach, D.F. "Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane". *Biochemistry*, 10: 2606-2617, 1981.

- Fifkova, E. y Van Harrevel, A. "Long-lasting morphological changes in dendritic spines of dentate granular cells following stimulation in the entorhinal area". *J. Neurocytol.*, 6: 211-230, 1977.
- Fox, K., Daw, N., Sato, H. y Czepita, D. "Dark-rearing delays the loss of NMDA-receptor function in kitten visual cortex". *Nature*, 350: 342-344, 1991.
- Franz, P., Galvan, M. y Constanti, A. "Calcium-dependent action potentials and associated inward currents in guinea-pig neocortical neurons in vitro". *Brain Res.*, 366: 262-271, 1986.
- French, C.R., Sah, P., Buckett, K.J. y Gage, P.W. "A voltage-dependent persistent sodium current in mammalian hippocampal neurons". *J. Gen. Physiol.*, 95: 1139-1157, 1990.
- Friedrich, P. "Protein structure: The primary sustrate for memory". *Neuroscience*, 35: 1-7, 1990.
- Furakawa, T., Hayashida, Y. y Masuura, S. "Quantal analysis of the size of excitatory post-synaptic potentials at synapses between hair cells and afferent nerve fibers in golsfish". *J. Physiol.*, 276: 211-226, 1978.
- Gähwiler, B.H. y Llano, I. "Sodium and potassium conductances in somatic membranes of rat Purkinje cells from organotypic cerebellar cultures". *J. Physiol.*, 417: 105-122, 1989.
- Gean, P.W. y Chang, F.C. "Ketamine suppresses synchronized discharges in the disinhibited amygdala slice". *Brain Res. Bull.*, 26: 923-927, 1991a.
- Gean, P.W. y Chang, F.C. "Bursting discharges in disinhibited amygdala slices: the role of excitatory amino acid receptors". *Neuropharmacology*, 30: 797-802, 1991b.
- Gean, P.W., Shinnick-Gallager, P. y Anderson, A.C. "Spontaneous epileptiform activity and alteration of GABA- and of NMDA-mediated neurotransmission in amygdala neurons kindled in vivo". *Brain Res.*, 494: 177-181, 1989.

- Gilbert, C.D. "Microcircuitry of the visual cortex". *Ann. Rev. Neurosci.*, 6: 217-247, 1983.
- Gilly, W.F. y Armstrong, C.M. "Threshold channels-a novel type of sodium channel in squid giant axon". *Nature*, 309: 448-450, 1984.
- Goddard, G.V., McIntire, D, y Leech, C. "A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation". *Exp. Neurol.*, 25: 295-330, 1969.
- Goldberg, M.E., Eggers, H.M. y Gouras, P. "The ocular motor system". En *Principles of neural science*. Editado por E.R. Kandel, J.H. Schwartz y T.M. Jessell, 3ª ed., Elsevier, Amsterdam, pgs. 660-678, 1991.
- Gordon, B., Daw, N. y Parkinson, D. "The effect of age on binding of MK-801 in the cat visual cortex". *Dev. Brain Res.*, 62: 61-67, 1991.
- Gutnick, M.J., Connors, B.W. y Prince, D.A. "Mechanisms of neocortical epileptogenesis in vitro". *J. Neurophysiol.*, 48: 1321-1335, 1982.
- Hablitz, J.J. y Langmoen, I.A. "N-methyl-D-aspartate receptor antagonists reduce synaptic excitation in the hippocampus". *J. Neurosci.*, 6: 102-106, 1986.
- Halpain, S. y Greengard, P. "Activation of NMDA receptors induces rapid dephosphorylation of the cytoskeletal protein MAP2". *Neuron*, 5:237-246, 1990.
- Harris, E.W., Gangong, A.H. y Cotman, C.W. "Long-term potentiation in the hippocampus involves activation of N-methyl-D-aspartate receptors". *Brain Res.*, 323: 132-137, 1984.
- Harutiunian-Kozak, B., Dec, K. y Dreher, B. "Habituation of unitary responses in the superior colliculus of the cat". *Acta Neurobiol. Exp.*, 31: 213-217, 1971.
- Hebb, D.O. "Organization of behavior", Wiley, New York, 1949.
- Hernández, M.A., Wandosell, F. y Avila, J. "Localization of the phosphorylation sites for different kinases in the microtubule-associated protein MAP-2". *J. Neurochem.*, 48: 84-93, 1987.



