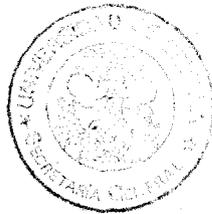


T.D.
S/48



ANALISIS DE LAS PROPIEDADES INTEGRATIVAS

DE LAS NEURONAS DE LA REGION VENTRAL

DE LA SUSTANCIA GRIS PERIACUEDUCTAL

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Depositado en *Dpto. Fisiología*
de la *Facultad de Medicina*
de esta Universidad desde el día *4-9-89*
hasta el día *20-9-89*

Sevilla *27 de septiembre* de *1989*

EL DIRECTOR DE

Diego Sánchez Romero
Diego Sánchez Romero

1989

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARIA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral
al folio *213* número *39* del libro
correspondiente. *4 SET. 1989*
Sevilla,

El Jefe del Negociado de Tesis,

Fluaduffte



AVDA. SANCHEZ PIJUAN, 4
TELEFONO 37 15 46

DEPARTAMENTO DE FISILOGIA
FACULTAD DE MEDICINA

SEVILLA - 9

Juan Ribas Serna, Profesor Titular del Departamento de Fisiología Médica y Biofísica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla.

CERTIFICA:

Que Diego Sánchez Romero ha realizado bajo su dirección el trabajo de investigación "Análisis de las propiedades integrativas de las neuronas de la región ventral de la sustancia gris periacueductal" que presenta para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla.

En Sevilla a 31 de agosto de 1989.

A handwritten signature in cursive script, reading "Ribas Serna", with a horizontal line underneath.

Fdo.: Juan Ribas Serna

INDICE

INTRODUCCION Y OBJETIVOS	1
METODOLOGIA	11
1. Estudio electrofisiológico mediante registro intracelular de las neuronas de la región ventral de la SGC.	13
1.1. Preparación de rodajas de mesencéfalo mantenidas <i>in vitro</i> .	13
1.2. Técnicas de registro y estimulación.	14
1.3. Almacenamiento y análisis de los datos.	15
1.4. Estudio electrotónico.	17
1.5. Estudio estadístico.	19
2. Estudio morfológico de la región ventral de la SGC.	20
2.1. Método de Nissl.	20
2.2. Método de Golgi.	20
2.3. Marcaje intracelular con colorantes fluorescentes.	21
2.4. Examen cualitativo y cuantitativo de las neuronas de la SGC.	22
RESULTADOS	23
1. Estudio electrofisiológico de las neuronas de la región ventral de la SGC.	24
1.1. Parámetros pasivos y análisis de la estructura electrotónica.	24
1.2. Estudio electrofisiológico y bases iónicas de los potenciales de acción de las neuronas de la SGC.	30
1.2.1. Actividad espontánea.	30
1.2.2. Características electrofisiológicas del potencial de acción.	32
1.2.3. Bases iónicas del potencial de acción.	35
1.2.4. Características eléctricas y bases iónicas de los procesos de repolarización	

de los potenciales de acción.	42
1.2.5. Estudio de una conductancia transitoria al K ⁺ .	47
1.2.6. Estudio de una posible conductancia al Ca ²⁺ de bajo umbral.	52
1.3. Estudio del disparo repetitivo de las neuronas de la SGC.	56
1.3.1. Respuesta ante pulsos rectangulares de corriente.	56
1.3.2. Respuesta ante pulsos de corriente en forma de rampa.	67
1.4. Bases iónicas del disparo repetido.	70
1.5. Poshiperpolarización de larga duración. Bases iónicas.	73
1.6. Participación de la conductancia transitoria al K ⁺ en el patrón de disparo de las neuronas de la SGC.	78
2. Estudio morfológico de la región ventral de la SGC.	82
2.1. Marcaje de neuronas mediante la inyección intracelular de colorantes fluorescentes.	82
2.2. Tinción de Nissl.	88
2.3. Método de Golgi.	88
DISCUSION	93
1. Metodología.	94
2. Análisis morfológico.	96
3. Propiedades electrotónicas.	98
4. Generación de los potenciales de acción. Propiedades oscilatorias.	101
5. Patrones de disparo repetitivo.	112
6. Propiedades integrativas de las neuronas de la SGC.	119
7. Implicaciones funcionales.	121
CONCLUSIONES	123
BIBLIOGRAFIA	129

I. INTRODUCCION Y OBJETIVOS

La sustancia gris central periacueductal (SGC) se localiza entre el romboencéfalo y el diencéfalo. Sus neuronas, de un tamaño relativamente pequeño, están densamente empaquetadas rodeando al acueducto mesencefálico. En los roedores, la SGC comienza caudalmente por delante del locus coeruleus donde el acueducto de Silvio se abre al cuarto ventrículo. Rostralmente se extiende hasta la comisura posterior donde se mezcla con la sustancia gris asociada al tercer ventrículo. Dorsal y dorsolateralmente la SGC está delimitada por los colículos superior e inferior; lateralmente, por el núcleo mesencefálico del trigémino y el núcleo cuneiforme, y ventralmente por el fascículo longitudinal medial, el núcleo troclear y el oculomotor. Gran cantidad de axones, en su mayor parte pobremente mielinizados, atraviesan la SGC en distintas direcciones con sentido ascendente o descendente, bien difusamente o bien formando haces de fibras concretos.

Una pregunta que permanece aún por aclarar es la existencia de subdivisiones dentro de la SGC. La citoarquitectura, mieloarquitectura y las conexiones de esta región han sido muy estudiadas con diferentes técnicas y en diferentes especies para intentar resolver esta cuestión. Ramón y Cajal (1911) describió la SGC caudal del gato como compuesta de dos bandas concéntricas. Castaldi (1923) dividió la SGC del cobaya en una región dorsal y otra ventral. Estudios filogenéticos y ontogenéticos, (Crosby y Woodburne, 1943; Altman y Bayer, 1981) describieron tres subdivisiones (dorsal, ventral y lateral). Hamilton (1973) dividió a la SGC en dorsal, medial y lateral. Berman (1968) halló un patrón concéntrico en la SGC del gato aunque con subnúcleos medial, lateral y dorsal bien diferenciados. Beitz (1985), mediante el análisis estadístico de regiones arbitrariamente elegidas dentro de la SGC, distinguió cuatro subdivisiones (medial, dorsal, dorsolateral y ventrolateral) en la rata. Conti y col. (1987) han identificado, con la tinción histoquímica del enzima citocromo oxidasa, estas mismas regiones a niveles caudales e intermedios de la SGC de la rata y dos bandas concéntricas a niveles rostrales. La ausencia de subdivisiones en la SGC ha sido defendida por Mantyh (1982, 1983b) que propone en la rata, el gato y el mono la existencia de pequeños grupos neuronales dispersos funcionalmente relacionados que formarían un mosaico. Gioia y col. (1984), estudiando la citoarquitectura de la SGC en gatos, y Marchand y Hagino (1983), con estudios de transporte retrógrado, niegan también la existencia de subdivisiones discernibles en esta estructura.

Una gran gama de proyecciones aferentes, eferentes e intrínsecas han sido demostradas en la SGC (Bandler y col., 1985a; Beitz, 1982; Eberhart y col., 1985; Grofová y col., 1978; Mantyh, 1983a, 1983b; Marchand y Hagino, 1983; Watkins y col. 1981) (Figura 1). No hay acuerdo entre distintos autores al asignar a estas conexiones regiones de origen o destino preferentes en la SGC. Mientras Beitz (1982) y Conti (1987) hallan diferencias cuantitativas y cualitativas entre las cuatro divisiones que ellos proponen en la SGC, Mantyh (1982) niega la existencia de un juego de conexiones propias y sin solapamiento para cada región.

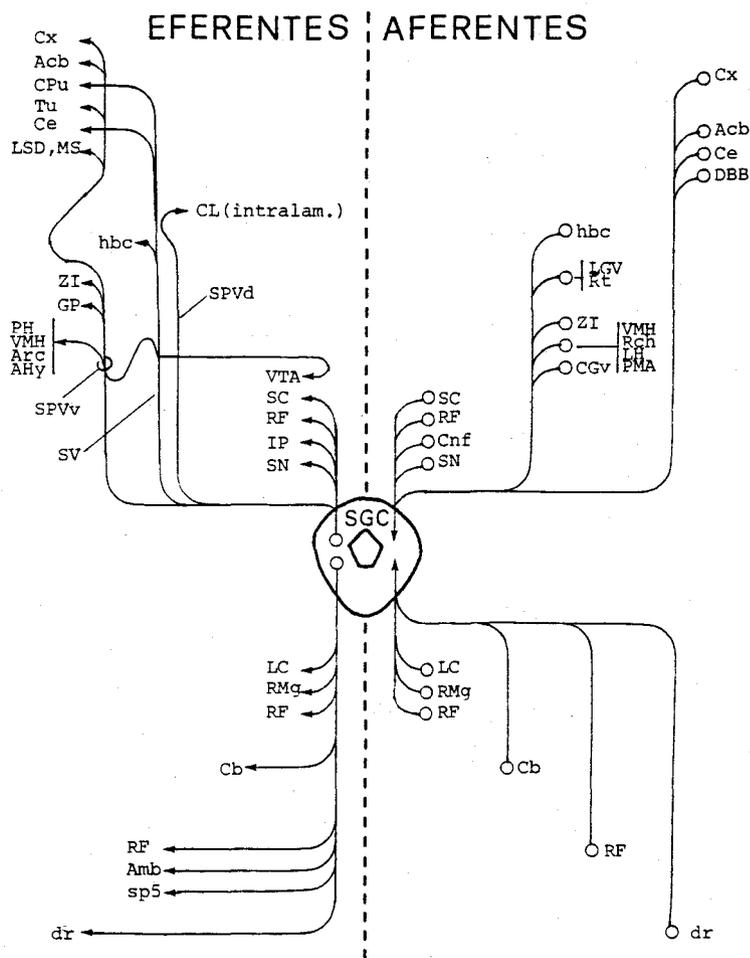


Figura 1. Esquema representativo de las principales conexiones aferentes y eferentes de la SGC. Las abreviaturas han sido tomadas de Paxinos y Watson (1982). Acb: N. accumbens; Amb: N. ambiguo; Arc: N. arcuato hipotalámico; AHy: Area anterior hipotalámica; Cb: Cerebelo; Ce: N. central de la amígdala; CGv: Sustancia gris central periventricular; CL: N. central lateral y demás núcleos intralaminares talámicos; Cnf: N. cuneiforme; CPu: Caudado y putamen; Cx: Corteza cerebral; DBB: Banda diagonal de Broca; dr: Asta dorsal medular; GP: Globus pallidus; hbc: Habénula; IP: N. interpeduncular; LC: Locus coeruleus; LGV: N. geniculado lateral ventral; LH: Hipotálamo lateral; LSD: Septum dorsolateral; MS: Septum medial; PH: Hipotálamo posterior; PMA: Area preamilar hipotalámica; Rch: Area retroquiasmática; RF: Formación reticular; RMg: N. rafe magnus; Rt: N. reticular talámico; SC: Colículo superior; SGC: Sustancia gris central periacueductal; SN: Sustancia negra; SPVd: Sistema periventricular dorsal; SPVv: Sistema periventricular ventral; sp5: N. caudal del V par; SV: Sistema ventral; Tu: Tubérculo olfatorio; VMH: N. ventromedial hipotalámico; VTA: Area tegmental ventral; ZI: Zona incerta.

Algo semejante ocurre con la distribución de receptores y de diferentes neurotransmisores en la SGC. Esta estructura es muy heterogénea desde el punto de vista neuroquímico y se han detectado receptores para opiáceos endógenos y exógenos (Goodman y col., 1980; Kuhar y col., 1973; Tempel y Zukin, 1987), neurotensina (Kitabgi y col., 1977), glutamato y aspartato (Clements y col., 1987), GABA (Palacios, 1981), sustancia P (Mantyh y col., 1984), estrógenos (Pfaff y Keiner, 1973), LH-RH (Silverman y Krey, 1978), prolactina (Harlan y col., 1983) y receptores colinérgicos muscarínicos (Beitz y col., 1982). También se han demostrado, mediante inmunocitoquímica, cuerpos celulares y procesos axónicos y dendríticos con encefalina (Moss y col., 1983), serotonina (Clements y col., 1985), neurotensina (Kalivas y col., 1982), somatostatina (Beitz y col., 1983), GABA (Belin y col., 1979), sustancia P y VIP (Moss y Basbaum, 1983), bombesina (Pert y col., 1980), dopamina (Lindvall y Björklund, 1974) y acetilcolina (Wamsley y col., 1981). El análisis de la distribución de los receptores y de los neurotransmisores y neuropeptidos en esta estructura ha llevado a diversos autores a resultados contradictorios en cuanto a la presencia de diferencias regionales.

Por tanto, con las anteriores observaciones sobre la citoarquitectura, el patrón de conexiones y la neuroquímica de la SGC, parece difícil establecer la existencia de un determinado patrón regional. Sin embargo, la localización de funciones específicas en subdivisiones específicas es un importante criterio para compartimentalizar la SGC. Por ello es importante y necesario revisar los aspectos funcionales de esta estructura.

La SGC parece poseer un papel coordinador sobre los núcleos motores del tronco del encéfalo que actúan durante las vocalizaciones. Ella recibe información del sistema límbico y constituye el eslabón entre éste y las motoneuronas de los sistemas laríngeos y respiratorio. Se ha demostrado que la actividad de las neuronas de la región dorsal y dorsolateral de la SGC caudal está correlacionada con las vocalizaciones y con la activación de los movimientos de los músculos laríngeos (Larson y Kistler, 1986). La estimulación o lesión de la SGC produce la emisión de vocalizaciones propias de la especie o la abolición de las vocalizaciones espontáneas y las producidas por estimulación de otras áreas cerebrales (Jürgens y Pratt, 1979). La posición de la SGC en el lazo estímulo-respuesta se sitúa dentro o por encima del nivel de coordinación motora.

Un patrón conductual que puede denominarse respuesta de defensa ha sido

observado en el gato ante estímulos que representan una amenaza para el animal. Esta compleja conducta contiene respuestas somatomotoras y autonómicas que son específicas para cada especie. Tal patrón ha sido evocado experimentalmente en su totalidad mediante la inyección de aminoácidos excitadores como los ácidos L-glutámico, L-aspartico y DL-homocisteico en una zona muy restringida de la SGC situada entre los colículos superior e inferior, dorsolateral y lateralmente al acueducto (Bandler y col., 1985b; Carrive y col., 1987). Estos mismos investigadores han descrito aferentes a esta zona de la SGC desde el córtex motor y frontal y desde áreas corticales somatosensoriales visuales y auditivas que pudieran estar relacionadas con la puesta en marcha de esta reacción defensiva (Bandler y col., 1985a). La estimulación eléctrica de la región dorsal de la SGC provoca en la rata y en el ratón conductas aversivas tales como respuestas de escape y respuestas conductuales denominadas de "switch-off" (el animal intenta parar o interrumpir la estimulación). Parece que la SGC y el hipotálamo medial y lateral están relacionadas con la generación y modulación de estos efectos aversivos (Sandner y col., 1985; Cazala y Schmitt, 1987). A nivel neuroquímico, este comportamiento parece estar relacionado con mecanismos sinápticos serotoninérgicos (Schütz y col., 1985), colinérgicos (Moriyama y col., 1985) dopaminérgicos, gabaérgicos y opiáceos (Schmitt y col., 1986).

La participación de la SGC en el comportamiento sexual se centra en la puesta en marcha del reflejo lordótico, una dorsiflexión de la columna vertebral de la hembra que ocurre ante estímulos somatosensoriales producidos por el macho durante la cópula. Las neuronas de la SGC dorsal y dorsolateral responden selectivamente a estímulos somatosensoriales semejantes (Rose, 1978); además, la lesión o estimulación de la SGC eliminan o evocan lordosis (Floody y O'Donohue, 1980; McEwen y Pfaff, 1973). La LH-RH potencia la lordosis (Sakuma y Pfaff, 1980) y se han descubierto axones con LH-RH en la SGC posiblemente procedentes del hipotálamo (Shivers y col., 1983). La LH-RH también incrementa el disparo de neuronas de la SGC dorsal y dorsolateral (Samson y col., 1980) sobre todo previa administración de estrógenos (Schiess y col., 1987). A este respecto la SGC concentra estrógenos procedentes del hipotálamo (Krieger y col., 1979) y la lordosis es dependiente de estrógenos (Floody y col., 1986). Parece ser que algunas neuronas de la SGC activan a otras de la vía retículoespinal que convergen con axones vestibuloespinales sobre las motoneuronas de los músculos de la espalda cuya contracción se requiere para la lordosis (Cottingham y Pfaff, 1987). Reuniendo todos estos descubrimientos se ha hipotetizado que la SGC no

integra directamente un arco reflejo simple para la producción del reflejo lordótico sino que más bien recibe la entrada somatosensorial y modula su propia salida hacia niveles bulboespinales después de integrar las entradas neurales y hormonales que vienen desde hipotálamo, fundamentalmente del núcleo ventromedial, y del área preóptica medial (Schuess y col., 1987). La SGC también participa en ciertas pautas sonoras dependientes de estrógenos que forman un componente proceptivo del comportamiento sexual en roedores y aves canoras (Floody y O'Donohue, 1980).

La función de la SGC a la que más trabajo de investigación se ha dedicado es, sin duda, su participación en la nocicepción y en los mecanismos endógenos de control del dolor. Desde que Reynolds (1969) describió un potente efecto analgésico al estimular eléctricamente la SGC, una ingente cantidad de investigaciones han sido y son llevadas a cabo para poner en claro cual es el papel de esta estructura en la analgesia endógena.

La transmisión de información nociceptiva a través de fibras aferentes A δ y C en las raíces dorsales de la médula espinal puede ser modulada tanto a nivel segmentario como a nivel supraespinal. La activación de fibras aferentes de gran diámetro de las raíces dorsales (A α y β) inhibe a las neuronas espinales que responden a la estimulación de carácter nociceptivo (Besson y Chaouch, 1987). La estimulación eléctrica de variadas estructuras jerárquicamente superiores del sistema nervioso tales como el córtex cerebral (Yeziarski y col., 1983), áreas talámicas (Dickenson, 1983), hipotalámicas (Carstens, 1982) y septales (Carsten y col., 1982) así como de amplias regiones del troncoencéfalo (Taub, 1964; Oliveras y col., 1974), ejerce un control más o menos claro sobre la transmisión nociceptiva en la médula espinal (Besson y Chaouch, 1987).

La SGC, concretamente la zona ventral caudal, el núcleo dorsal del rafe y el núcleo magno del rafe son las estructuras troncoencefálicas que más se relacionan con la analgesia producida por estimulación eléctrica (Oliveras y col., 1974). La inyección de opiáceos exógenos y endógenos en esas estructuras también provoca analgesia. Se han sugerido mecanismos paralelos para estas dos formas de producir analgesia (Mayer y col., 1976). La SGC parece tener un papel fundamental en el circuito neural que controla a nivel supraespinal la información nociceptiva que le llega al sistema nervioso central mediante el sistema anterolateral y el funículo dorsolateral (Basbaum y Fields, 1984). Actualmente se tiende a vincular la SGC ventral con los mecanismos analgésicos mientras que las zona dorsal y dorsolateral se relacionan con fenómenos

aversivos. El modelo más apoyado por los investigadores sobre el sistema endógeno de analgesia propone (Basbaum y Fields, 1984) que la SGC recibe la información nociceptiva y ésta es transmitida a la región ventromedial del bulbo, núcleo magno del rafe y ciertos núcleos de la formación reticular bulbar. Las proyecciones espinales de estas estructuras discurren por el funículo dorsolateral y otras vías descendentes menos importantes y originan un asa de realimentación negativa que produce la inhibición de la transmisión nociceptiva en la médula espinal. La SGC recibiría la información nociceptiva de la médula pero, además, otros centros superiores con los que mantiene estrechas conexiones podrían modular la salida de la SGC. Este sistema parece tener un cierto grado de actividad tónica (Hayes y col., 1984). El sustrato neuroquímico de este modelo implica a mecanismos opiáceos, serotoninérgicos, noradrenérgicos, neurotensinérgicos, etc. (Akil y Liebeskind, 1975; Basbaum y Fields, 1984).