- Herron, C.E., Williamson, R. y Collingridge, G.L. "A selective N-methyl-D-aspartate antagonist depresses epileptiform activity in rat hippocampal slices". *Neurosci. Lett.*, 61: 255-260, 1985.
- Hidaka, H., Hagiwara, M. y Chijwa, T. "Molecular pharmacology of protein kinases". *Neurochem. Res.*, 15: 431-434, 1990.
- Hille, B. "Ionic channels of excitable membranes". 2<sup>a</sup> ed., Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 1992.
- Hodgkin, A.L. y Huxley, A.F. "A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve". *J. Physiol.*, 117: 500-544, 1952.
- Horn, G. y Hill, R.M. "Responsiveness to sensory stimulation of units in the superior colliculus and subjacent tecto tegmental regions in the rabbit". *Exp. Neurol.* 14: 199-223, 1966.
- Hoshi, M., Akiyama, T., Shinohara, Y., Ogawara, H., Nishida, E. y Sakai, H. "Protein kinase C-catalyzed phosphorylation of the microtubule-binding domain of MAP2 inhibits its ability to induce tubulin polymerization". *Eur. J. Biochem.*, 174: 225-230, 1988.
- Hoshi, M., Ohta, K., Gotoh, Y., Mori, A., Murofushi, H., Sakai, H. y Nishida, E. "MAP kinase-catalyzed phosphorylation of microtubule-associated proteins, MAP2 and MAP4, induces an alteration in their function". *Eur. J. Biochem.*, 203: 43-52, 1992.
- Hotson, J.R. y Prince, D.A. "A calcium activated hyperpolarization follows repetitive firing in hippocampal neurons". *J. Neurophysiol.*, 43: 409-419, 1980.
- Hubel, D.H. y Wiesel, T.N. "Functional architecture of macaque monkey visual cortex". *Proc. R. Soc. London, Ser. B*, 198: 1-59, 1977.
- Huguenard, J.R., Hamill, O.P. y Prince, D.A. "Developmental changes in Na<sup>+</sup> conductances in rat neocortical neurons: appearance of a slowly inactivating component". *J. Neurophysiol.*, 59: 778-795, 1988.

- Hunt, C.C. y Ottoson, D. "Impulse activity and receptor potential of primary and secondary endings of isolated mammalian muscle spindles". *J. Physiol.*, 252: 259-281, 1975.
- Jacobs, K.M. y Donoghue, J.P. "Reshaping the cortical motor map by unmasking latent intracortical connections". *Science*, 251: 944-947, 1991.
- Jagadeesh, B., Gray, C.M. y Ferster, D. "Visually evoked oscillations of membrane potential in cells of cat visual cortex". *Science*, 257: 552-554, 1992.
- Jahnsen, H. "Electrophysiological characteristics of neurones in the guinea-pig deep cerebellar nuclei in vitro". *J. Physiol.*, 372: 129-147, 1986a.
- Jahnsen, H. "Extracellular activation and membrane conductances of neurones in the guinea-pig deep cerebellar nuclei in vitro". *J. Physiol.*, 372: 149-168, 1986b.
- Jahr, C.E. y Stevens, C.F. "Glutamate activates multiple single channel conductances in hippocampal neurons". *Nature*, 325: 522-525, 1987.
- Jodkowsky, J.S., Viana. F., Dick, T.E. y Berger, A.J. "Repetitive firing properties of phrenic motoneurons in the cat". *J. Neurophysiol.*, 1988.
- Johnston, D. y Brown, T.H. "Giant synaptic potential hypothesis for epileptiform activity". *Science*, 211: 294-297, 1981.
- Johnston, D., Hablitz, J.J. y Wilson, W.A. "Voltage clamp discloses slow inward current in hippocampal burst-firing neurones". *Nature*, 286: 391-393, 1980.
- Jones, O.T., Kunze, D.L. y Angelides, K.J. "Localization and mobility of omega-conotoxin-sensitive  $Ca^{2+}$  channels in hippocampal Ca1 neurons". *Science*, 244: 1189-1193, 1989.
- Kandel, E. "Cellular basis of behavior". Freeman, San Francisco, 1976.
- Karr, T.L., White, H.D. y Purich, D.L. "Characterization of brain microtubule protein prepared by selective removal of mitochondrial and synaptosomal components". *J. Biol. Chem.*, 254: 6107-6111, 1979.

Kauer, J.A., Malenka, R.C. y Nicoll, R.A. "NMDA application potentiates synaptic transmission in the hippocampus". *Nature*, 334: 250-252, 1988.

Kawamoto, S. y Hidaka, H. "1-(5-Isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine (H7) is a selective inhibitor of protein kinase C in rabbit platelets". *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 125: 258-261, 1984.

Kelly, P.T., Shields, S., Conway, K., Yip, R. y Burgin, K. "Developmental changes in calmodulin-kinase II activity at brain synaptic junctions: Alterations in holoenzyme composition". *J. Neurochem.*, 49:1927-1940, 1987.

Kernell, D. "The adaptation and the relation between discharge frequency and current strength of cat lumbosacral motoneurons stimulated by long-lasting injected currents". *Acta Physiol. Scand.*, 65: 65-73, 1965.

King, A.E., Cherubini, E. y Ben-Ari, Y. "N-methyl-D-aspartate induces recurrent synchronized burst activity in immature hippocampal CA3 neurones in vitro". *Dev. Brain Res.*, 46: 1-8, 1989.

King, G.L., Dingledine, R., Giacchino, J.L. y McNamara, J.O. "Abnormal neuronal excitability in hippocampal slices from kindled rats". *J. Neurophysiol.*, 54: 1295-1304, 1985.

Kiskin, N.I., Krishtal, O.A. y Tsyndrenko, A.Y. "Excitatory amino acid receptors in hippocampal neurons: kainate fails to desensitize them". *Neurosci. Lett.*, 63: 225-230, 1986.

Klee, C.B. "Concerted regulation of protein phosphorylation and dephosphorylation by calmodulin". *Neurochem. Res.*, 16: 1059-1065, 1991.

Kose. A., Ito, A., Saito, N. y Tanaka, C. "Electron microscopic localization of  $\gamma$ - and  $\beta$ -subspecies of protein kinase C in rat hippocampus". *Brain Res.*, 518: 209-217, 1990.

Laemmli, U.K. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature*, 227: 680-685, 1970.