No obstante, muchas son las controversias que surgen debido a los distintos resultados obtenidos a la hora de demostrar las vías y las acciones de las sustancias químicas propuestas como neurotransmisores en este sistema. El hallazgo de nuevos datos y el uso de diferentes procederes metodológicos para afrontar el problema traen consigo la aparición de nuevos puntos de vista acerca de la organización del sistema endógeno de analgesia. Basten tres ejemplos para comprender la alteración que pudiera sufrir en breve el modelo anterior. Le Bars y col. (1979a y b) describieron la inhibición de la actividad de neuronas no específicamente nociceptivas del asta dorsal espinal al aplicar estímulos dolorosos en áreas distantes al campo sensorial de dichas neuronas. Este control de la información nociceptiva involucra al sistema anterolateral, el funículo dorsolateral, el núcleo magno del rafe y a mecanismos serotoninérgicos. Lo novedoso de este hallazgo reside en el papel que pueden jugar en la transmisión de señales dolorosas las neuronas no específicamente nociceptivas. En segundo lugar, Fields y col. (1983a y b) identificaron dos tipos de neuronas en la región ventromedial del bulbo y en la SGC (Heinricher y Fields, 1988) a las que llamaron células "on" y "off". La respuesta de estas neuronas a la administración de morfina, estimulación dolorosa periférica y estimulación de la SGC parece contradictoria con el modelo aceptado del sistema analgésico y más bien apunta a la separación en mecanismos distintos de la analgesia producida en esas tres situaciones. Por último Hayes y col. (1978) estudiaron el sistema encargado de la modulación de los estímulos dolorosos tratando de identificar situaciones y estímulos ambientales que produjeran analgesia. Desde esta

perspectiva describieron la existencia de sistemas analgésicos no opiáceos. Watkins y Mayer (1982) revisaron todas las respuestas inhibitoras de los estímulos dolorosos y propusieron cuatro tipos de analgesia: 1) analgesia mediada por mecanismos nerviosos opiáceos, 2) analgesia neural no opiácea, 3) analgesia hormonal relacionada con opiáceos y 4) analgesia hormonal no opiácea, las cuales se producen por distintos mecanismos.

La SGC, independientemente de considerar la subdivisión de ella en regiones o bien la distribución de sus neuronas en "parches", es indudable que forma parte de varios circuitos neurales que son el sustrato de las distintas formas de control de la transmisión nociceptiva que hoy se postulan.

Una vez tratado el estado actual de conocimiento de la organización y función de la SGC, estimo necesario el relacionar conceptualmente esta información con los paradigmas vigentes acerca de la organización de la función cerebral, para así generar una hipótesis de trabajo inicial.

La teoría evolucionista influyó decisivamente en la creación de un principio jerárquico tanto estructural como funcional en el cual se basaría la elaboración de conductas más complejas conforme al desarrollo filogenético del sistema nervioso. A mediados del presente siglo surge el concepto de que el cerebro es un complejo de sistemas amplia y recíprocamente interconectados y que la verdadera esencia de la función cerebral reside en la interacción dinámica dentro y entre tales sistemas. Esto obligó a revisar el principio de las jerarquías en el sistema nervioso. Posteriormente un nuevo paradigma se articuló a partir de todos los anteriores. Las principales estructuras cerebrales (tálamo, neocórtex, formación reticular, ganglios basales...) están compuestas de circuitos locales que forman módulos. Dentro de cada una de estas áreas, dichos módulos varían de una estructura a otra en el número de células, organización estructural y forma del procesamiento neuronal. Los módulos están agrupados en entidades en virtud de sus conexiones extrínsecas comunes o dominantes, de la necesidad de tener agrupadas funciones que se repiten con una organización topográfica, o de la ventaja que supone la posibilidad de establecer ciertas interacciones intermodulares. A su vez, estos módulos pueden estar divididos en subgrupos de módulos que están conectados, conservando un orden topológico, a otros subgrupos de otras entidades para formar un sistema distribuido. Estos sistemas dan lugar a funciones distribuidas. Un único módulo puede pertenecer a varios sistemas distribuidos. La información fluye dinámicamente por el sistema

y la localización de la señal de comando varía dependiendo de la urgencia con que cierta parte del sistema necesite esa información. La función no está, por tanto, delimitada en una parte concreta del sistema sino que reside en todo él, es una propiedad de la actividad dinámica dentro de él (Mountcastle, 1979).

Recientemente han aparecido modelos que completan este paradigma al abordar el problema de la separación y posterior integración de señales en términos de circuitos locales con funciones totalmente independientes, actuando en paralelo y comunicados entre sí (Zeki y Shipp, 1988).

Ahora bien, usando la terminología de Mountcastle (1979) ¿es la SGC una región de confluencia de varios sistemas distribuidos, con sus respectivas y diferentes funciones distribuidas?, o bien ¿esta estructura en conjunto forma un único sistema con módulos organizados, con una segregación en cuanto a las características o propiedades de las múltiples entradas sinápticas, que hacen corresponder su función básica con variados patrones conductuales?. Se puede observar una clara relación en cuanto a las, en principio, diferentes funciones anteriormente citadas. Ante una misma entrada somatosensorial el animal puede poner en marcha una respuesta sexual, aversiva, fonatoria u organizar una inhibición de dicha entrada mediante el sistema endógeno de analgesia. Por todo lo anterior, consideramos a la SGC como un único sistema distribuido. Podemos postular que esta estructura está compuesta por grupos de neuronas funcionalmente relacionadas, los cuales podrían disponerse con una cierta organización espacial, y que su función básica consiste en que, existiendo previamente un sustrato afectivo, emocional, hormonal, etc. la SGC actúa como discriminador de las entradas somatosensoriales y viscerales, selecciona la salida eferente según ese sustrato y, bien de forma autónoma o bien en conexión con otras estructuras nerviosas, coordina la respuesta que originará una conducta organizada más o menos complicada.

Es evidente que la anterior proposición no podrá ser validada en el presente trabajo. Quizás nunca llegemos a conocer la verdadera organización y función de la SGC, pero es legítimo el tratar de responder a esa pregunta organizando la información existente y creando una hipótesis que, a pesar de no poder contrastarse, dirija nuestra investigación hacia una meta concreta.

Desde mediados del presente siglo se admite por parte de la comunidad de neurocientíficos la prioridad de estudiar el sistema nervioso en términos de

neuronas individuales. Prioridad necesaria pero obviamente insuficiente para comprender el complejo funcionamiento global del mismo.

En este contexto, para entender el procesamiento de la información a nivel celular en una red o circuito neuronal se necesita el conocimiento de las conexiones que se establecen en la red, de los procesos de transmisión sináptica y de las propiedades electrofisiológicas intrínsecas específicas de las neuronas que forman el circuito.

Actualmente poseemos información, aunque incompleta, referente a las conexiones y a la neurotransmisión en alguno de los circuitos en los que participa la SGC. Así mismo se han establecido, mediante técnicas de registro electrofisiológico extracelular, relaciones causa-efecto entre el disparo de neuronas de determinadas regiones de la SGC y una serie de funciones descritas anteriormente. Sin embargo nada se conocía acerca de las propiedades electrofisiológicas básicas de la membrana de las neuronas de la SGC. Dirigimos, pues, nuestra atención al estudio analítico de dichas propiedades eléctricas confiando en que su conocimiento facilitará la explicación de cómo estas neuronas interactúan entre sí y con otras neuronas del sistema nervioso para dar lugar a un comportamiento determinado.

Para dicho estudio elegimos la técnica del registro intracelular, con micropipetas de vidrio, del potencial de membrana de las neuronas en una preparación de rodajas de mesencéfalo de mamífero mantenidas *in vitro*. Esta elección permitió registrar de forma fiable y estable el potencial de membrana de reposo de la célula y sus alteraciones transitorias, potenciales de acción y potenciales sinápticos, las cuales constituyen las señales básicas en el flujo de información en el sistema nervioso. Además pudimos estimular la célula registrada por medio de la inyección de corriente continua a través de la micropipeta de registro y, dada la ventaja de la preparación de rodajas de poder modificar fácilmente el medio extracelular, pudimos estudiar las bases iónicas de la respuesta eléctrica de las neuronas de la SGC. Dentro de esta estructura nos centramos en el estudio de la región ventral de la misma dado que dichas neuronas parecen estar implicadas preferentemente en el sistema endógeno de analgesia y es esta la función mejor conocida de la SGC.

INTRODUCCION Y OBJETIVOS

Los objetivos concretos de este trabajo fueron:

- Estudio de las propiedades electrotónicas de la membrana de las neuronas de la región ventral de la SGC.

- Estudio de las características electrofisiológicas de los potenciales de acción generados por estas neuronas y de las conductancias iónicas activas que participan en ellos.

- Estudio de la relación entrada-salida de dichas neuronas mediante el análisis del disparo repetitivo generado ante la estimulación con corriente inyectada intracelularmente, y de las bases iónicas de dicho disparo.

- Estudio morfológico de las neuronas registradas.

II. METODOLOGIA

1. Estudio electrofisiológico mediante registro intracelular de las neuronas de la región ventral de la SGC.

1.1. Preparación de rodajas de mesencéfalo mantenidas *in vitro*.

Los animales de experimentación utilizados en este trabajo fueron cobayas (*Cavia cobaya*) de ambos sexos y de 200-400 g de peso. Al animal se le anestesió con tiopental sódico (Abbott) mediante inyección intraperitoneal a dosis de 25 mg/kg de peso. Tras su decapitación y craniectomía se extrajo cuidadosamente el mesencéfalo, el cual se sumergió en el medio de incubación estándar (Tabla I) oxigenado y enfriado a 6°C. Se retiraron cuidadosamente los vasos que permanecían adheridos a la superficie del mesencéfalo y la pieza de tejido se pegó con cianoacrilato en una cubeta rodeada de bloques de agar, todo ello para evitar posibles deformaciones durante el corte. La cubeta se llenó después con el medio de incubación estándar oxigenado y frío. Con un vibratomo (Láncer mod. 1000) se cortaron cinco rodajas coronales de 400 µm de espesor. Todo este proceso duró aproximadamente quince minutos. Las rodajas se depositaron en unos recipientes de vidrio llenos del medio de incubación estándar oxigenado y a temperatura ambiente, estando en esta situación durante noventa minutos. Este periodo, llamado de preincubación, es necesario para la recuperación del daño producido en el tejido durante el corte. Tras la preincubación, las rodajas se sumergieron en la cámara de registro donde el medio de incubación estándar fluía laminarmente a 2 ml/min y con una temperatura de 35°C mantenida por un calentador dotado de un termostato. En este periodo, denominado de incubación, se llevó a cabo el registro. La rodaja se mantuvo sumergida en el medio de incubación con unos hilos de plata y las estructuras objeto de estudio pudieron localizarse mediante transiluminación y visualización con una lupa estereoscópica. El medio de incubación estándar es similar al líquido cefalorraquídeo y se burbujeó con una mezcla de O₂ (95%) y CO₂ (5%) para oxigenarla y favorecer la formación del tampón CO₂-bicarbonato que mantiene el pH a un valor de 7.4. Otras soluciones se utilizaron para modificar la composición iónica del medio extracelular. La composición de todas las soluciones empleadas viene dada en la tabla I.

Tabla I. Composición de las soluciones empleadas en los experimentos.

	Estándar (mM)	Control (mM)	0 Na ⁺ (mM)	0 Ca ²⁺		
				Co ²⁺ (mM)	Cd ²⁺ (mM)	Ba ²⁺ (mM)
NaCl	124	130	0	130	130	130
KCl	5	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2
CaCl ₂	2.4	2.4	2.4	0	0	0
CoCl ₂	0	0	0	2.4	0	0
CdCl ₂	0	0	0	0	2.4	0
BaCl ₂	0	0	0	0	0	2.4
MgCl ₂	0	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3
CO ₂ HNa	26	0	0	0	0	0
PO ₄ H ₂ Na	1.2	0	0	0	0	0
SO ₄ Mg	1.3	0	0	0	0	0
Tris (*)	0	25	155	25	25	25
Glucosa	10	10	10	10	10	10

(*) Hidroximetilaminoetano. pH = 7.4.

1.2. Técnicas de registro y estimulación.

Los electrodos para el registro intracelular se fabricaron con capilares de vidrio de borosilicato (AM Systems Nº catálogo 6030) estirados por calor (estirador Narishige mod. PE2). Estas micropipetas se llenaron con una solución de acetato potásico 3 M (Sigma). La resistencia de estos electrodos al paso de corriente continua fue de 50-70 MΩ. Un micromanipulador mecánico (Huxley-Goodfellow mod. HG-3000) se usó para la colocación de la micropipeta en el área de registro y para la penetración de las células. La diferencia de potencial entre la punta de la micropipeta y el electrodo de referencia situado en la cámara de perfusión se registra mediante un amplificador (NEURO DATA Mod. IR 183). Este, además de contar con las etapas de ganancia y acoplamiento de impedancias propias de un amplificador para registro intracelular, permite inyectar corriente continua de hasta 10 nA y compensar resistencias,

capacitancias y diferencias de potencial debidas al electrodo y a cualquier otra causa que pudieran enmascarar las características eléctricas intrínsecas de las neuronas registradas. El amplificador tiene también un sistema para facilitar la penetración celular. La estimulación de las células estudiadas se realizó a través de la micropipeta de registro bien mediante corriente continua estable generada por el propio amplificador, o bien con pulsos de corriente: a) rectangulares, producidos por un generador de pulsos construido en nuestro laboratorio, b) triangulares producidos por un generador de funciones (FG 502 Tektronix) y c) en forma de rampa por un generador de rampas (R 501 Tektronix). La señal de voltaje recogida por el amplificador y la corriente inyectada a la célula se monitorizaron en un osciloscopio de rayos catódicos con memoria digital (Tektronix Mod. 2230). El osciloscopio, así como el vídeo grabador y el registrador de señales usado en la etapa de almacenamiento y análisis, son disparados por un pulso TTL procedente del generador de pulsos. La señal de voltaje es asimismo amplificada y reproducida como señal audible por un altavoz. La preparación se aisló del ruido eléctrico producido por los aparatos alimentados por corriente alterna mediante una jaula de tela metálica conectada a tierra.

1.3. Almacenamiento y análisis de los datos.

Las señales de voltaje, de corriente, de disparo para sincronización y los comentarios acerca de los registros realizados se almacenaron mediante un vídeo grabador (BETA SL-HF950E/ES, SONY) en cintas de vídeo (L-750 BETA DYNAMICRON, SONY) previa conversión digital de las señales analógicas de voltaje y corriente por un procesador digital con PCM (modulación por codificación de pulsos) (PCM-F1, SONY) modificado según la idea original de Bezanilla (1985). Este sistema permite la conversión analógico-digital con un ancho de banda de 0 a 20 kHz y con una frecuencia de muestreo de 44 kHz. La reproducción se lleva a cabo con la conversión digital-analógica de las señales almacenadas en las cintas de vídeo.

El análisis de los registros se realizó mediante su observación directa en el osciloscopio. En el modo de almacenamiento digital, el osciloscopio usado tiene una frecuencia máxima de muestreo de 20 MHz y posibilita una adquisición de las señales de voltaje y corriente contando con 500 ó 2000 puntos por pantalla. La definición de la señal depende, por tanto, de la base de tiempo

usada. También pueden hacerse medidas de las señales grabadas usando, en el modo de almacenamiento digital, dos cursores. La obtención de copias en papel de los registros, bien para análisis más detallado o bien para el diseño de figuras demostrativas, se realizó con un registrador de señales y trazador digital (HP-7090A, Hewlett Packard). Este aparato se utilizó como instrumento autónomo, sin conexión con un ordenador, dada la posibilidad de almacenamiento en función del tiempo de tres señales distintas en tres memorias, cada una de ellas con una capacidad de 1000 muestras por canal, previa conversión analógico-digital a una frecuencia máxima de muestreo de 33.3 kHz. También fue posible anotar medidas directamente en el papel con la ayuda de cursores.

Cuando, durante el análisis, fue necesario obtener el registro de la derivada de la señal de voltaje, éste se realizó mediante un amplificador operacional con la configuración de diferenciador (Tektronix Mod. AM 501).

Todos los parámetros electrofisiológicos obtenidos se archivaron con un ordenador IBM PC (XT) en una base de datos (dBASE III).

En la figura 2 se presenta un diseño del dispositivo experimental.

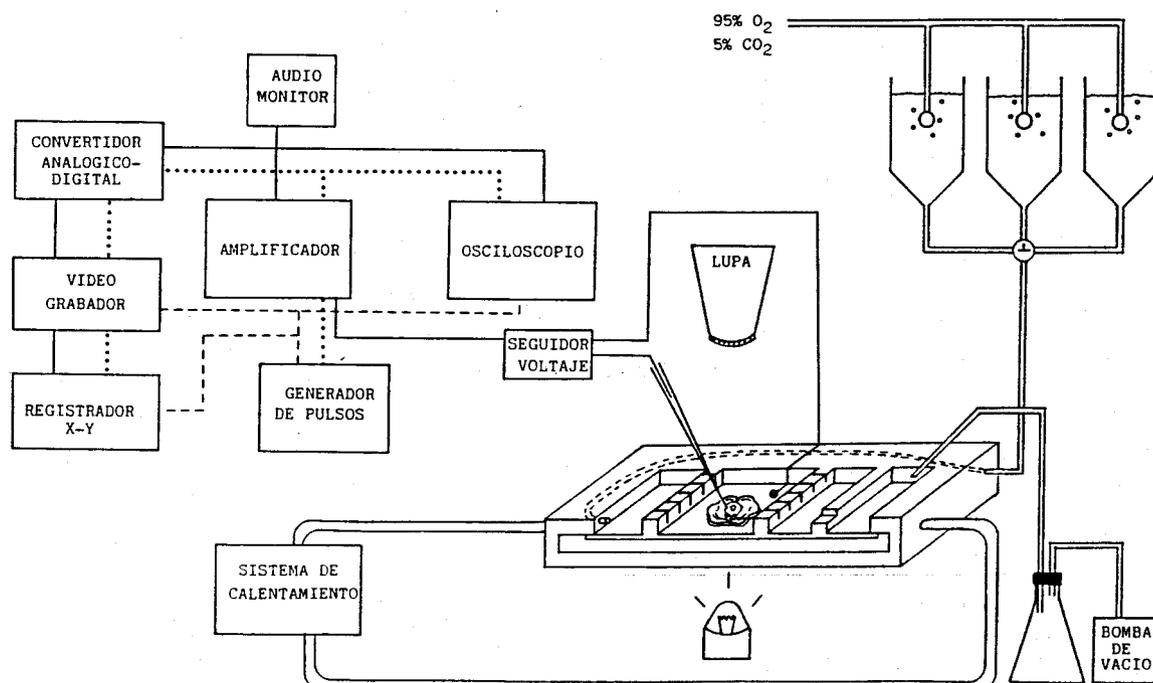


Figura 2. Diseño del dispositivo experimental. Línea continua: señal de voltaje. Línea de puntos: señal de corriente. Línea discontinua: señal de sincronización.