- Landry, P., Wilson, C.J. y Kitai, S.J. "Morphological and electrophysiological characteristics of pyramidal tract neurons in the rat". *Exp. Brain Res.* 57: 177-190, 1984.
- Lee, W. y Hablitz, J.J. "Initiation of epileptiform activity by excitatory amino acid receptors in the disinhibited rat neocortex". *J. Neurophysiol.* 65: 87-95, 1991.
- Lipscombe, D., Madison, D.V., Poenie, M., Reuter, H., Tsien, R.Y. y Tsien, R.W. "Spatial distribution of calcium channels and cytosolic calcium transients in growth cones and cell bodies of sympathetic neurons". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 2398-2402, 1988.
- Lissman, J. "A mechanism for the Hebb and the anti-Hebb processes underlying learning and memory". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 9574-9578, 1989.
- Llinás, R. "The intrinsic electrophysiological properties of mammalian neurons: insights into central nervous system function". *Science*, 242: 1654-1664, 1988.
- Llinás, R. y Hess, R. "Tetrodotoxin-resistant dendritic spikes in avian Purkinje cells". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73: 2520-2523, 1976.
- Llinás, R. y Jahnsen, H. "Electrophysiology of mammalian thalamic neurones in vitro". *Nature*, 297: 406-408, 1982.
- Llinás, R. y López-Barneo, J. "Electrophysiology of mammalian tectal neurons in vitro. II. Long-term adaptation". *J. Neurophysiol.*, 60: 869-878, 1988.
- Llinás, R. y Sugimori, M. "Electrophysiological properties of in vitro Purkinje cells somata in mammalian cerebellar slices". *J. Physiol.*, 305: 171-195, 1980a.
- Llinás, R. y Sugimori, M. "Electrophysiological properties of in vitro Purkinje cell dendrites in mammalian cerebellar slices". *J. Physiol.*, 305: 197-213, 1980b.
- Llinás, R., Sugimori, M., Hillman, D.E. y Cherksey, B. "Distribution and functional significance of the P-type, voltage-dependent  $Ca^{2+}$  channels in the mammalian central nervous system". *Trends Neurosci.*, 15: 351-355, 1992.

Llinás, R. y Yarom, Y. "Electrophysiology of mammalian inferior olivary neurons *in vitro*. Different types of voltage-dependent ionic conductances". J. Physiol., 315: 549-567, 1981.

López-Barneo, J. y Llinás, R. "Electrophysiology of mammalian tectal neurons *in vitro*. I. Transient ionic conductances". J. Neurophysiol., 60: 853-868, 1988.

Lynch, G.S., Dunwiddie, T. y Gribkoff, V. "Heterosynaptic depression: a postsynaptic correlate of long-term potentiation". Nature, 305: 719-721, 1977.

MacVicar, B.A y Dudek, F.E. "Local synaptic circuits in rat hippocampus: interactions between pyramidal cells". Brain Res., 184: 220-223, 1980.

Malenka, R.C., Kauer, J.A., Perkel, D.J., Mauk, M.D., Kelly, P.T., Nicoll, R.A. y Waxham, M.N. "An essential role for postsynaptic calmodulin and protein kinase activity in long-term potentiation". Nature, 340, 554-557, 1989.

Marty, A. "Calcium-dependent channels with large unitary conductance in chromaffin cell membranes". Nature, 291: 497-500, 1981.

Matus, A. "Microtubule-associated proteins: their potential role in determining neuronal morphology". Annu. Rev. Neurosci., 11: 29-44, 1988.

Mayer, M.L. y Westbrook, G.L. "Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurones". J. Physiol., 394: 501-527, 1987.

McCormick, D.A., Connors, B.W., Lighthall, J.W. y Prince, D.A. J. "Comparative electrophysiology of pyramidal and sparsely spiny stellate neurons of the neocortex". J. Neurophysiol., 54: 782-806, 1985.

Meech, R.W. "Calcium-dependent potassium activation in nervous tissues". Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 7: 1-18, 1978.

Miles, R., Traub, R.D. y Wong, R.K. "Spread of synchronous firing in longitudinal slices from the CA3 region of the hippocampus". J. Neurophysiol., :1481-1496, 1988.

Miles, R. y Wong, R.K.S. "Excitatory synaptic interactions between CA3 neurones in the guinea-pig hippocampus". *J. Physiol.*, 373: 397-418, 1986.

Miles, R. y Wong, R.K.S. "Latent synaptic pathways revealed after tetanic stimulation in the hippocampus". *Nature*, 329: 724-726, 1987.

Miyasaka, T., Miyasaka, J. y Saltiel, A.R. "Okadaic acid stimulates the activity of MAP kinase in PC-12 pheochromocytoma cells". *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 168: 1237-1243, 1990.