1.4. Estudio electrotónico.

Se determinaron las curvas voltaje-corriente ($V-I$) y se analizó el estado transitorio del cambio de voltaje producido en la neurona ante la estimulación con pulsos rectangulares de corriente hiperpolarizante de pequeña amplitud ($\ll 0.25$ nA). Aquellas células que mostraron actividad espontánea fueron previamente hiperpolarizadas por medio de la inyección de corriente continua estable para evitar la presencia de conductancias activas. Se tuvo especial cuidado en que las compensaciones de la resistencia y la capacidad del electrodo fueran óptimas. Para ser considerados válidos para el análisis, los transitorios capacitativos debían tener, tras la compensación, no más de 500 μ s. Las determinaciones de los parámetros electrotónicos se realizaron siempre en la zona lineal de la curva $V-I$. Este estudio se basa en la teoría de cable lineal (Rall, 1977) y el modelo neuronal utilizado fue el de un soma isopotencial unido a un cilindro uniforme y finito que equivaldría a las dendritas. Este modelo se define completamente por cuatro parámetros que pueden estimarse electrofisiológicamente: 1) la resistencia de entrada (R_N) medida en el soma, 2) la constante de tiempo de la membrana (τ_0), 3) la longitud electrotónica del cilindro dendrítico equivalente (L), definida como el cociente entre la longitud real del cilindro equivalente y la constante de espacio de la membrana, y 4) la razón de la conductancia del cilindro equivalente respecto a la del soma (ρ).

Según Rall (1977) un potencial electrotónico puede ser representado como una combinación lineal de términos exponenciales:

$$V_r - V_t = \sum C_i \exp(-t/\tau_i) \quad (1)$$

donde V_r es el valor final de voltaje producido por el pulso y V_t es el voltaje en el tiempo t . Para observar mejor la contribución de constantes de tiempo más rápidas se deriva la expresión anterior:

$$dV/dt = \sum (C_i/\tau_i) \exp(-t/\tau_i) \quad (2)$$

Debido a la dificultad de obtener más de dos τ en el estado transitorio del cambio de voltaje, se toman los dos primeros términos de la serie:

$$dV/dt = a_0 \exp(-t/\tau_0) + a_1 \exp(-t/\tau_1)$$



siendo $a_0 = C_0/\tau_0$ y $a_1 = C_1/\tau_1$. Un valor aproximado de dV/dt se obtuvo tomando en el registro de voltaje $\Delta V/\Delta t$ para intervalos de tiempo ≤ 5 ms. Se representaron los valores de dV/dt en una gráfica semilogarítmica respecto al tiempo y los últimos valores de dV/dt se ajustaron a una exponencial mediante el criterio de los mínimos cuadrados. La diferencia entre los primeros valores de dV/dt y la exponencial ajustada anteriormente fue de nuevo ajustada a otra exponencial. Al representarse semilogarítmicamente, ambas exponenciales dieron lugar a sendas rectas y de sus respectivas pendientes se estimaron τ_0 y τ_1 .

Cuando $t = 0$:

$$|dV/dt| \approx (a_0 + a_1)$$

Así, se pueden extraer a_0 y a_1 de la intersección de cada una de las dos exponenciales con la ordenada (ver figura 5). Con estos parámetros y con la R_m extraída de la zona lineal de la curva $V-I$ se determinaron L y ρ .

Para la determinación de ρ y L se utilizaron dos métodos. El primero de ellos fue establecido por Johnston (1979, 1981) a partir del mismo modelo y base teórica que nuestro estudio. L se calcula en este método mediante sustitución por ensayo-error de una estimación inicial de L ($L \approx \pi/\alpha_1$; $\alpha_1 = (\tau_0/\tau_1) - 1$) en la siguiente ecuación:

$$[a_1/(2a_0 - a_1)] = \cot(\alpha_1 L) [\cot(\alpha_1 L) - 1/(\alpha_1 L)] \quad (3)$$

Una vez hallada L , ρ se obtiene de la ecuación fundamental dada por Rall (1977):

$$\rho = -\alpha_1 \cot(\alpha_1 L) \tanh(L) \quad (4)$$

Este método nos da valores fiables de L si $[a_1/(2a_0 - a_1)]$ es de pequeño valor. Hemos seguido la sugerencia de Brown (1981) de no usar este método si dicho valor es > 5 .

El segundo método (Brown y cols., 1981) calcula primero ρ según la ecuación:

$$\rho = (\tau_0/V_{\infty}) (a_0 + a_1) - 1 \quad (5)$$

donde V_{∞} es el valor en el estado estacionario del potencial electrotonico estudiado. Una vez conocida ρ , se obtiene una estimación inicial de L ($L \approx \pi (\rho/(\rho+1)) / \alpha_1$) y, por ensayo-error, se calcula L de (4). Este método subestima ρ en un 35% y L en un 8% (Brown y cols., 1981) y sólo lo hemos utilizado en el caso en que no se cumpliera la condición antes establecida para el método Johnston.

Del valor de L puede obtenerse el factor de atenuación del voltaje (H) que viene dado por

$$H = V_0/V_L = \cosh L$$

donde V_0 es el voltaje en el lugar de inyección de corriente y V_L el voltaje al final del cilindro uniforme teórico cuya longitud electrotonica es L (Jack y cols., 1975). La resistividad específica (R_m) se calculó según

$$R_m = \tau_0/C_m$$

donde C_m es la capacidad de la membrana y tiene un valor ($1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$) bastante constante en todas las células eucarióticas en las que se ha estimado.

Para obtener todos los anteriores parámetros electrotonicos se diseñó un programa en BASIC para un ordenador IBM PC (XT), al cual se le introducían manualmente los valores del cambio de voltaje producido ante el pulso hiperpolarizante y el tiempo en el que dichos valores de voltaje se tomaban respecto al comienzo del pulso. Estos valores de voltaje y tiempo se obtuvieron mediante cursores en una copia en papel del estado transitorio del cambio de voltaje realizada por el registrador de señales y trazador digital.

1.5. Estudio estadístico.

Para realizar el estudio estadístico de todas las variables electrofisiológicas y morfológicas se utilizó el programa MICROSTA y un ordenador IBM PC (XT). Los parámetros cuantitativos se traspasaron directamente de la base de datos a dicho paquete estadístico y se calcularon los estadígrafos fundamentales de la muestra a considerar: media, desviación típica y varianza. Para comprobar la normalidad de la muestra para cualquier parámetro considerado

se utilizó la prueba de bondad de ajuste de la χ^2 de Pearson con un nivel de significación del 5 %. Para comprobar la homogeneidad de la varianza se usó la prueba de Cochran. Para contrastar la hipótesis de igualdad de medias se utilizó el análisis de la varianza con un solo factor de variación. Para evaluar posibles diferencias entre medias cuando el análisis de la varianza no dió resultados estadísticamente significativos se realizó la prueba de comparaciones múltiples de Scheffé. Para hallar relaciones entre los parámetros se calculó el coeficiente de correlación de Pearson.

2. Estudio morfológico de la región ventral de la SGC.

2.1. Método de Nissl.

Para el análisis mediante esta técnica histológica se utilizaron 2 cobayas (*Cavia cobaya*) de 200 a 400 g de peso. Los animales se anestesiaron intraperitonealmente con tiopental sódico (Abbott) (30 mg/kg). A continuación se les perfundió por vía intracardiaca con paraformaldehído al 4 % en tampón fosfato 0.12 M a pH = 7.4 como solución fijadora. Tras un breve periodo de fijación *in situ* a 4°C, el mesencéfalo se extrajo cuidadosamente y se fijó durante una noche a 4°C. Tras el tallado del mesencéfalo, las piezas fueron deshidratadas en una serie creciente de etanol, finalmente sumergidas en butanol e incluidas en parafina. Se realizaron secciones coronales seriadas de 10 μ m de grosor con un microtomo (Minot). Tras su desparafinación las secciones fueron rehidratadas y teñidas con cresil violeta y tionina al 0.5 % en tampón acetato, nuevamente deshidratadas en etanol, aclaradas en xilol y montadas con Eukitt[®]. Para la observación, medidas y fotografías se utilizó un microscopio (Dialux 20 Leitz).

2.2. Método de Golgi.

Para este método se utilizaron 8 cobayas de las mismas características citadas anteriormente. La perfusión en este caso se realizó con una solución salina (NaCl 0.9 % en H₂O destilada) heparinizada seguida de una solución de formaldehído al 4 % en H₂O destilada, ambas a 37°C. En cada animal el tronco del encéfalo fue cuidadosamente extraído y se hizo un bloque mesencefálico de 1 cm

de grosor de orientación coronal. Dicho bloque fue tallado mediante cortes parasagittales por fuera de los límites de la SGC con el fin de que la induración fuera más efectiva en las zonas internas de esta estructura.

Se emplearon dos variantes del método de Golgi. En la primera de ellas (Golgi-del Río Hortega) la induración consistió en la inmersión del bloque en una solución de 1.5 g de $K_2Cr_2O_7$, 5 g de hidrato de cloral, 5 ml de formaldehído al 40 % y 50 ml de H_2O destilada donde permaneció 4 días (2 pasos de 2 días) a $42^{\circ}C$. Posteriormente, para la impregnación, se mantuvo el bloque durante 3 días en una solución de $AgNO_3$ al 1% en H_2O destilada a temperatura ambiente ($20-25^{\circ}C$) y en oscuridad. En el segundo procedimiento (Golgi-Kopsch) se utilizó para la perfusión la solución tamponada de Lillie (pH = 7.2). Tras la extracción, el mesencéfalo se cortó en rodajas de 3 mm que se mantuvieron en dicha solución tamponada durante 3 días. La induración se realizó en una solución de 12 g de $K_2Cr_2O_7$ y 1 g de OsO_4 en H_2O destilada durante 5 días a $42^{\circ}C$. La impregnación es igual que en el primer método.

Los bloques se encastraron en agar y se fijaron con cianoacrilato a la platina de un vibratomo (Lancer mod. 1000). Se realizaron cortes seriados de 100 μm de espesor (200 μm en el segundo procedimiento) y dichos cortes se deshidrataron en una serie graduada de alcoholes, se aclararon en xilol (terpinol y xilol en el segundo método) y se montaron y cubrieron con DPX en portas gelatinizados. Para la observación de las neuronas teñidas se utilizó un microscopio (Dialux 20 Leitz) equipado con cámara fotográfica.

2.3. Marcaje intracelular con colorantes fluorescentes.

Este marcaje se llevó a cabo en rodajas de mesencéfalo de cobaya mantenidas *in vitro* obtenidas según el procedimiento descrito anteriormente. Para la inyección intracelular se usaron micropipetas de vidrio de borosilicato (Frederick Haer N° catálogo 30-32-0) estiradas con calor (estirador Narishige mod. PE2) que se llenaron con una solución de la sal de litio del colorante fluorescente amarillo Lucifer (Sigma) al 5% en H_2O destilada. Estas micropipetas presentaron una resistencia al paso de corriente de 80-100 $M\Omega$. Tras la penetración de la neurona, la inyección se realizó mediante iontoforesis con pulsos de corriente hiperpolarizante de 0.5 nA de 500 ms con una frecuencia de 1-2 Hz superpuestos a una corriente continua hiperpolarizante de 0.5 nA. El tiempo de inyección fue de 2-5 min. Tras la inyección se fijó la rodaja en una

solución de formaldehído comercial (40 %) al 10 % en volumen en tampón fosfato 0.1 M (pH 7.4) durante 15-30 min. Posteriormente se deshidrató con una serie graduada de alcoholes, se aclaró en xilol y en metilsalicilato (Sigma) y en este último se guardó en oscuridad. Así permaneció la rodaja hasta su visualización, siempre en las 5-6 h siguientes a la inyección, con un microscopio (Reichert-Jung) con equipo de fluorescencia y de fotografía. El filtro usado permitió la excitación de la rodaja con radiación ultravioleta de $\lambda = 460-480$ nm. Las neuronas se fotografiaron con una película Ektachrome 400 (Kodak).

2.4. Examen cualitativo y cuantitativo de las neuronas de la SGC.

El análisis cualitativo se centró en el estudio de la orientación del soma y del árbol dendrítico respecto al acueducto, y el origen y trayectoria del axón en aquellas células en que se diferenció claramente de los procesos dendríticos. Para el análisis cuantitativo se realizaron medidas de los siguientes parámetros: eje mayor de la neurona, número de dendritas primarias y máxima extensión del árbol dendrítico. Las neuronas marcadas con amarillo Lucifer y las impregnadas con el método de Golgi se clasificaron según la forma de su soma.

La medición y conteo de las neuronas teñidas con el método de Nissl se llevaron a cabo por el siguiente procedimiento: 1) en cada sección sólo se estudió la región ventral izquierda o derecha de la SGC, en base a criterios técnicos. 2) una sección de cada cinco fue examinada sistemáticamente a lo largo del eje caudo-rostral con un objetivo de 40 aumentos. 3) en cada sección se seleccionó un rectángulo de $2500 \mu\text{m}^2$ situado en la zona en la que habitualmente se realizaron los registros electrofisiológicos (Figura 49 A-C). 4) Sólo se midieron aquellas neuronas que exhibían un núcleo, y al menos un nucleolo, bien visibles, así como un citoplasma de características neuronales con el fin de descartar en lo posible el conteo de elementos gliales. 5) Los datos obtenidos se agruparon en el ordenador y se analizaron con el programa estadístico citado en el apartado 1.5. Todos los conteos y medidas fueron realizados por la misma persona por lo que cualquier error en la sistemática empleada podría ser asumido como constante. La metodología de Abercrombie (1946) fue tomada como referencia en todos los conteos. No obstante, debido al grosor de las secciones no fue considerado necesario realizar la corrección que este autor propone en función del grosor del nucleolo.

III. RESULTADOS

1. Estudio electrofisiológico de las neuronas de la región ventral de la SGC.

Los resultados presentados en este trabajo corresponden a 114 células registradas intracelularmente en las regiones ventromedial y ventrolateral de la SGC (Beitz 1982). A niveles caudales de dichas regiones se sitúa el núcleo dorsal del rafe; por ello se escogieron las rodajas en las que tal estructura no estuviera presente, tomando como referencia el núcleo oculomotor (Figura 3 B).

Se establecieron varios criterios para considerar que las neuronas penetradas no habían sido dañadas por la micropipeta y que, por tanto, se podía proceder al estudio electrofisiológico y al almacenamiento de los registros obtenidos. Dichos criterios fueron: 1) presentar un potencial de membrana de reposo (PMR) estable y superior a -40 mV (ver Discusión), 2) una constante de tiempo de la membrana de más de 5 ms, 3) generar potenciales de acción de una amplitud mínima de 50 mV ante la estimulación con pulsos de corriente despolarizante y 4) la estabilidad de los registros durante un tiempo mínimo de 10 minutos. Del total de neuronas registradas se escogieron aquellas que, objetivamente, tenían unos registros de mayor calidad. Este grupo formó la muestra poblacional para el análisis estadístico de todos los parámetros electrofisiológicos estudiados. El resto de las células registradas presentó propiedades electrofisiológicas semejantes a las de la muestra.

1.1. Parámetros pasivos y análisis de la estructura electrotónica.

El PMR de las neuronas de la muestra, medido en el osciloscopio al retirar la micropipeta de la célula, estuvo entre -40 y -80 mV, con un valor medio de -53.32 (desviación típica, $\sigma = 8.78$, $n = 42$). Los valores de este parámetro estuvieron lógicamente correlacionados con la aparición de disparo espontáneo en las neuronas estudiadas.

La resistencia de entrada (R_N) se obtuvo a partir de los valores de voltaje medidos en el estado estacionario, en función de la corriente de una serie de pulsos hiperpolarizantes inyectados a la neurona. En esta relación $V-I$ se calculó la pendiente de la recta a la que se ajustaron por el método de los mínimos cuadrados los valores de la función. Este cálculo se realizó siempre en la zona lineal de la gráfica $V-I$ (Figura 4 C).

Consideramos también la posibilidad de la aparición de conductancias activas en la zona transitoria de la caída de voltaje, las cuales harían que la

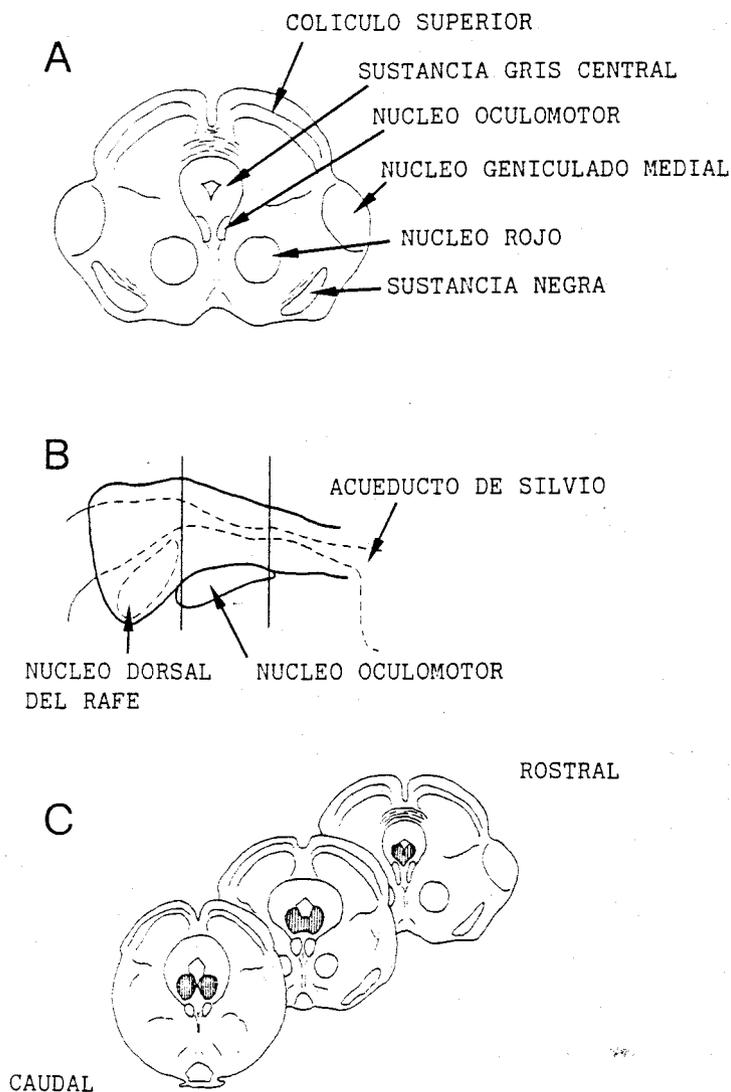


Figura 3. A Dibujo esquemático de un corte coronal del mesencéfalo, a 4.6 mm de distancia del plano interaural (Luparello, 1967), en el que se resaltan las estructuras que se identifican fácilmente en las rodajas usadas en este trabajo. En B se muestra la morfología de la SGC en el plano sagital y su relación con estructuras vecinas. Las líneas continuas perpendiculares señalan los límites del bloque del que se obtuvieron las rodajas. C Dibujo de tres cortes coronales del mesencéfalo a distinto nivel en el eje longitudinal en los que se muestra la zona (área rayada) en la que se realizó el presente estudio.

relación $V-I$ no fuese lineal y que los valores de resistencia de entrada fuesen erróneos. Para evaluar dicha posibilidad examinamos las relaciones $V-I$ en la zona transitoria del cambio de voltaje a diferentes tiempos del comienzo del pulso (Figura 4 E) y comprobamos que los valores de voltaje en función de la

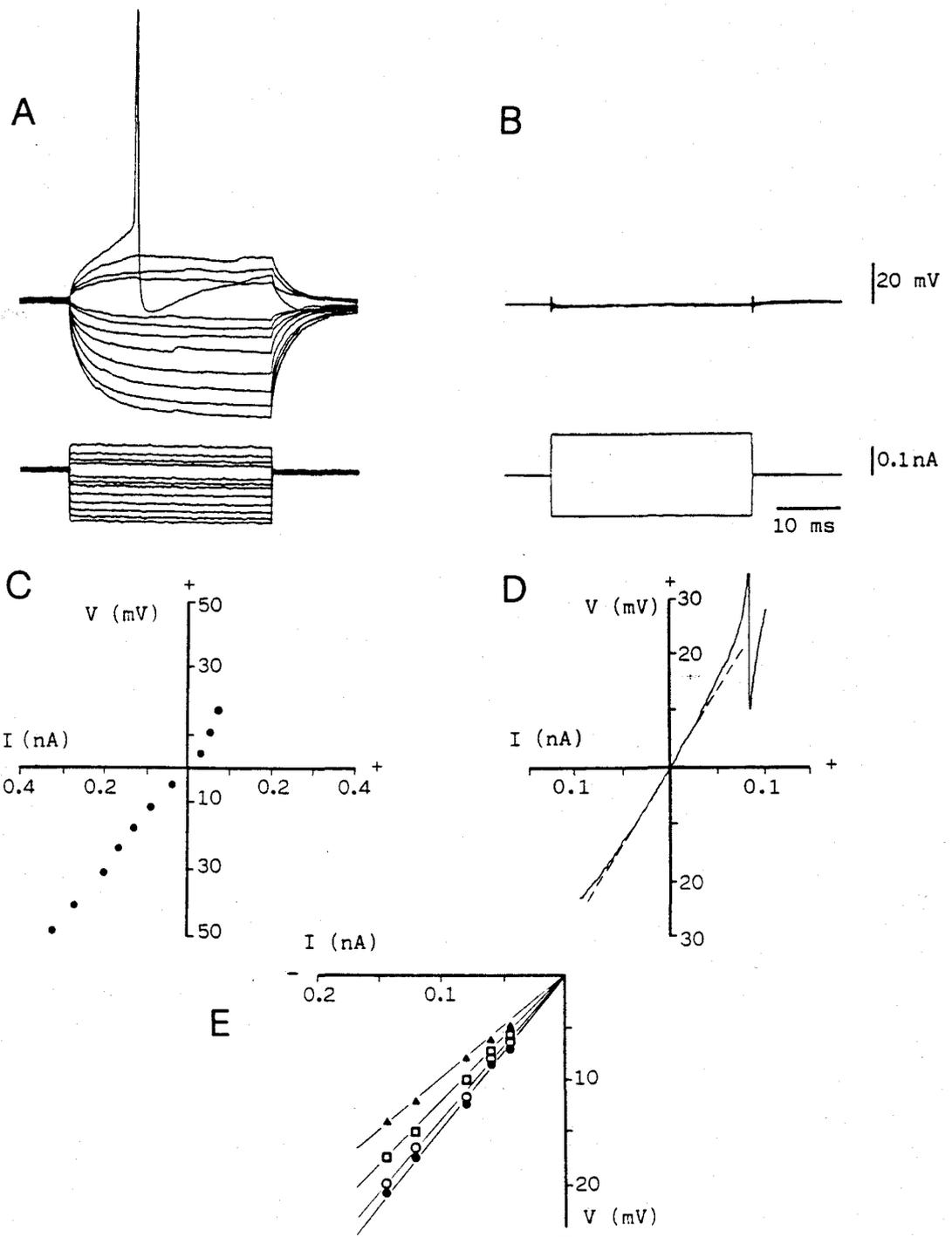


Figura 4. Relaciones $V-I$ en neuronas de la SGC. Estimación de la resistencia de entrada. A Respuesta de una neurona de la SGC (nº 74), registrada intracelularmente, ante la estimulación con pulsos cuadrados de corriente. B Control extracelular de la compensación de la resistencia y capacidad del electrodo inmediatamente después de retirar la micropipeta de la célula. C Gráfica $V-I$ obtenida midiendo, en el estado estacionario, el cambio de voltaje producido por incrementos en la amplitud de la corriente. D Relación $V-I$ en otra neurona de la SGC (nº 27). En este caso el cambio de potencial se generó por un pulso triangular de corriente de 1 nA de amplitud pico a pico y con una pendiente de 2 nA/s. La línea discontinua indica la pendiente de la resistencia lineal. La despolarización llevó a la neurona hasta el umbral de disparo de una espiga que aparece truncada en la figura. E Relación $V-I$ en el estado transitorio del voltaje en el experimento ilustrado en A. Las medidas del voltaje se hicieron a 8 ms del comienzo del pulso (triángulos), 16 ms (cuadrados), 24 ms (círculos vacíos) y 32 ms (círculos llenos).

corriente inyectada se ajustaron a una recta en cualquier punto temporal considerado.

Otra forma de calcular las gráficas $V-I$ es la inyección de pulsos triangulares a una frecuencia lo suficientemente baja como para evitar el efecto atenuante del voltaje al cargarse el condensador de la membrana. El cambio de voltaje registrado se lleva directamente a la gráfica $V-I$ (Figura 4 D). La célula a la que correspondía esta gráfica, al igual que algunas otras de la muestra, mostró rectificación anómala instantánea. Tan solo dos neuronas, que se apartaron del patrón electrofisiológico general hallado en la SGC, desarrollaron una rectificación anómala dependiente de tiempo.

El valor medio de R_N fue de 195.47 M Ω y su desviación típica de 104.97 M Ω . Ante esta gran dispersión de las medidas de la muestra y a pesar de la normalidad de la población ($P = 0.06$, $\chi^2 = 10.57$, 5 grados de libertad) nos planteamos la posibilidad de que los valores de R_N no se distribuyeran aleatoriamente a lo largo del eje caudo-rostral en la zona ventral de la SGC. Para probar esta hipótesis dividimos arbitrariamente la SGC en tres regiones según la forma del acueducto de Silvio, criterio bastante objetivo según podemos ver en la figura 3 C. Contrastamos entonces la hipótesis de igualdad de medias mediante el análisis de la varianza con un solo factor de variación. Las medias de los tres grupos en sentido caudo-rostral fueron 146.8 ($n = 15$), 195.8 ($n = 14$) y 251.26 M Ω ($n = 13$). La probabilidad de aceptar la hipótesis de igualdad de medias fue $P = 0.027$, $F = 5.94$ con 2 y 39 grados de libertad; esto sugiere un incremento gradual de R_N en sentido rostral en las neuronas de la SGC registradas en este trabajo.

En el 80.95 % de las células de la muestra pudieron hallarse dos constantes de tiempo y, por tanto, el resto de los parámetros pasivos según se describió en la metodología. El resto de las neuronas (19.05 %) se ajustó a un modelo con una esfera isopotencial única. Las constantes de tiempo fueron calculadas por el análisis del estado transitorio (ver Metodología). Una ilustración del método se expone en la figura 5. La constante de tiempo de la membrana, τ_0 , fue 12.62 ± 4.5 ms (media $\pm \sigma$, $n = 42$) y τ_1 , en las células en las que pudo estimarse, fue de 0.8 ± 0.24 (media $\pm \sigma$, $n = 34$).

Probamos también si la τ_0 tenía una distribución regional tal como existía para la R_N . El análisis de la varianza dió resultados estadísticamente no significativos, pero al realizar la prueba de comparaciones múltiples de Scheffé

comprobamos que las neuronas registradas en la región más rostral tenían una τ_0 comparativamente mayor a la de las células registradas en las dos regiones más caudales ($P < 0.01$). Los valores de R_m variaron entre 5.7 y 21.99 $K\Omega \cdot cm^2$ (12.63 ± 4.5 , $n = 42$). Las mismas consideraciones, respecto a diferencias regionales, hechas para τ_0 son extensibles a R_m ya que ésta es directamente proporcional a la primera.

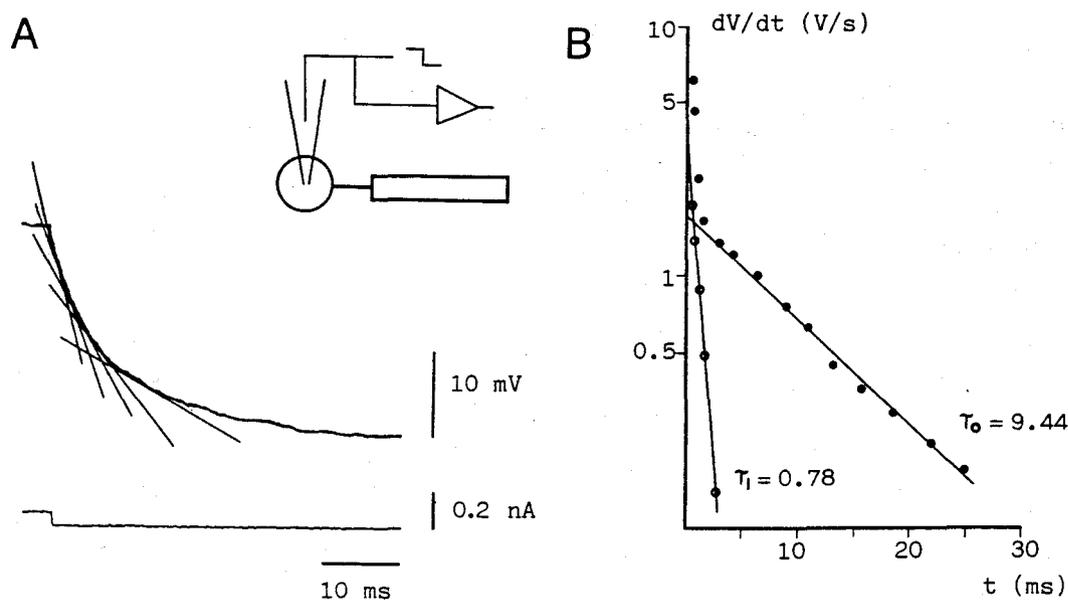


Figura 5. Ilustración del método para estimar las constantes de tiempo. Análisis del estado transitorio. En A se muestra la diferencia de potencial, producida al inyectar a una neurona de la SGC (nº 36) un pulso cuadrado hiperpolarizante, sobre la que se han representado las líneas tangentes que determinan los valores de dV/dt que se obtienen en el estado transitorio del voltaje. En la parte superior derecha se representa el modelo neuronal y el paradigma experimental. B Gráfica semilogarítmica de dV/dt frente al tiempo a partir del comienzo del pulso. Del ajuste exponencial de los últimos puntos (10 en este caso) obtenemos τ_0 . La sustracción del resto de los valores de dV/dt a dicha exponencial y el nuevo ajuste de dicha diferencia nos da τ_1 .

Los valores medios de la longitud electrotonica (L) y de la razón de conductancia dendrosomática (ρ) fueron 0.6 ($\sigma = 0.14$) y 1.6 ($\sigma = 0.79$) respectivamente ($n = 34$). La variabilidad relativa de ρ (coeficiente de variación, $V = 0.49$) es más alta que la de L ($V = 0.23$) pero, debido a las mayores dificultades para calcular ρ , esta variabilidad puede deberse al error en la estimación de ρ más que a la variabilidad biológica de ρ comparada con L . El factor de atenuación (H) tuvo un valor medio de 1.19 ($\sigma = 0.1$, $n = 34$); lo cual supuso una atenuación de sólo el 15.96 % de la corriente inyectada en las

dendritas al llegar al soma.

Empleando el análisis de la varianza no se hallaron diferencias significativas en la media de ρ , L y H en las tres regiones anteriormente consideradas. En la tabla II se muestran los parámetros electrofisiológicos de las neuronas de la muestra.

Tabla II. Parámetros electrofisiológicos de las neuronas de la SGC.

Nº Cel.	Local.	PMR (mV)	R_N (M Ω)	τ_0 (ms)	τ_1 (ms)	L	ρ	H
37	C	-64	113	9.8	0.9	0.62	0.61	1.19
90	C	-60	147	12.8	-	-	-	-
66	C	-60	128	6.6	0.9	0.87	1.43	1.41
79	C	-46	202	15.4	-	-	-	-
43	C	-48	195	10.2	0.6	0.55	1.48	1.15
76	C	-51	218	14.2	0.7	0.59	3.43	1.18
28	C	-64	46.5	7.5	1.1	0.94	1.59	1.47
82	C	-52	199	16.3	-	-	-	-
68	C	-70	242	15.8	1	0.66	3.10	1.22
16	C	-52	89.6	14.2	1.4	0.6	0.46	1.18
62	C	-50	217	19.5	0.7	0.5	3.11	1.12
63	C	-56	126	10.9	0.6	0.56	2.05	1.16
35	C	-70	89.3	9.2	0.4	0.54	2.16	1.15
27	C	-80	50.6	6.7	0.4	0.61	2.19	1.19
64	C	-52	139	6.1	0.7	0.88	1.82	1.42
30	M	-57	102	9.8	0.6	0.51	0.97	1.13
80	M	-43	190	12.4	0.5	0.44	1.07	1.10
17	M	-40	77.7	10.9	1.2	0.89	2.93	1.43
55	M	-55	115	8.9	0.8	0.57	0.44	1.17
20	M	-48	99.4	10.7	1	0.69	1.2	1.25
23	M	-48	111.7	5.7	0.5	0.59	0.57	1.18
65	M	-52	169	10.5	0.8	0.65	1.32	1.22
48	M	-43	375	14.7	0.7	0.48	1.28	1.12
45	M	-48	341	12.1	-	-	-	-
31	M	-56	94	9.4	0.8	0.64	1.17	1.21
84	M	-43	218	12.5	-	-	-	-
54	M	-54	391	21.6	1.2	0.56	1.9	1.16
85	M	-42	306	7.9	0.7	0.64	0.66	1.21
29	M	-47	151	15.2	0.6	0.46	1.83	1.11
91	R	-48	178	17.2	-	-	-	-
99	R	-48	113	13.1	-	-	-	-
52	R	-50	463	20.3	0.7	0.41	1.58	1.09
61	R	-60	115	7.2	-	-	-	-
53	R	-55	276	11.2	0.6	0.52	1.68	1.14
36	R	-60	302.5	20.5	1.1	0.47	0.7	1.11
89	R	-50	303	21.9	0.8	0.45	2.22	1.1
58	R	-67	200	11.9	0.6	0.54	2.33	1.15
69	R	-40	145	14.9	1.3	0.76	2.44	1.3
49	R	-54	306	14.7	0.7	0.45	1.08	1.1
47	R	-56	246	21.4	0.9	0.41	0.86	1.08
74	R	-63	167	9.1	0.7	0.64	1.5	1.21
71	R	-48	452	8.7	0.9	0.73	1.2	1.28

Local.: localización en el eje caudo-rostral; C: caudal, M: medial, R: rostral.

Para evaluar la independencia estadística de los parámetros PMR, R_N , τ_0 , R_m , ρ , L y H se calculó la matriz de correlaciones múltiples (Tabla III). Se establecieron correlaciones positivas estadísticamente significativas ($P < 0.05$) de τ_0 y R_m con R_N . También fueron significativas las correlaciones negativas de τ_0 , R_N y R_m con L y, por tanto, con H. La correlación entre L y ρ fue pequeña y no significativa desde el punto de vista estadístico.

Tabla III. Correlaciones entre parámetros electrotónicos.

	PMR	R_N	τ_0	R_m	ρ	L
H	0	-0.40*	-0.54*	-0.54*	+0.17	+1
L	+0.01	-0.42*	-0.58*	-0.58*	+0.17	
ρ	+0.10	-0.01	+0.21	+0.21		
R_m	-0.17	+0.57*	+1			
τ_0	-0.17	+0.57*				
R_N	-0.29					

(*) $P < 0.05$.

Todo lo anterior indica una tendencia más o menos acusada a la agrupación espacial a lo largo del eje caudo-rostral de la SGC de las neuronas con una mayor resistencia de entrada, resistividad y constante de tiempo de la membrana y con una menor longitud electrotónica y factor de atenuación.

1.2. Estudio electrofisiológico y bases iónicas de los potenciales de acción de las neuronas de la SGC.

1.2.1. Actividad espontánea.

El 50 % de las neuronas de la muestra poblacional ($n = 42$) fueron espontáneamente activas, disparando potenciales de acción a una frecuencia entre 3 y 13 Hz (5.61 ± 2.95). Un ejemplo de este disparo espontáneo se muestra en la figura 6 A. El trazado superior corresponde a un registro intracelular de una neurona de la SGC y el inferior es un registro extracelular de la misma momentos antes de penetrarla con la micropipeta. Podemos observar que la frecuencia de disparo es la misma antes y después de la penetración. Un

histograma de frecuencias, como el mostrado en la figura 6 D, revela que la mayoría de las células oscilaron a una frecuencia entre 3 y 5 Hz.

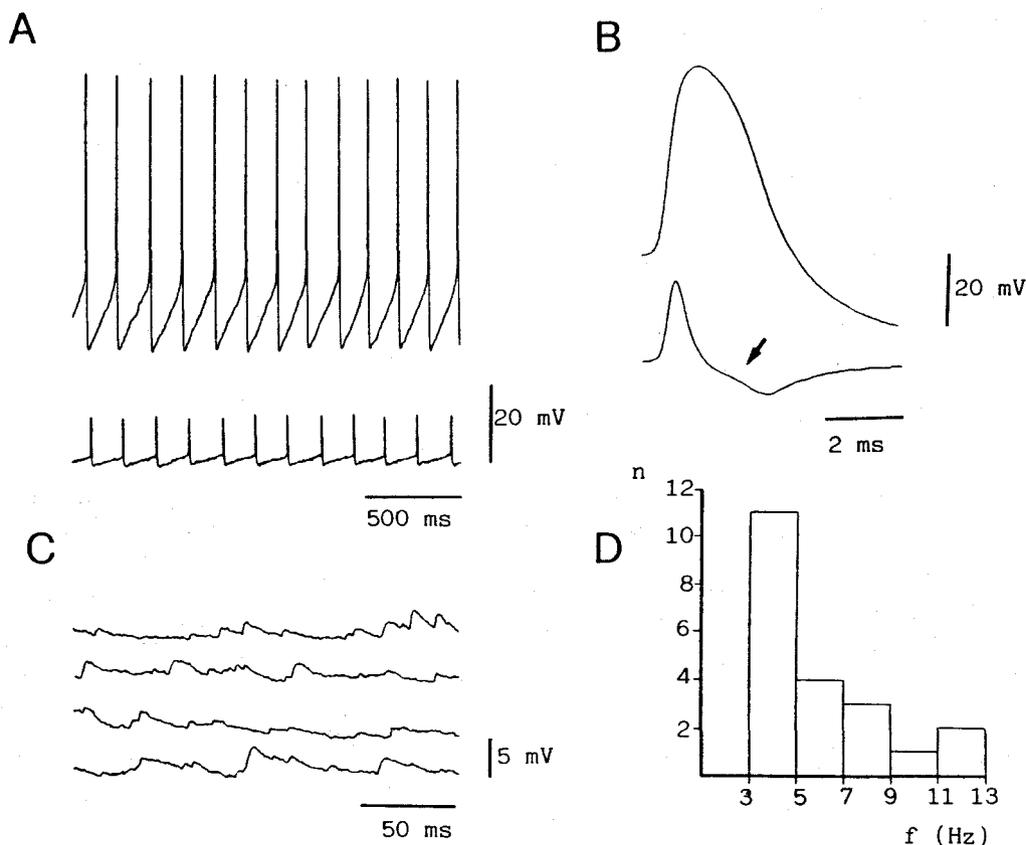


Figura 6. Actividad espontánea en las neuronas de la SGC. En A se muestra el registro intracelular (arriba) y extracelular (abajo) del disparo espontáneo de potenciales de acción que poseía esta neurona de la SGC (nº 102) a PMR = -51 mV. B Potenciales de acción espontáneos de la misma célula y su registro derivado. La flecha señala la meseta presente en la fase de repolarización. C Varios registros en una misma célula (nº 84) que muestran la actividad sináptica espontánea de esta neurona. La célula fue hiperpolarizada levemente para evitar el disparo espontáneo. D Histograma de frecuencias de la frecuencia del disparo espontáneo en las neuronas de la SGC de la muestra.