Mody, I. y Heinemann, U. "NMDA receptors of dentate gyrus granule cells participate in synaptic transmission following kindling". *Nature*, 326: 701-704, 1987.

Mody, I., Stanton, P.K. y Heinemann, U. "Activation of N-methyl-D-aspartate receptors parallels changes in cellular and synaptic properties of dentate gyrus granule cells after kindling". *J. Neurophysiol.*, 59: 1033-1054, 1988.

Monaghan, D.T., Holets, V.R., Toy, D.W. y Cotman, C.W. "Anatomical distribution of four pharmacologically distinct <sup>3</sup>H-L-glutamate binding sites". *Nature*, 306: 176-179, 1983.

Monaghan, D.T., Yao, D., Olverman, H.J., Watkins, J.C. y Cotman, C.W. "Autoradiography of D-2-[<sup>3</sup>H]amino-5-phosphonopentanoate binding sites in rat brain. *Neurosci. Lett.*, 52: 253-258, 1984.

Montejo de Garcini, E., Díez, J.C. y Avila, J. "Quantitation and characterization of tau factor in porcine tissues". *Biochem. Biophys. Acta*, 881: 456-461, 1986.

Montoro, R.J., Díaz-Nido, J., Avila, J. y López-Barneo, J. "N-methyl-D-aspartate stimulates the dephosphorylation of the microtubule-associated protein 2 and potentiates excitatory synaptic pathways in the rat hippocampus". *Neuroscience*, en prensa, 1993.

Montoro, R.J., López-Barneo, J. y Jassik-Gerschenfeld, D. "Differential burst firing modes in neurons of the mammalian visual cortex in vitro". *Brain Res.*, 460: 168-172, 1988.

- Moore, J. y Appenteng, K. "The membrane properties and firing characteristics of rat jaw-elevator motoneurones". *J. Physiol.*, 423: 137-153, 1990.
- Morales, M. y Fifkova, E. "Distribution of MAP2 in dendritic spines and its colocalization with actin". *Cell Tissue Res.*, 256: 447-456, 1989.
- Morrisett, R.A, Mott, D.D., Lewis, D.V., Wilson, W.A, y Swartzwelder, H.S. "Reduced sensitivity of the N-methyl-D-aspartate component of synaptic transmission to magnesium in hippocampal slices from immature rats". *Dev. Brain Res.*, 56: 257-262, 1990.
- Mountcastle, V.B. "Modality and topographic properties of single neurons of the cat's somatic sensory cortex". *J. Neurophysiol.* 20: 408-434, 1957.
- Müller, W. y Connor, J.A. "Dendritic spines as individual neuronal compartments for synaptic  $Ca^{2+}$  responses". *Nature*, 354: 73-76, 1991.
- Murthy, A.S.N. y Flavin, M. "Microtubule assembly using the microtubule-associated protein MAP-2 prepared in defined states of phosphorylation with protein kinase and phosphatase". *Eur. J. Biochem.*, 137: 37-46, 1983.
- Nelson, P.G. y Frank, K. "Anomalous rectification in cat spinal motoneurons and effect of polarizing currents on excitatory postsynaptic potential". *J. Neurophysiol.*, 30: 1097-1113, 1967.
- Newberry, N.R. y Nicoll, R.A. "A bicuculline-resistant inhibitory postsynaptic potential in rat hippocampal pyramidal cells in vitro". *J. Physiol.*, 348: 239-254, 1984.
- Ogawa, T., Ito, S. y Kato, H. "Membrane characteristics of visual cortical neurons in vitro slices". *Brain Res.*, 226: 315-319, 1981.
- Oliver, M.W. y Miller, J.J. "Alteration of inhibitory process in the dentate gyrus following kindling-induced epilepsy". *Exp. Brain Res.*, 57: 443-447, 1985.
- Oyster, C.W. y Takahashi, E.S. "Response of rabbit superior colliculus neurons to repeated visual stimuli". *J. Neurophysiol.*, 38: 301-312, 1975.