Los potenciales de acción o espigas que componen este disparo espontáneo presentan una fase de ascenso rápido, con una velocidad máxima de 111.1 ± 14.2 V/s ($n = 10$), y una fase de descenso o repolarización, más lenta, de 45.2 ± 13.3 V/s ($n = 10$), en la que es posible observar una zona de enlentecimiento que daba lugar a una meseta. Esta meseta se ve de forma más evidente en un registro diferenciado de esas espigas (flecha en figura 6 B) y ocupa fundamentalmente la zona media de la fase de repolarización de la espiga aunque

en algunas células aparece al comienzo de la misma. Los potenciales de acción eran precedidos por una despolarización gradual que incrementaba su pendiente hasta que se alcanzaba el umbral para dicha espiga.

Otra forma de actividad espontánea que mostraban muchas neuronas de la SGC consiste en potenciales postsinápticos excitatorios (Figura 6 C). Esta actividad sináptica espontánea registrada intracelularmente en solución estándar se incrementó al añadir a esta solución 4-aminopiridina (Sigma) con una concentración final de 7 mM (no mostrado en figura).

1.2.2. Características electrofisiológicas del potencial de acción.

Los potenciales de acción generados por las neuronas de la SGC tienen una amplitud entre 50 y 74 mV (55.2 ± 4.8 , $n = 42$) medidos desde el umbral y una duración entre 1.5 y 4.4 ms (2.8 ± 0.6 , $n = 42$) medida en el umbral de disparo.

Dada su compleja morfología, y presuponiendo la participación de conductancias activas en su generación, estudiamos los cambios que se producían en dichas espigas al variar artificialmente el potencial de membrana. En la figura 7 A se muestra el paradigma experimental consistente en un pulso cuadrado de corriente de 1 a 2 ms de duración. Se inyectó corriente continua estable para modificar el potencial de membrana. La corriente inyectada a la célula durante el pulso fue la mínima (reobase) para alcanzar el umbral del potencial de acción. Es muy importante en esta prueba la perfecta compensación de la resistencia y capacidad del electrodo. La variación del potencial de membrana en sentido hiperpolarizante produjo un incremento de la pendiente de la fase de ascenso del potencial de acción así como de la amplitud del mismo. Así mismo disminuyó la duración de la espiga, incrementó la pendiente de la fase de descenso y se hizo menos evidente la meseta que ocurre en esta fase (Figura 7 B).

En la tabla IV se presentan los parámetros eléctricos de estos potenciales de acción.

En la generación de una espiga, el potencial de membrana disminuye desde su nivel de reposo hasta alcanzar el umbral. Para estudiar el proceso dinámico de cambio de excitabilidad en las neuronas de la SGC, despolarizamos a una célula mediante un pulso de corriente en forma de rampa cuya amplitud era suficiente para generar un potencial de acción. Dicha amplitud permaneció

constante, mientras la duración fue incrementándose hasta los 200 ms. De esta forma la pendiente de la despolarización fue enlenteciéndose conforme el pulso aumentaba su duración (Figura 8 A). En la figura 8 B se grafica el umbral de

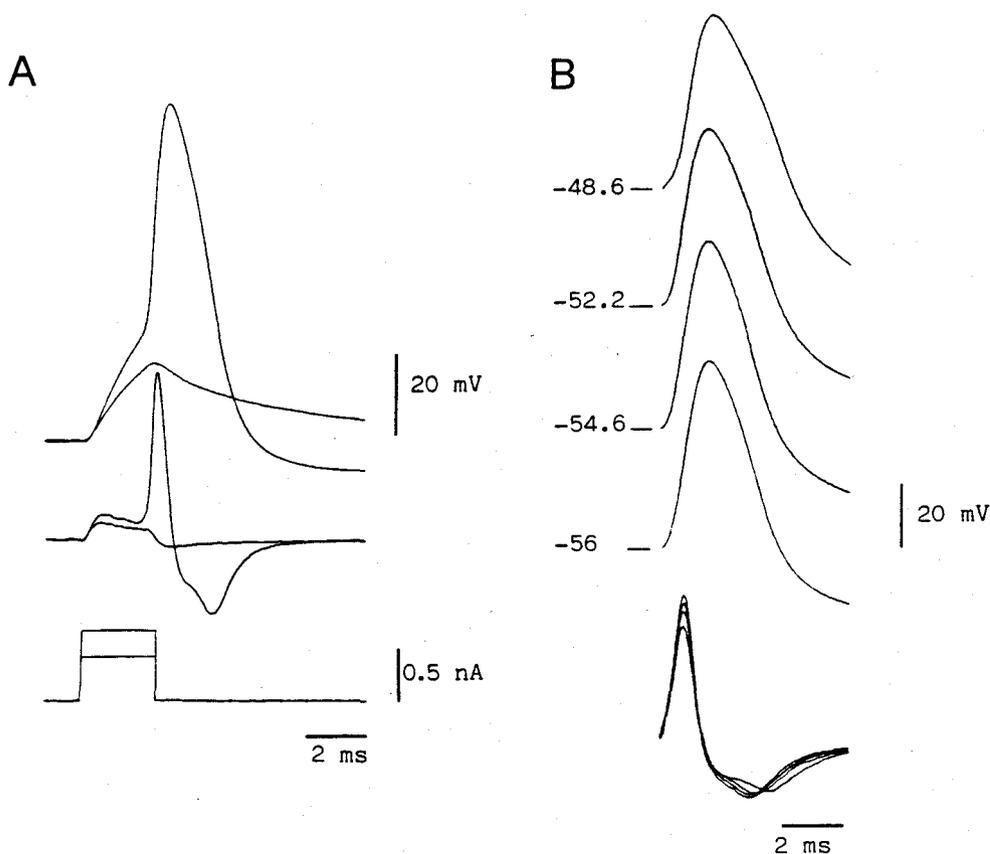


Figura 7. A Paradigma experimental para el estudio de los potenciales de acción rápidos de las neuronas de la SGC. B Efecto de las variaciones del potencial de membrana sobre la morfología de las fases de ascenso y descenso de estas espigas (célula nº 47). En los registros de voltaje (arriba) se indica el potencial de membrana en el umbral de disparo. Abajo se muestra el registro diferenciado de las espigas para ver mejor los cambios en su morfología.

disparo y la corriente umbral respecto al tiempo de latencia en la aparición del potencial de acción. El umbral de disparo incrementó en 10 mV durante los primeros 150 ms aproximadamente y se mantuvo en ese nivel aunque el pulso incrementara su duración. La corriente umbral (nivel de corriente en el que sucede el disparo) también crece de 0.06 a 0.11 nA a los 100 ms y luego permanece constante.

Todo esto es reflejo de un fenómeno denominado acomodación según el cual se requiere más corriente para alcanzar el umbral de un potencial de acción cuando la pendiente de la rampa inyectada disminuye. No hemos observado la

Tabla IV. Parámetros eléctricos de los potenciales de acción.

Nº Cel.	DE (Hz)	Espigas rápidas				Espigas lentas		
		ampl. (mV)	dur. (ms)	dV_m/dt (V/s)	dV_d/dt (V/s)	ampl. (mV)	dur. (ms)	umbral (mv)
90	0	58.4	3.5	-	-	-	-	-
37	0	64	2.3	-	-	25	5	20
66	0	54.4	2.6	-	-	-	-	-
79	7	52	2.8	-	-	-	-	-
43	0	50	2.2	-	-	-	-	-
76	4	53.6	3	112	56	-	-	-
28	0	56	2	-	-	-	-	-
82	0	52.8	3.5	-	-	-	-	-
68	0	58.4	3	-	-	-	-	-
16	8	60	2	-	-	31	3.5	24
62	0	51.2	3	-	-	-	-	-
63	0	57.6	3	-	-	-	-	-
35	0	50	2	-	-	-	-	-
27	0	64	2.2	-	-	-	-	-
64	0	48.8	2.7	-	-	-	-	-
30	0	50	2.4	-	-	-	-	-
80	0	56.8	2.6	-	-	-	-	-
17	9	55	3.4	-	-	30	5	22
55	4	54.5	4	93.3	40	-	-	-
20	6	62	3.5	-	-	-	-	-
23	13	58	1.7	-	-	-	-	-
65	3	55.2	3.3	112	32	-	-	-
48	6	56	3.2	-	-	-	-	-
45	8	45	1.7	-	-	-	-	-
31	3	52	3	144	40	-	-	-
84	12	50	1.5	-	-	-	-	-
54	3	57.6	3	110	48	-	-	-
85	0	45	2.1	-	-	-	-	-
29	3	55	2.8	128	80	-	-	-
91	0	57.6	3.2	-	-	-	-	-
99	0	74.4	2.2	-	-	-	-	-
52	5	50.4	3.6	102.8	32	30	6	34
61	0	55.2	4.4	-	-	30	7.4	22
53	0	54.5	2.8	-	-	-	-	-
36	4	54	2.5	106.6	43.6	29.6	6.8	17
89	4	57.6	3.1	-	-	-	-	-
58	0	55.2	3.6	-	-	-	-	-
69	4	42.4	3	96	40	-	-	-
49	6	53.6	3.6	-	-	-	-	-
47	3	59	3.1	106.6	40	30.4	6.4	36
74	0	54.4	2	-	-	-	-	-
71	3	49	2.9	-	-	-	-	-

DE: disparo espontáneo a PMR. ampl.: amplitud de la espiga medida desde el umbral de disparo. dur.: duración medida en el nivel del umbral. dV_m/dt : máxima pendiente de la fase de ascenso de la espiga. dV_d/dt : máxima pendiente de la fase de descenso de la espiga. umbral: medido desde el PMR.

imposibilidad de evocar un potencial de acción en rampas lentas de hasta 5 s, como sí ocurre en axones mielinizados (Frankenhaeuser y Vallbo, 1965).

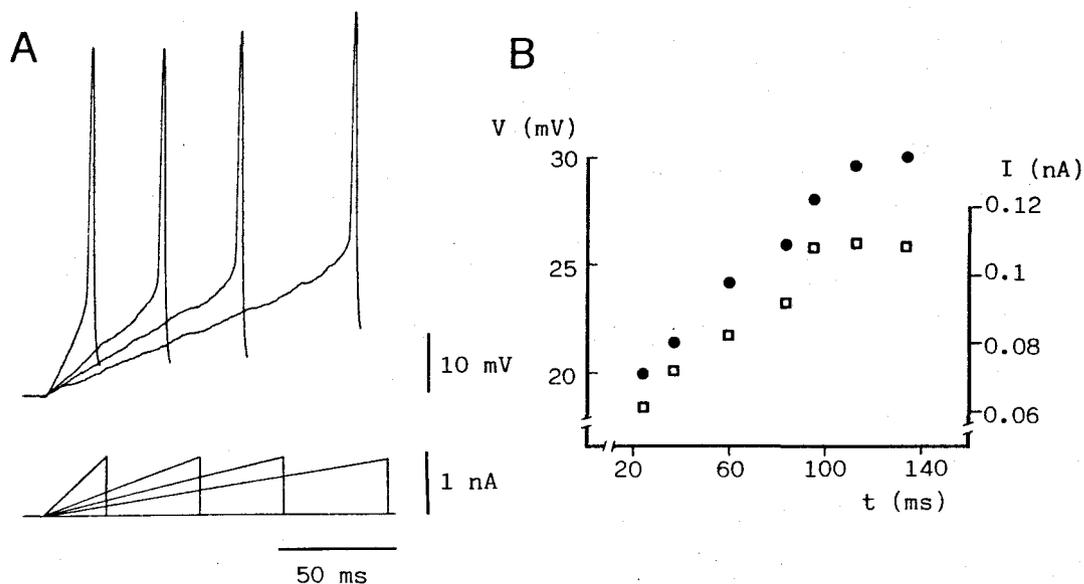


Figura 8. Cambios en la excitabilidad ante pulsos despolarizantes en rampa. A Respuesta de una neurona de la SGC (nº 58) al variar la pendiente de la rampa. Se observa un incremento en el umbral de la espiga. B Gráfica del umbral de disparo y de la corriente umbral (nivel de corriente de la rampa en el umbral) frente al tiempo.

1.2.3. Bases iónicas del potencial de acción.

Al estudiar las bases iónicas del potencial de acción partimos de la hipótesis de que la fase de ascenso de éste se debe al paso de iones Na^+ a través de proteínas canales en la membrana que se abren dependiendo de la diferencia de potencial a ambos lados de la misma, y que la fase de descenso es fruto de la inactivación de esta conductancia al Na^+ (g_{Na}) y de la activación, también dependiente de voltaje, de otra conductancia con selectividad para los iones K^+ ($g_{\text{K}_{\text{DR}}}$). Estos hechos fueron demostrados por vez primera en el axón gigante del calamar (Hodgkin y Huxley, 1952) y comprobados en todas las neuronas de mamíferos y de la mayoría de los invertebrados estudiadas hasta ahora (Llinás, 1984, 1988; Rudy, 1988).

En la figura 9 A se muestran dos potenciales de acción producidos por una neurona de la SGC ante la estimulación con un pulso rectangular de corriente. Al cambiar la solución estándar por una solución en la que todo el sodio fue reemplazado por hidroximetilaminoetano (Tris, pH = 7.4; Sigma) las espigas desaparecieron y no se pudieron evocar a pesar de elevar la amplitud del pulso y llevar el potencial de membrana muy por encima del umbral de disparo (Figura 9 B). El mismo resultado se obtuvo al añadir a la solución estándar

tetrodotoxina (TTX, Sigma) con una concentración final de $10 \mu\text{M}$ (Figura 9 C). Esta droga ha demostrado ser un bloqueante potente y altamente específico de los canales para Na^+ dependientes de voltaje (Narahashi y col., 1964; Blankenship, 1976).

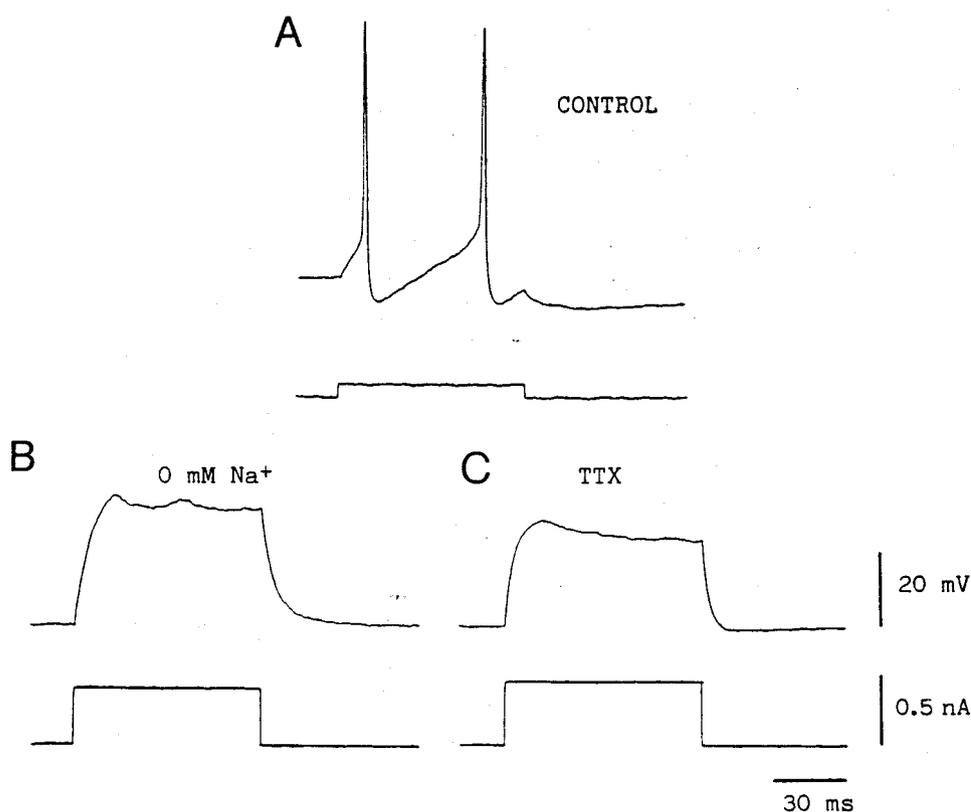


Figura 9. Bases iónicas de los potenciales de acción rápidos de las neuronas de la SGC. En A se presenta la respuesta de una neurona de la SGC (nº 36) a la estimulación supraumbral con un pulso despolarizante. Las espigas desaparecieron en presencia de (B) una solución sin Na^+ y (C) una solución con TTX ($10 \mu\text{M}$).

En las dos últimas décadas se han descrito potenciales de acción autorregenerativos en las dendritas de las neuronas de mamíferos (Llinás, 1975; Llinás, 1988). Estas espigas parecen ser generadas por la apertura con la despolarización de canales para Ca^{2+} existentes en la membrana dendrítica. En registros intrasomáticos, como supuestamente lo son los nuestros, estos potenciales de acción se ponen de manifiesto de forma variada, pero en muchas estructuras se observa su coincidencia con los potenciales de acción generados por el Na^+ en el soma (Llinás y Yarom, 1981a; Yarom y col., 1985; López Barneo y

Llinás, 1988).

Contrastamos entonces la hipótesis de que la meseta de la fase de bajada del potencial de acción estuviera generada por la activación de una conductancia al Ca^{2+} en las dendritas de las neuronas de la SGC. Con la misma prueba de la figura 7 A se muestra en la figura 10 A una espiga y su registro derivado en el que es evidente la meseta. Durante cinco minutos se cambió la solución estándar por otra en la que el Ca^{2+} fue reemplazado por Cd^{2+} , un bloqueante específico de los canales para Ca^{2+} (Hagiwara, 1973), y que contenía ácido etilenglicol-bis-(β -amino etiléter)-N,N'-tetra acético (EGTA, Sigma) con una concentración final de 0.5 mM para acelerar el proceso de desaparición del Ca^{2+} libre del espacio extracelular. Con esta solución ocurrió un cambio notable en la forma del potencial de acción (Figura 10 B). La fase de ascenso mostró una leve disminución en su pendiente y la amplitud de la espiga se redujo un 23 %. La pendiente de la fase de descenso aumentó levemente y tuvo lugar una drástica

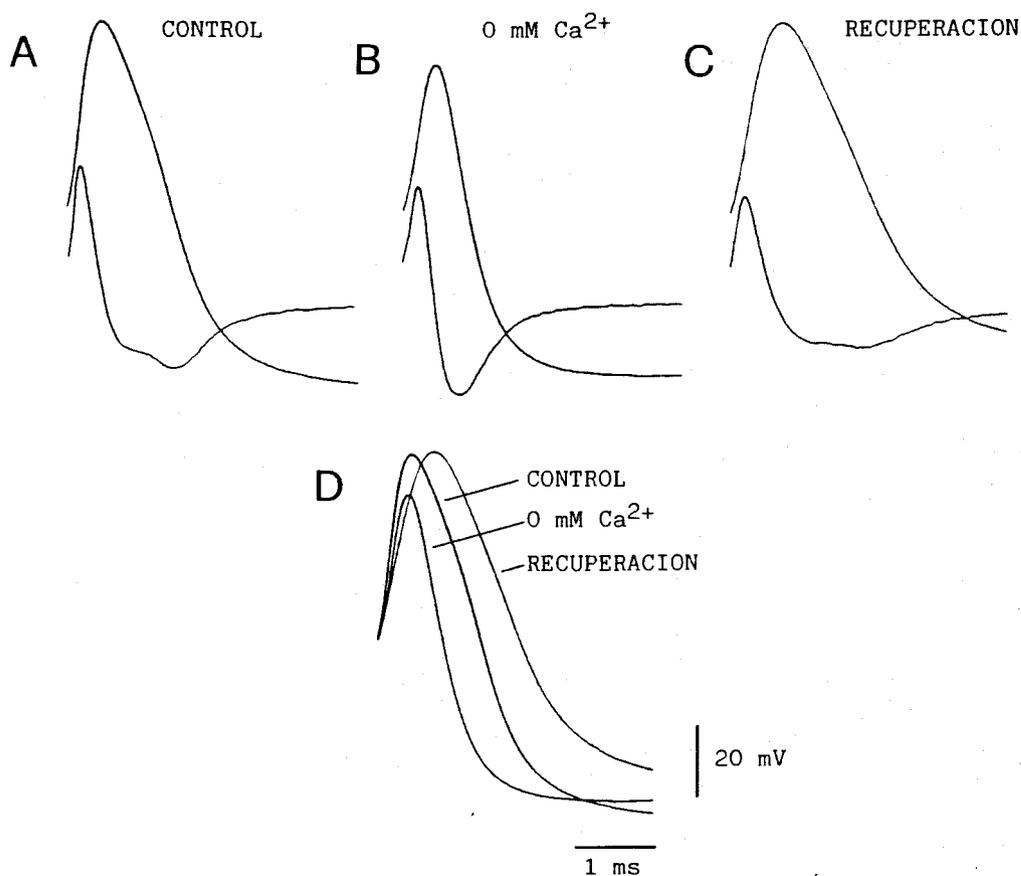


Figura 10. Participación del Ca^{2+} en los potenciales de acción rápidos de las neuronas de la SGC. A Potencial de acción control y su registro derivado en una neurona a PMR. B Al pasar durante 5 min una solución sin Ca^{2+} , desaparece la meseta y disminuye la amplitud y duración de la espiga. En C se muestra la recuperación de la morfología de la espiga al volver a pasar solución estándar. D Superposición de los potenciales de acción de A, B y C para ver más claramente las diferencias. Célula nº 66.

desaparición de la meseta. La figura 10 C muestra la recuperación tras cambiar a solución estándar. La amplitud de la espiga y la meseta se recuperaron pero la razón de ascenso y descenso del potencial de acción no alcanzaron el valor previo, tal vez por la depleción del calcio intracelular, bien por la alteración en la conductancia global de la neurona producida al disminuir el Ca^{2+} extracelular (Armstrong y López Barneo, 1987) o bien al añadir Cd^{2+} , nocivo para la célula, a la solución de perfusión.

Una vez demostrada la participación del Ca^{2+} en el potencial de acción estudiamos la posible existencia de potenciales de acción de Ca^{2+} en las neuronas de la SGC. Cuando a una neurona que genera espigas de forma repetida ante la inyección de pulsos de corriente rectangulares (Figura 11 A), se le bloquean con TTX los canales para el Na^+ dependientes de voltaje y se incrementa progresivamente la amplitud del pulso de corriente, se genera una respuesta despolarizante electrotonica que crece gradualmente con la amplitud del pulso hasta alcanzar el umbral para un potencial de acción todo o nada. Este tiene menor amplitud (29.4 ± 2 mV, $n = 7$) y mayor duración (5.7 ± 1.3 ms, $n = 7$) que los dependientes de Na^+ .

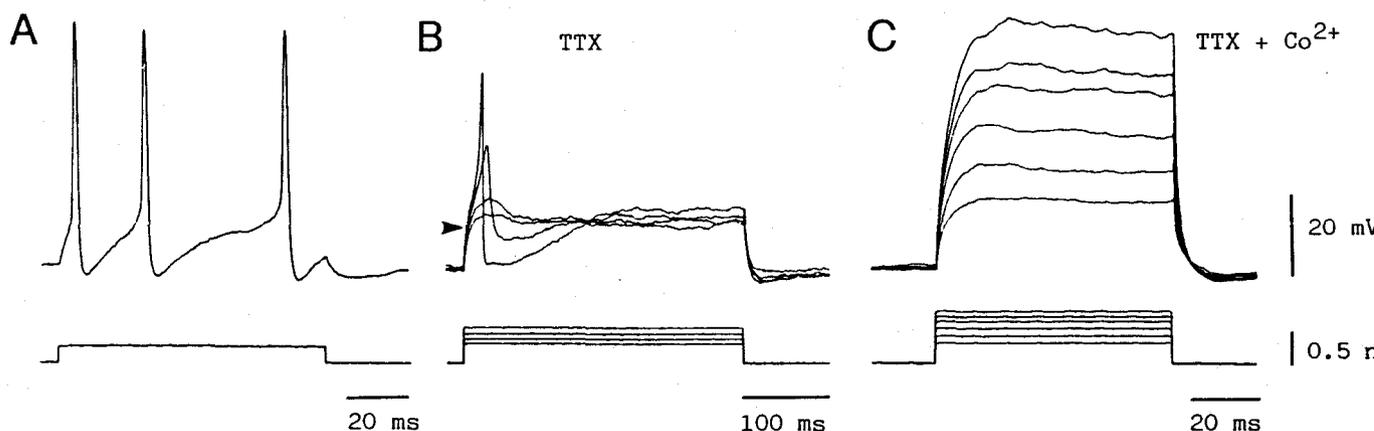


Figura 11. Espigas lentas de Ca^{2+} en las neuronas de la SGC. A Registro control de espigas rápidas ante la estimulación con un pulso cuadrado de corriente. B Al añadir TTX ($10 \mu\text{M}$) desaparecen las espigas rápidas y al aumentar la amplitud del pulso se genera una espiga lenta de mayor duración, menor amplitud y mayor umbral (nótese la distinta base de tiempo respecto a A). La flecha indica el umbral de disparo de las espigas rápidas. C La adición de Co^{2+} (7 mM) hace desaparecer estos potenciales de acción lentos. Célula nº 17.

Estas espigas no se disparan de forma repetida, a pesar de aumentar la amplitud del pulso, y se siguen de una importante poshiperpolarización. El

umbral para estos potenciales de acción está entre 17 y 36 mV (25 ± 7.1 , $n = 7$) por encima del de los generados por el Na^+ (Figura 11 B). Al añadir Co^{2+} , otro bloqueante de los canales para Ca^{2+} (Baker y col., 1971), a la solución de perfusión con una concentración final de 7 mM se abolió toda respuesta autorregenerativa (Figura 11 C).

En la tabla IV se muestran los parámetros eléctricos de estas espigas de Ca^{2+} .

Para probar el origen dendrítico de estos potenciales de acción se asume que la generación de estas espigas de calcio depende de que la corriente despolarizante inyectada en el soma con el pulso llegue a las zonas dendríticas en las que se encuentran los canales para Ca^{2+} , y que allí se origine una diferencia de potencial suficiente para que estos canales se abran. Por esta razón se ha denominado a esta conductancia de alto umbral ($g_{\text{Ca}_{HT}}$). Por otra parte se asume que, al igual que en el soma, existen en las dendritas canales para K^+ que se abren con la despolarización (Llinás y Yarom, 1981b). La apertura de dichos canales para K^+ cortocircuitaría en cierta medida la llegada de la corriente a las regiones dendríticas (Yarom y Llinás, 1987) y, por lo tanto, la apertura de los canales para Ca^{2+} .

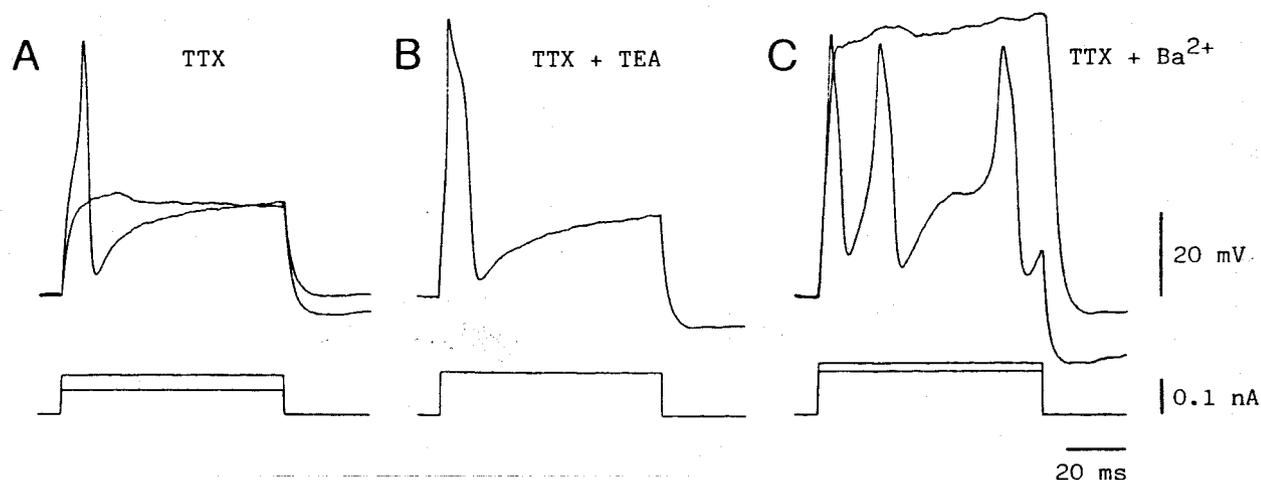


Figura 12. Efecto del bloqueo de conductancias al K^+ sobre las espigas lentas. A Registro control de una espiga lenta en una neurona de la SGC (nº 37) en presencia de TTX ($10 \mu\text{M}$). B Al añadir TEA (10 mM) se produce un aumento considerable en la amplitud y duración de la espiga. C Efecto del Ba^{2+} . Con el mismo pulso se originan varias espigas de mayor duración que en A. Aumentando la amplitud del pulso se genera una respuesta todo o nada que dura todo el pulso.

El tetraetilamonio (TEA, Sigma) bloquea de forma selectiva los canales para K^+ que se abren con la despolarización (Armstrong y Binstock, 1965). Así, si a una neurona que genera una espiga de calcio (Figura 12 A) se le añade TEA (10 mM) en la solución estándar, cabe esperar que el umbral para el potencial de acción de calcio se alcance antes y que, dado que la proporción de la corriente inyectada que llega a las dendritas es mayor, se abran más canales para el Ca^{2+} y en dendritas más alejadas y la amplitud de la espiga sea mayor. Esto es lo que se aprecia en la figura 12 B en la que la amplitud de la espiga es un 38.4 % mayor que la de la espiga control. La espiga también incrementa su duración (150 %) y la de su poshiperpolarización, hechos entre si contradictorios si lo intentamos explicar con el bloqueo por TEA, pero que pueden argumentarse teniendo en cuenta que la repolarización de estas espigas de calcio se lleva a cabo por inactivación lenta de los canales para el Ca^{2+} además de por la activación de una conductancia al K^+ dependiente de la concentración de Ca^{2+} intracelular (gK_{Ca}) (Llinás y Yarom, 1981b).

Un hecho interesante de este disparo es la aparente imposibilidad de su repetitividad, existente hasta con pulsos de varios segundos de duración (no mostrado en figura). Para probar que la apertura de los canales para K^+ dependientes de Ca^{2+} , antes mencionados, son los responsables de la no repetitividad del disparo dendrítico añadimos Ba^{2+} ($BaCl_2$, Sigma), con una concentración final de 7 mM, ya que se ha descrito que el Ba^{2+} permea fácilmente por los canales para el Ca^{2+} (Hagiwara, 1973) pero no activa a la gK_{Ca} (Eckert y Lux, 1976) y que, además, bloquea a la gK_{DR} (Armstrong y col., 1982). El efecto del Ba^{2+} se ve en la figura 12 C en la que el mismo pulso control de la figura 12 A genera tres espigas de alto umbral con una mayor duración y en las cuales la poshiperpolarización es menor que en la espiga control. Un pulso de mayor amplitud origina una respuesta todo o nada prolongada que dura todo el pulso y que en algunas células sobrepasó a éste (no mostrado). Estos últimos resultados constituyen un indicio de que una gK_{Ca} debe oponerse a un disparo repetido de alta frecuencia en el árbol dendrítico de las neuronas de la SGC.

Para comprobar esto de forma más precisa utilizamos la apamina, veneno extraído de la abeja que es un bloqueante específico de uno de los tipos de canal de potasio activado por Ca^{2+} (Kawai y Watanabe, 1986) que podría repolarizar a las espigas dendríticas. En la figura 13 se muestra este experimento. Una neurona que disparaba una espiga de alto umbral en presencia

de TTX (Figura 13 A) pudo disparar dos potenciales de acción en presencia de apamina (0.1 μM) (Figura 13 B). Si a la solución en la que hay apamina se le añade TEA (15 mM) se incrementa el disparo repetido debido a un mejor acoplamiento somatodendrítico (Figura 13 C). Sin embargo, dado que la apamina solo bloquea un tipo de gK_{Ca} de las dos que hay descritas (Pennefather y col., 1985), probamos el efecto que tendría el Ba^{2+} (7 mM) sobre el disparo de potenciales de acción de alto umbral estando previamente en presencia de apamina. Este catión divalente no activa, como antes dijimos, a los canales de potasio dependientes de Ca^{2+} en general, y en estas condiciones el disparo repetido duró todo el pulso (Figura 13 D).

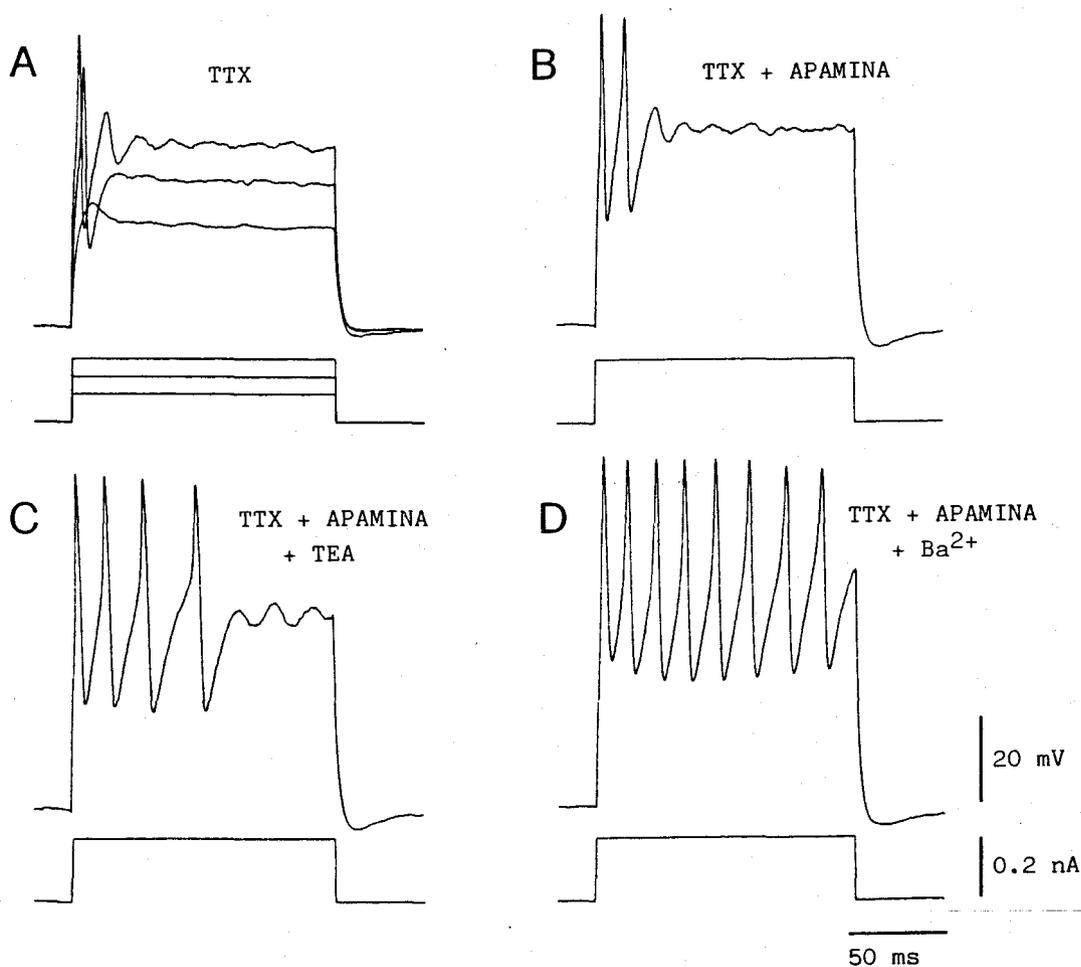


Figura 13. Efecto del bloqueo de conductancias al K^+ dependientes de Ca^{2+} sobre las espigas lentas. A En una neurona de la SGC (nº 103) a PMR y en presencia de TTX (10 μM), un pulso cuadrado da lugar a una espiga lenta, siendo la célula incapaz de disparar repetitivamente. B Al añadir apamina (0.1 μM), el mismo pulso produce dos espigas lentas. C El TEA (15 mM) genera, en presencia de apamina y TTX, un disparo repetido de espigas lentas. D Al añadir Ba^{2+} (7 mM) se produce un disparo repetitivo que dura todo el pulso.

Todo lo anterior indica que en las neuronas de la SGC una conductancia para el K^+ dependiente de Ca^{2+} bloqueable por apamina, $g_{K_{Ca}}$ (SK), puede ser responsable de que no se organice un disparo repetido de todo el arbol dendrítico ante la despolarización desde el soma.

1.2.4. Características eléctricas y bases iónicas de los procesos de repolarización de los potenciales de acción.

Ya hemos visto como la entrada de Ca^{2+} en las dendritas genera una meseta en la fase de repolarización de los potenciales de acción somáticos. Sin embargo partíamos de la hipótesis de que el proceso de repolarización se debe a la inactivación de la g_{Na} y a la activación de conductancias al K^+ .