- Pons, T.P., Garraghty, P.E., Ommaya, A.K., Kaas, J.H., Taub, E y Mishkin, M. "Massive cortical reorganization after sensory deafferentation in adult macaques". *Science*, 252: 1857-1860, 1991.
- Prusky, G.T., Arbuckle, J.M. y Cynader, M.S. "Transient concordant distribution of nicotinic receptors and acetylcholinesterase activity in infant rat visual cortex". *Dev. Brain Res.*, 39: 154-159, 1988.
- Rall, W., Burke, R.E., Holmes, W.R., Jack, J.J.B., Redman, S.J. y Segev, I. "Matching dendritic neuron models to experimental data". *Physiol. Rev.*, 72: s159-s186, 1992.
- Rauschecker, J.P. "Mechanisms of visual plasticity: Hebb synapses, NMDA receptors, and beyond". *Physiol. Rev.*, 71: 587-615, 1991.
- Rauschecker, J.P., Egert, U. y Kossel, A. "Effects of NMDA antagonists on developmental plasticity in kitten visual cortex". *Int. J. Dev. Neurosci.*, 8: 425-435, 1990.
- Robertson, R.T., Hanes, M.A. y Yu, J. "Investigations of the origins of transient acetylcholinesterase activity in developing rat visual cortex". *Dev. Brain Res.*, 469: 1-23, 1988.
- Rudy, B. "Diversity and ubiquity of K channels". *Neuroscience*, 25: 729-749, 1988.
- Sah, P., Gibb, A.J. y Gage, P.W. "The sodium current underlying action potentials in guinea pig hippocampal neurons". *J. Gen. Physiol.*, 91: 373-398, 1988.
- Schwartzkroin, P.A. y Prince, D.A. "Cellular and field potential properties of epileptogenic hippocampal slices". *Brain Res.*, 147: 117-130, 1978.
- Schwartzkroin, P.A. y Wester, K. "Long-lasting facilitation of a synaptic potential following tetanization in the in vitro hippocampal slice". *Brain Res.*, 89: 107-119, 1975.
- Schwindt, P.C. y Crill, W.E. "Properties of a persistent inward current in normal and TEA-injected motoneurons". *J Neurophysiol.*, 43: 1700-1724, 1980.



- Schwindt, P.C., Spain, W.J. y Crill, W.E. "Long-lasting reduction of excitability by a sodium-dependent potassium current in cat neocortical neurons". *J. Neurophysiol.*, 61: 233-244, 1989.
- Schwindt, P.C., Spain, W.J., Foehring, R.C., Chubb, M.C. y Crill, W.E. "Slow conductances in neurons from cat sensorimotor cortex in vitro and their role in slow excitability changes". *J. Neurophysiol.*, 59: 450-467, 1988a.
- Schwindt, P.C., Spain, W.J., Foehring, R.C., Stafstrom, C.E., Chubb, M.C. y Crill, W.E. "Multiple potassium conductances and their functions in neurons from cat sensorimotor cortex in vitro". *J. Neurophysiol.*, 59: 424-449, 1988b.
- Shaw, C., Prusky, G., van Huizen, F. y Cynader, M. "Differential effects of quinolinic acid lesions on muscarinic acetylcholine receptors in cat visual cortex during postnatal development". *Brain. Res. Bull.*, 22: 771-776, 1989.
- Sholfield, C.N. "Electrical properties of neurones in the olfactory cortex slice in vitro". *J. Physiol.*, 275: 547-557, 1978.
- Silva, L.R., Amitai, Y. y Connors, B.W. "Intrinsic oscillations of neocortex generated by layer V pyramidal neurons". *Science*, 251: 432-435, 1991.
- Siman, R., Noszek, J.C. y Kegerise, C. "Calpain I activation is specifically related to excitatory amino acid induction of hippocampal damage". *J. Neurosci.*, 9: 1579-1590, 1989.
- Slater, N.T., Stelzer, A. y Galvan, M. "Kindling-like stimulus patterns induce epileptiform discharges in the guinea pig in vitro hippocampus". *Neurosci. Lett.*, 60: 25-31, 1985.
- Stafstrom, C.E., Schwindt, P.C., Chubb, M.C. y Crill, W.E. "Properties of persistent sodium conductance and calcium conductance of layer V neurons from cat sensorimotor cortex in vitro". *J. Neurophysiol.* 53: 153-170, 1985.
- Stafstrom, C.E., Schwindt, P.C. y Crill, W.E. "Negative slope conductance due to a persistent subthreshold sodium current in cat neocortical neurons in vitro". *Brain Res.*, 236: 221-226, 1982.