En los potenciales de acción de las neuronas de la SGC con disparo espontáneo, o bien en las espigas producidas con pulsos de corriente de reobase en otras células que carecían de él, probamos el efecto que tendría para la espiga el cambio de la concentración extracelular de K^+ ($[K^+]_E$) compensando con corriente continua estable las variaciones del potencial de membrana para mantener el cambio de gradiente electroquímico para el K^+ . En la figura 14 A aumentamos la $[K^+]_E$ de 5 a 12 mM disminuyendo la de Na^+ a 117 mM para mantener la osmolaridad de la solución. La pendiente de la fase de ascenso y la amplitud de la espiga disminuye debido a la menor $[Na^+]_E$. Tanto en el primero como en el segundo tercio de la repolarización, en el que normalmente aparece la meseta, no se aprecian variaciones en su pendiente, pero en la zona final del registro la pendiente disminuye. Todo esto parece indicar que la primera parte de la repolarización se lleva a cabo fundamentalmente por inactivación de los canales para Na^+ ; en la segunda fase predomina la entrada de Ca^{2+} y es solo en el último tercio de la repolarización donde las conductancias al potasio parecen actuar de forma fundamental.

Si añadimos TEA (10 mM) a la solución de perfusión (Figura 14 B) aumenta la duración de la espiga (45.8 %) pero esto parece ser debido a un incremento en la entrada de Ca^{2+} durante la meseta, la cual se ve ahora de forma más evidente dado el mayor acoplamiento somatodendrítico producido por el TEA. En la fase final de la repolarización la pendiente disminuye debido al bloqueo de la $g_{K_{DR}}$ y, quizás, de la conductancia al K^+ dependiente de Ca^{2+} bloqueable por TEA, $g_{K_{Ca}}$ (BK). La fase de ascenso muestra una menor pendiente debido tal vez a la inactivación de parte de la población de canales para Na^+ que ocurre al

aumentar la frecuencia de disparo en esta célula al añadir el TEA.

En la figura 14 C probamos si una gK_{Ca} está presente durante la fase de repolarización del potencial de acción. Para ello la solución de perfusión contiene apamina (0.1 μ M) y en estas condiciones se observa un incremento de duración (19 %) y de pendiente en los dos tercios finales de la repolarización.

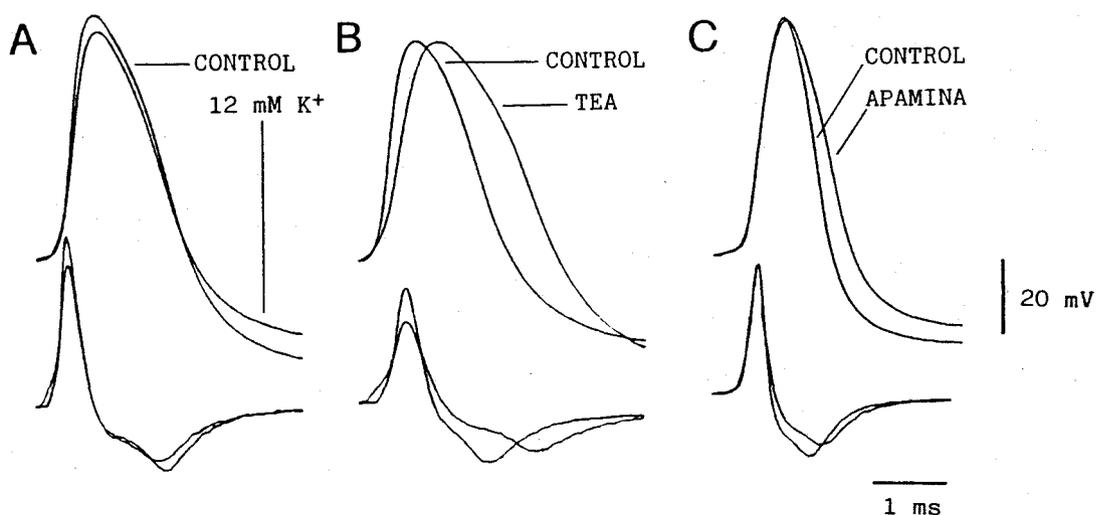


Figura 14. Bases iónicas de la repolarización de las espigas rápidas de las neuronas de la SGC. A Al aumentar la $[K^+]_E$ se observa que sólo el tercio final de la repolarización se ve afectado disminuyendo su pendiente (célula nº 90). B El TEA (10 mM) produce un incremento en la duración del potencial de acción, haciéndose más evidente la meseta de Ca^{2+} (célula nº 52). C La apamina (0.1 μ M) también provoca un incremento en la duración de la espiga afectando principalmente a la fase de repolarización (célula nº 104).

La repolarización del potencial de acción lleva el potencial de membrana 15 a 20 mV por debajo de su nivel de reposo. Esta poshiperpolarización (PHP) fue estudiada con el mismo paradigma experimental que las bases iónicas del potencial de acción (Figura 7 A).

Como podemos ver en la figura 15, las neuronas de la SGC presentan en su PHP una variada morfología, aunque la ilustrada en A es la de más frecuente aparición. En la figura 16 A se superponen las PHP de varias espigas del disparo espontáneo de una célula para probar la repetitividad de su morfología.

El curso temporal de la PHP fue estudiado midiendo el voltaje, a partir del pico máximo, a intervalos de tiempo no mayores de 5 ms y representando en una gráfica semilogarítmica estos valores y su derivada frente al tiempo (Figura

16 B). Como puede apreciarse en la derivada del voltaje respecto al tiempo, se observan de forma clara dos rectas con distinta pendiente que representan dos fases exponenciales. La constante de tiempo de la fase rápida (τ_r) tuvo un valor medio de 10.48 ms ($\sigma = 1.16$, $n = 4$) y la lenta (τ_l) de 148.4 ms ($\sigma = 64.8$, $n = 4$). Ninguna de las τ de las fases de la PHP es semejante a la τ_0 de la membrana, siendo ésta casi 5 ms mayor que τ_r . Esto indica que ni la fase rápida ni la lenta de la PHP parecen deberse a la vuelta pasiva del potencial a la línea base.

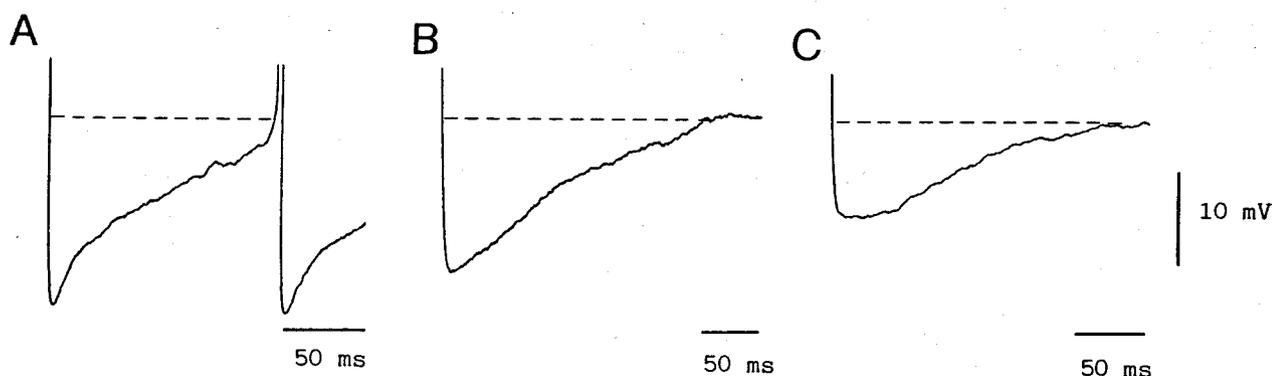


Figura 15. Diferente morfología de la poshiperpolarización en las neuronas de la SGC dependiendo del PMR. A poshiperpolarización claramente bifásica en una neurona (nº 20) a PMR = -48 mV. B poshiperpolarización en la que no aparece el componente rápido del registro anterior. Neurona nº 47 a PMR = -56 mV. C En una neurona con un PMR = -60 mV (nº 36), se observa una meseta seguida de una lenta vuelta a la línea base. La línea discontinua indica en los tres casos el PMR.

En la figura 16 C se muestra la dependencia de la PHP del potencial de membrana. Se aprecia claramente un cambio en la morfología y en la duración total de la PHP al hiperpolarizar la célula. A PMR, la PHP presenta las dos fases antes citadas. Al aumentar progresivamente el potencial de membrana se produce una paulatina desaparición de la fase rápida y la fase lenta se hace más duradera. Estas consideraciones fueron un hallazgo general en las neuronas que mostraron las dos fases en la PHP. En algunas células, si hiperpolarizamos suficientemente su potencial de membrana, la PHP se enlentece a nivel de su pico máximo. Esto puede verse en la figura 16 D en la que se utilizó un paradigma experimental distinto consistente en un pulso de corriente en rampa inyectado a la neurona previa hiperpolarización de ésta con corriente continua estable. Las espigas se originan a distintos niveles de voltaje y sus PHP manifiestan el

citado cambio en su morfología. Dicho cambio puede observarse también en la PHP que sigue a las espigas de Ca^{2+} de alto umbral (no mostrado en figura). Es importante notar que la morfología de la PHP se corresponde con los valores de PMR de las células de la figura 15 según lo esperado.

A partir de las características de la PHP y su relación con el PMR planteamos aquí la hipótesis, que se tratará en la Discusión, de la existencia de una conductancia despolarizante activa a PMR. Dicha conductancia podría intervenir la fase rápida de la PHP.

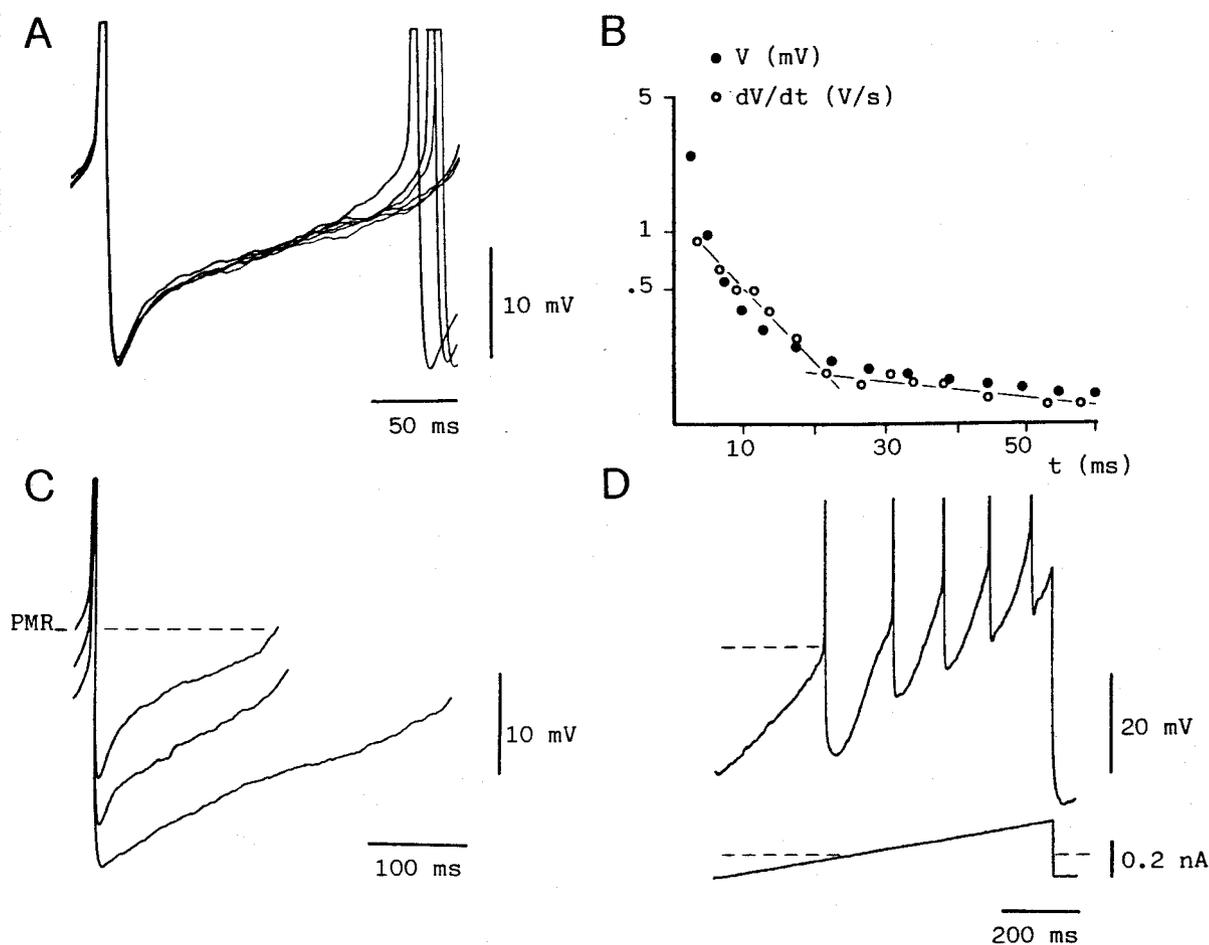


Figura 16. Estudio del curso temporal de la poshiperpolarización y de sus variaciones con el potencial de membrana. A Registros superpuestos de las poshiperpolarización del disparo espontáneo de una neurona (nº 52) a PMR = -50 mV. B Gráfica semilogarítmica de V y de dV/dt , medidos a partir del pico máximo, a lo largo de la poshiperpolarización ilustrada en A, frente al tiempo. La presencia de dos exponenciales apunta a la existencia de, al menos, dos conductancias distintas en la poshiperpolarización. C Variación en la morfología de la poshiperpolarización dependiendo del potencial de membrana en la misma neurona. D La despolarización gradual mediante un pulso en rampa pone de manifiesto las alteraciones en la poshiperpolarización causadas por el cambio en el potencial de membrana. Las líneas discontinuas indican el PMR (-50 mV en esta neurona, nº 62) y el nivel 0 de corriente. Las espigas que aparecen en esta figura están cortadas.

La figura 17 muestra el estudio de las bases iónicas de la PHP. Para contrastar la hipótesis de que el K^+ es el ión fundamental en ella se modificó la $[K^+]_E$ compensándose la variación del potencial de membrana con la inyección de corriente continua estable. En la figura 17 A se elevó de 5 a 12 mM y se observa una reducción significativa en la PHP.

En la figura 17 B se muestra el efecto del TEA (10 mM) sobre la PHP. En este caso las dos fases eran claramente visibles en el registro control y, curiosamente, el TEA hizo aumentar la amplitud de la fase rápida y la pendiente de la lenta, con lo que disminuyó la duración total de la PHP. Por tanto, la fase rápida de la PHP parece no estar relacionada con la activación de la g_{KDR} , bloqueable por TEA, y el incremento en su amplitud puede deberse a la mayor activación de las g_{Ca} que se produce al incrementarse con el TEA la meseta de Ca^{2+} del potencial de acción.

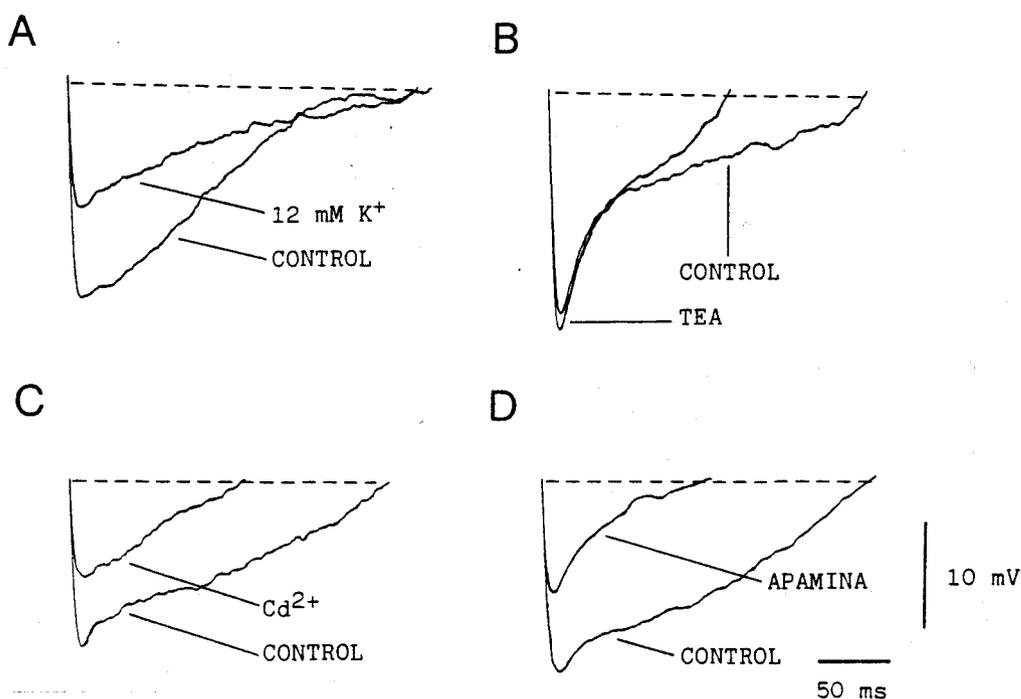


Figura 17. Bases iónicas de la poshiperpolarización. A La elevación de la $[K^+]_E$ produce una disminución en la amplitud de la poshiperpolarización (neurona nº 90). B El TEA (10 mM) produce un incremento en la amplitud y una disminución en la duración de la poshiperpolarización (célula nº 52). En C y D se muestra el efecto similar que se produce al añadir Cd^{2+} (7 mM) y apamina (0.1 μM) a dos neuronas de la SGC (nº 71 y 104, respectivamente). En ambos casos ocurre una disminución en la amplitud y duración de la poshiperpolarización. La línea discontinua señala el PMR.

Para probar el efecto de la entrada de Ca^{2+} sobre la PHP añadimos a la solución estándar CdCl_2 (7 mM) para bloquear los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. Se redujo entonces la amplitud de la PHP y la fase rápida desapareció por completo (Figura 17 C). Si añadimos apamina (0.1 μM) observamos en la PHP un cambio semejante al producido por el bloqueo de los canales para Ca^{2+} (Figura 17 D).

Por lo tanto, se puede deducir que en la primera fase de la PHP interviene una conductancia al K^+ dependiente del Ca^{2+} que entra en la neurona con cada potencial de acción. También podríamos hipotetizar que la fase lenta depende de conductancias pasivas que se ven al terminar la fase rápida de la PHP, pero su curso temporal y su variación en pendiente y duración dependiendo de la hiperpolarización hacen pensar que una conductancia hiperpolarizante activa se pone en marcha al regresar el potencial de membrana desde niveles hiperpolarizados hasta el de reposo.

Este tipo de activación de una conductancia hiperpolarizante, y el cambio de voltaje que ella produce al activarse, recuerda al fenómeno de vuelta lenta a la línea base tras la estimulación con un pulso de corriente hiperpolarizante descubierto en otras neuronas de vertebrados e invertebrados (Connor y Stevens, 1971; Jahnsen y Llinás, 1984).

1.2.5. Estudio de una conductancia transitoria al K^+ .

Para estudiar la existencia de este fenómeno hiperpolarizamos con un pulso de corriente continua una célula que estaba a potencial de reposo. Al finalizar el pulso el potencial de membrana volvió a su nivel de reposo con un curso temporal distinto al que cabría esperar según las propiedades pasivas de la neurona (Figura 18 A).

Esta respuesta de enlentecimiento en la vuelta del potencial a la línea base se observó a PMR en el 64.8 % de las células de la muestra ($n = 42$). No obstante hubo células en las que, aunque en reposo no se podía poner de manifiesto esta respuesta, sí la mostraron al despolarizar su potencial de membrana con corriente estable hasta llegar a -50 mV aproximadamente. Si contamos estas neuronas, el porcentaje se eleva al 90.4 % de la muestra.