Stafstrom, C.E., Schwindt, P.C. y Crill, W.E. "Repetitive firing in layer V neurons from cat neocortex in vitro". *J. Neurophysiol.*, 52: 264-277, 1984a.

Stafstrom, C.E., Schwindt, P.C., Flatman, J.A. y Crill, W. E. "Properties of subthreshold response and action potential recorded in layer V neurons from cats sensorimotor cortex in vitro". *J. Neurophysiol.*, 52: 244-263, 1984b.

Steriade, M. y Llinás, R. "The functional states of the thalamus and the associated neuronal interplay". *Physiol. Rev.*, 68: 649-742, 1988.

Sutor, B. y Zieglgänsberger, W. "A low-voltage activated, transient calcium current is responsible for the time-dependent depolarizing inward rectification of rat neocortical neurons in vitro". *Pflügers Arch.*, 410: 102-111, 1987.

Swartzwelder, H.S. "Reduced sensitivity of the N-methyl-D-aspartate component of synaptic transmission to magnesium in hippocampal slices from immature rats". *Dev. Brain Res.*, 56: 257-262, 1990.

Tasker, J.G. y Dudek, F.E. "Electrophysiological properties of neurones in the region of the paraventricular nucleus in slices of rat hypothalamus". *J. Physiol.*, 434: 271-293, 1991.

Thibault, O., Joly, M., Muller, D., Schottler, F., Dudek, S. y Lynch, G. "Long-lasting physiological effects of bath applied N-methyl-D-aspartate". *Brain Res.*, 476: 170-173, 1989.

Towbin, H., Staehelin, T. y Gurdon, J. "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 4350-4354, 1979.

Traub, R.D. y Dingledine, R. "Model of synchronized epileptiform bursts induced by high potassium in CA3 region of rat hippocampal slice. Role of spontaneous EPSPs in initiation". *J. Neurophysiol.*, 64: 1009-1018, 1990.

Traub, R.D. y Llinás, R. "Hippocampal pyramidal cells: significance of dendritic ionic conductances for neuronal function and epileptogenesis". *J. Neurophysiol.*, 42: 476-496, 1979.

- Traub, R.D., Miles, R. y Wong, R.K.S. "Models of synchronized hippocampal bursts in the presence of inhibition. I. Single population events". *J. Neurophysiol.*, 58: 739-751, 1987.
- Traub, R.D., Miles, R., Wong, R.K.S., Schulman, L.S. y Schneiderman, J.H. "Models of synchronized hippocampal bursts in the presence of inhibition. II. Ongoing spontaneous population events". *J. Neurophysiol.* 58: 752-764, 1987.
- Tsien, R.W., Lipscombe, D., Madison, D.V., Bley, K.R. y Fox, A.P. "Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation". *Trends Neurosci.*, 11: 431-438, 1988.
- Tsuyama, S., Bramblett, G.T., Huang, K.P. y Flavin, M. "Calcium-phospholipid-dependent protein kinase recognizes sites in microtubule-associated protein 2 which are phosphorylated in living brain and are not accesible to other kinases". *J. Biol. Chem.*, 261: 4110-4116, 1986.
- Tsuyama, S., Terayama, Y. y Matsuyama, S. "Numerous phosphates of microtubule-associated protein 2 in living rat brain". *J. Biol. Chem.*, 262: 10886-10892, 1987.
- Tuff, L.P., Racine, R.J. y Adamec, R. "The effects of kindling on GABA-mediated inhibition in the dentate gyrus of the rat. I. Paired pulse depression". *Brain Res.*, 277: 70-90, 1983.
- Walch, C. y Schliebs, R. "Age-depentent changes in the laminar distribution of cholinergic markers in rat visual cortex". *Neurochem. Int.*, 14: 337-346, 1989.
- Walsh, M.P., Valentine, K.A., Ngai, P.K., Carruthers, C.A. y Hollenberg, M.D. "Calcium-dependent hydrophobic-interaction chromatography". *Biochem. J.*, 224:117-127, 1984.
- Weingarten, M.D., Lockwood, M.H., Hwo, S.Y. y Kirschner, M.W. "A protein factor essential for microtubule assembly". *Proc. Natl. Acad. Aci. USA*, 72:1858-1862, 1975.

- Westenbroek, R.E., Ahljianian, M.K. y Catterall, W.A. "Clustering of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels at the base of major dendrites in hippocampal pyramidal neurons". *Nature*, 347: 281-284, 1990.
- Wilson, W.A. y Goldner, M.M. "Voltage clamping with a single microelectrode". *J. Neurobiol.*, 6: 411-422, 1975.
- Wong, R.K.S., Prince, D.A. y Basbaum, A.I. "Intradendritic recordings from hippocampal neurons". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 986-900, 1979.
- Wong, R.K.S. y Traub, R.B. "Synchronized burst discharge in disinhibited hippocampal slice. I. Initiation in the CA2-CA3 region". *J. Neurophysiol.*, 49: 442-458, 1983.
- Woolsey, T.A. y Van der Loos, H. "The structural organization of layer IV in the somatosensory region (SI) of mouse cerebral cortex. The description of a cortical field composed of discrete cytoarchitectural units". *Brain Res.*, 17: 205-242, 1970.
- Wu, K., Wasterlain, C., Sachs, L. y Siekevitz, P. "Effect of septal kindling on glutamate binding and  $\text{Ca}^{2+}$  calmodulin-dependent phosphorylation in a postsynaptic density fraction isolated from rat cerebral cortex". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 5298-5302, 1990.
- Yamamoto, H., Fukunaga, K., Goto, S., Tanaka, E. y Miyamoto, E. "Calcium/calmodulin-dependent regulation of microtubule formation via phosphorylation of MAP2, tau factor and tubulin, and comparison with the cyclic AMP-dependent phosphorylation". *J. Neurochem.*, 44: 759-768, 1985.
- Zalutsky, R.A. y Nicoll, R.A. "Comparison of two forms of long-term potentiation in single hippocampal neurons". *Science*, 248: 1619-1624, 1990.

# UNIVERSIDAD DE SEVILLA

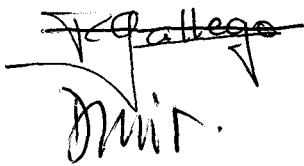
Reunido el Tribunal Integrado por los abajo firmantes en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de D. RAFAEL JESUS MONDORO LARCA titulada "ADAPTACION Y MODIFICACIONES DE CORTA Y LARGA DURACION EN LA ACTIVIDAD ELECTRICA DE REPTILAS DE LA CORTEJA CE" acordó otorgarle la calificación de APTO "CUM LAUDE" IN PAR UNANIMIDAD

Sevilla, 4 de MARZO 1973

El Vocal,



El Presidente

  
Dmit.

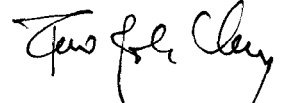
El Vocal,

Jen. D. I. C.

El Secretario,



El Vocal,



El Doctorado,