La respuesta de enlentecimiento es dependiente del voltaje al que llevamos a la célula mediante el pulso hiperpolarizante (Figura 18 B) y del tiempo que mantenemos esa hiperpolarización transitoria (Figura 18 C). La máxima respuesta

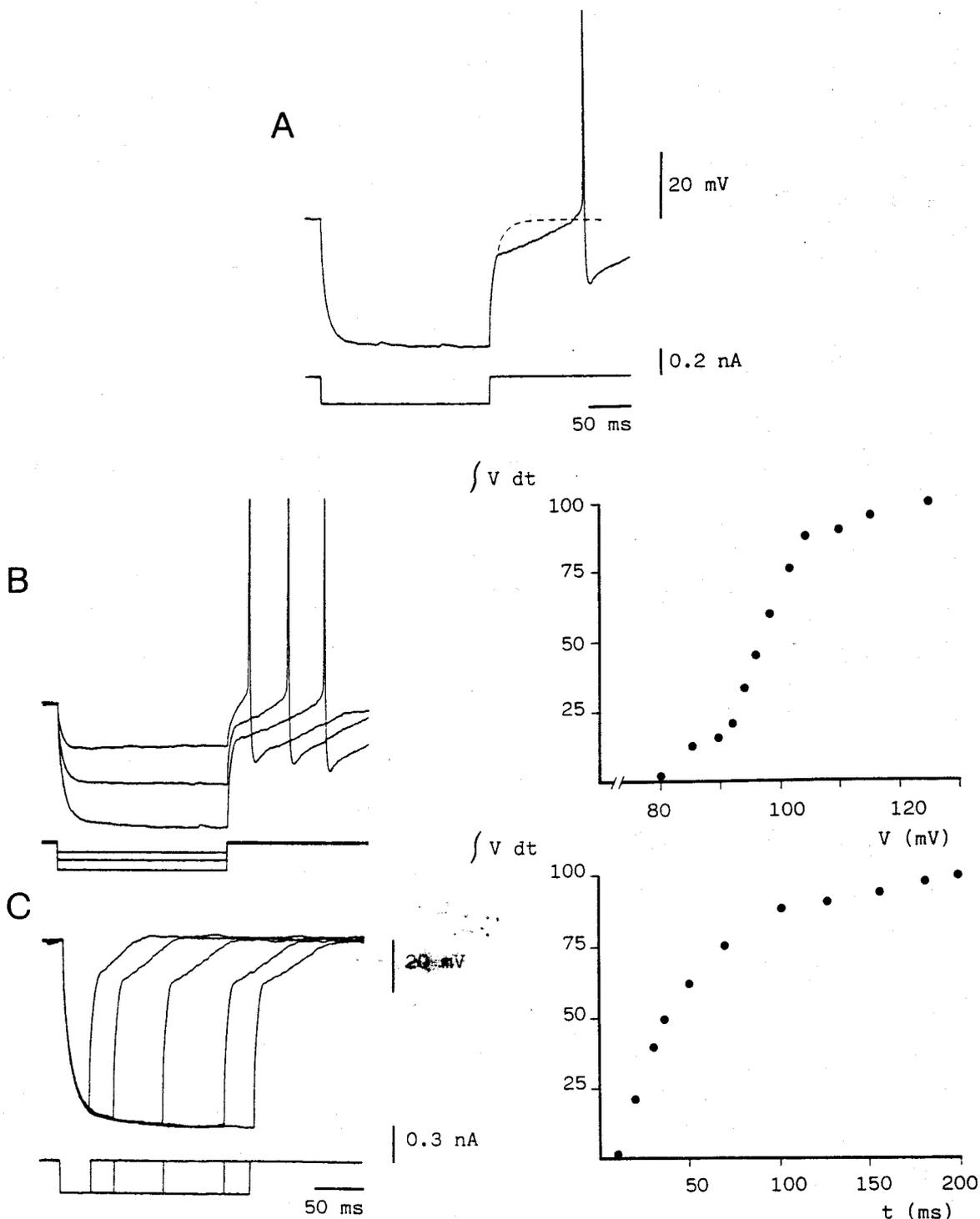


Figura 18. Estudio del fenómeno de vuelta lenta a la línea base tras la aplicación de un pulso hiperpolarizante en las neuronas de la SGC. A Tras el pulso negativo, el voltaje difiere de la vuelta pasiva esperada (línea discontinua). B El incremento en la amplitud del pulso negativo produce un aumento en el citado fenómeno. A la derecha se grafica el área normalizada, existente entre la teórica curva pasiva y la vuelta lenta del potencial tras el pulso, frente al voltaje en estado estacionario producido por cada pulso hiperpolarizante. Los registros de A y B se obtuvieron de la neurona nº 20, estando ésta a PMR. C Dependencia de la duración del pulso hiperpolarizante en el fenómeno de vuelta lenta a la línea base. A la derecha se relaciona el valor del área normalizada, hallada igual que en B, frente a la duración del pulso. Registro a PMR, en presencia de TTX (10 μ M), de la célula nº 52.

se obtuvo al hiperpolarizar el potencial de membrana hasta -110 mV durante un tiempo de 160 a 180 ms. Nótese que el curso temporal del fenómeno en estudio coincide con la fase lenta de la PHP de las espigas que aparecen en estos registros (Figura 18 B).

Para demostrar que durante este fenómeno existe un aumento de la conductancia de la membrana medimos en él la resistencia de entrada de la neurona. En la figura 19 B vemos el resultado de este experimento, apreciándose una disminución de la resistencia (incremento de la conductancia) siendo ésta máxima cuando el pulso llevó el potencial de membrana a -110 mV. Se observa que la máxima conductancia y la máxima respuesta se producen al volver el potencial de membrana desde aproximadamente -100 mV hasta su valor de reposo.

Para saber el tiempo que esta conductancia está activa medimos la resistencia de entrada a lo largo de esta respuesta. Hacia los 150 ms del final del pulso, la resistencia de entrada adquiere su valor de reposo (Figura 19 C).

El fenómeno que estamos estudiando debe estar producido por la aparición de una corriente iónica hacia el exterior de la célula. Dos iones podrían estar involucrados en esta corriente: el K^+ y el Cl^- . Una primera aproximación para determinar el ión responsable de esta respuesta fue el hallar el potencial de equilibrio del ión haciendo variar artificialmente el potencial de membrana hasta que la respuesta se anula. En la figura 19 A se observa que a los -85 mV desaparece el fenómeno. Este potencial es, aproximadamente, el de equilibrio para el K^+ .

Sin embargo la prueba concluyente para comprobar esta hipótesis es variar la $[K^+]_E$ y observar si la respuesta se afecta. En la figura 20 se muestra el efecto de la elevación de la $[K^+]_E$ de 5 a 12 mM (Figura 20 A y B). Al superponer ambos registros (Figura 20 C) se ve de forma más clara que al elevar la $[K^+]_E$ la respuesta disminuye.

Una conductancia al K^+ semejante a la descrita anteriormente se ha hallado en numerosas estructuras del sistema nervioso de vertebrados e invertebrados (gK_A) (Adams y col., 1982; Gustaffson y col., 1982; Getting, 1983; Yarom y col., 1985). La 4-AP ha demostrado ser un eficaz y selectivo bloqueante de estas corrientes iónicas (Thompson, 1982; Segal y col., 1984). En la figura 21 B se muestra que al añadir 4-AP (3 mM) a la solución de perfusión el fenómeno hallado en las neuronas de la SGC no se afecta significativamente respecto al registro control (Figura 21 A). Tampoco afecta a esta conductancia la apamina

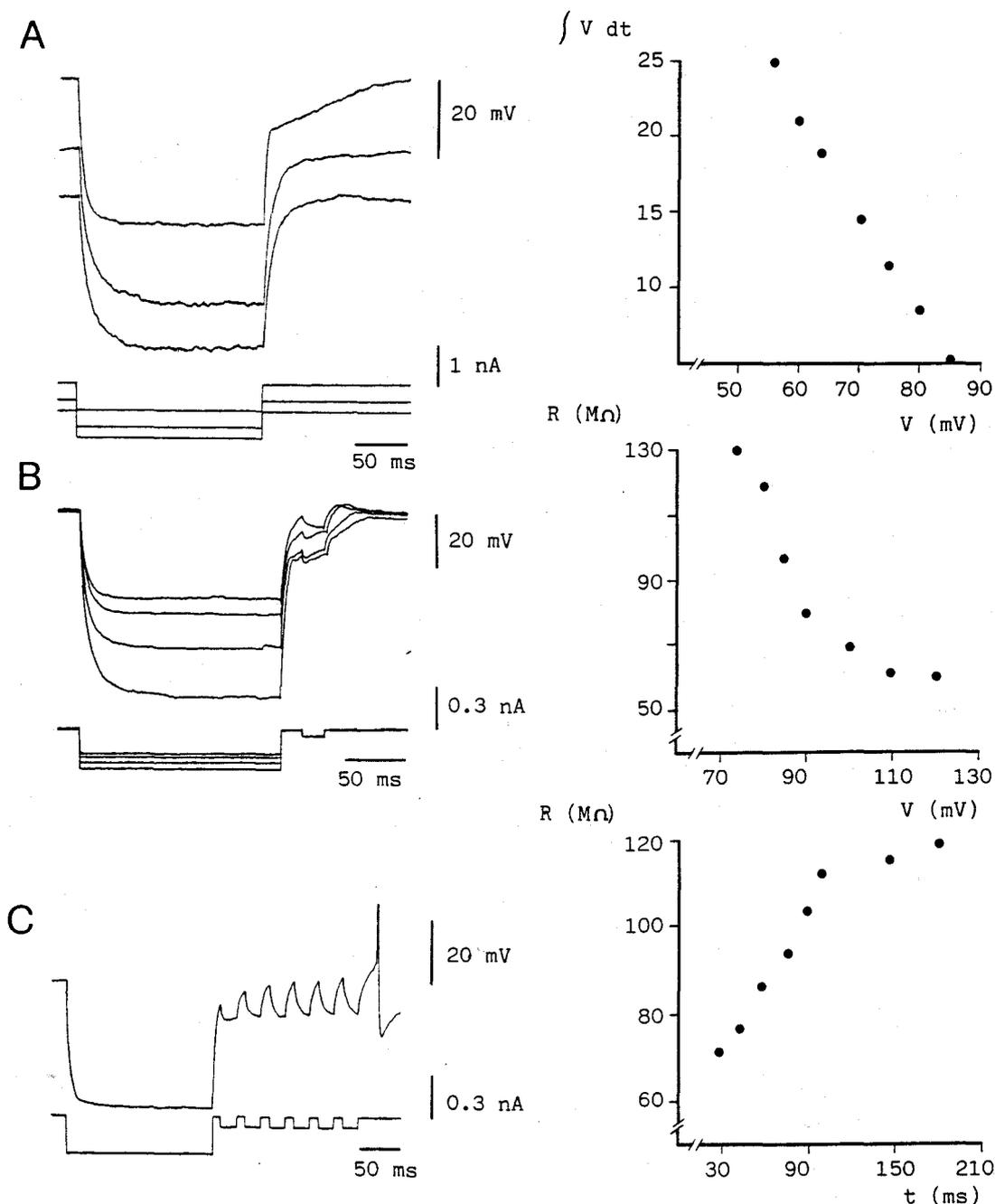


Figura 19. A Anulación del fenómeno de vuelta lenta a la línea base al incrementar el potencial de membrana mediante la inyección de corriente hiperpolarizante estable. Neurona nº 17 a PMR y en presencia de TTX (10 μ M). En la gráfica de la derecha se representa la disminución del área, obtenida de la misma forma que en la figura anterior, al incrementar el potencial de membrana de la neurona, indicado en valor absoluto en abscisas. El punto de corte con el eje X nos indica el posible potencial de equilibrio del ión responsable de este fenómeno. B Medida de la resistencia de la membrana celular durante esta respuesta, ante diferentes amplitudes de pulso, en una neurona (nº 52) a PMR y en presencia de TTX (10 μ M). A la derecha se muestra la gráfica de dichos valores de resistencia frente al potencial de membrana de la célula. C Cambios en la resistencia a lo largo de la vuelta lenta a la línea base. A la derecha se relaciona esta resistencia con el tiempo a partir del final del pulso. Neurona nº 74 a PMR. La espiga que aparece tras el pulso ha sido cortada.

(0.1 μM) ni el TEA (10 mM) (no mostrado en figura). Por otra parte, en el 75 % de las células en las que se probó ($n = 8$), esta respuesta se anula, total o parcialmente, al quitar el Ca^{2+} del medio y bloquear los canales para dicho ión con Co^{2+} o Cd^{2+} (Figura 21 C).

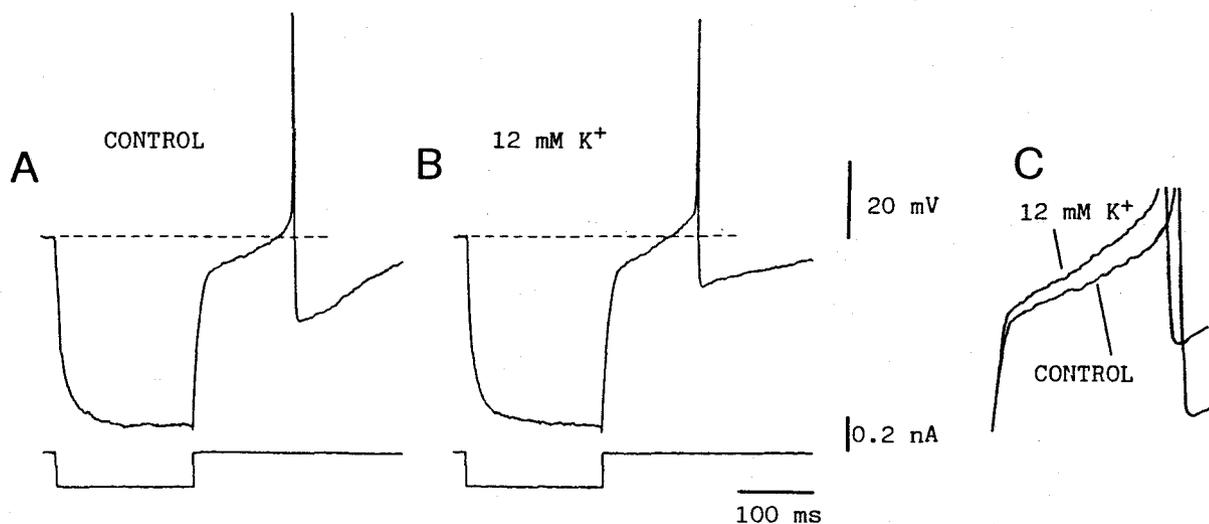


Figura 20. Bases iónicas del fenómeno de vuelta lenta a la línea base. A Registro control de la respuesta ante un pulso hiperpolarizante en una neurona ($n = 90$) a PMR. B Al aumentar la $[\text{K}^+]_E$ se observa que se reduce este fenómeno. En C se muestran superpuestas las partes finales de los registros de voltaje para ver este efecto de forma más evidente.

Las neuronas de la SGC registradas en este trabajo parece que poseen una conductancia al K^+ que se encuentra inactivada a potencial de reposo, se deinactiva con la hiperpolarización, de una cierta amplitud y duración, y se activa con la despolarización permaneciendo activa un corto espacio de tiempo. Dicha conductancia, que podríamos considerar una $g\text{K}_A$, no parece afectarse por la 4-AP pero sí podría depender, de forma no clara, de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Tal y como hipotetizábamos anteriormente esta conductancia podría intervenir en la fase lenta de la PHP si la amplitud de dicha PHP fuese suficiente para ponerla en marcha.

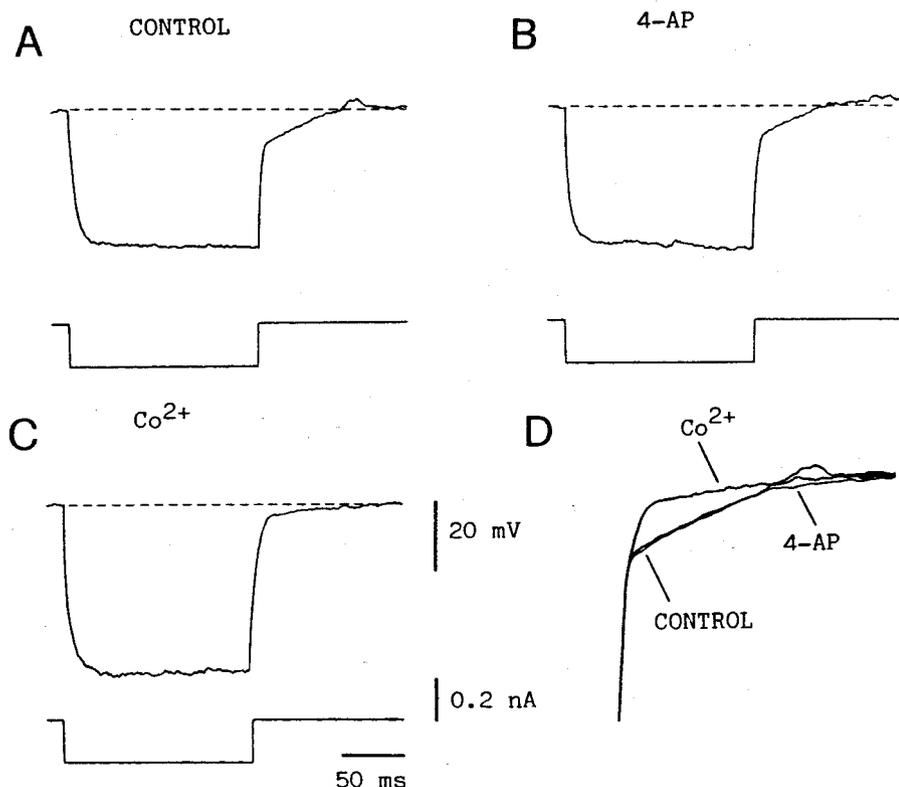


Figura 21. Efecto de la 4-AP y del Co^{2+} sobre el fenómeno de vuelta lenta a la línea base. A Registro control a PMR en una neurona de la SGC (nº 90) en presencia de TTX ($10 \mu\text{M}$). B Al añadir 4-AP (3 mM) no parece afectarse el fenómeno citado. C La vuelta a la línea base se aproxima más a la vuelta pasiva en presencia de Co^{2+} (7 mM). Se produce también un incremento en la resistencia de entrada. D Barridos superpuestos de las partes finales de los tres registros anteriores.

1.2.6. Estudio de una posible conductancia al Ca^{2+} de bajo umbral.

Otro fenómeno se puso de manifiesto en las neuronas de la SGC en la vuelta al potencial de membrana tras la hiperpolarización generada por un pulso negativo. Este fenómeno, patente en el 64.8 % de las neuronas de la muestra, consiste en una despolarización de rebote. Aunque el porcentaje es el mismo que el de la respuesta de entrecimiento en la vuelta al potencial de membrana, no hubo siempre coincidencia de ambas respuestas.

En la figura 22 A la aparición del potencial de acción ocultó este rebote, el cual solo pudo ser observado si evitábamos el disparo mediante una leve hiperpolarización de la neurona. La aparición de este rebote es dependiente de



la hiperpolarización previa; pero si hiperpolarizamos excesivamente la célula, esta respuesta desaparece (Figura 22 B).

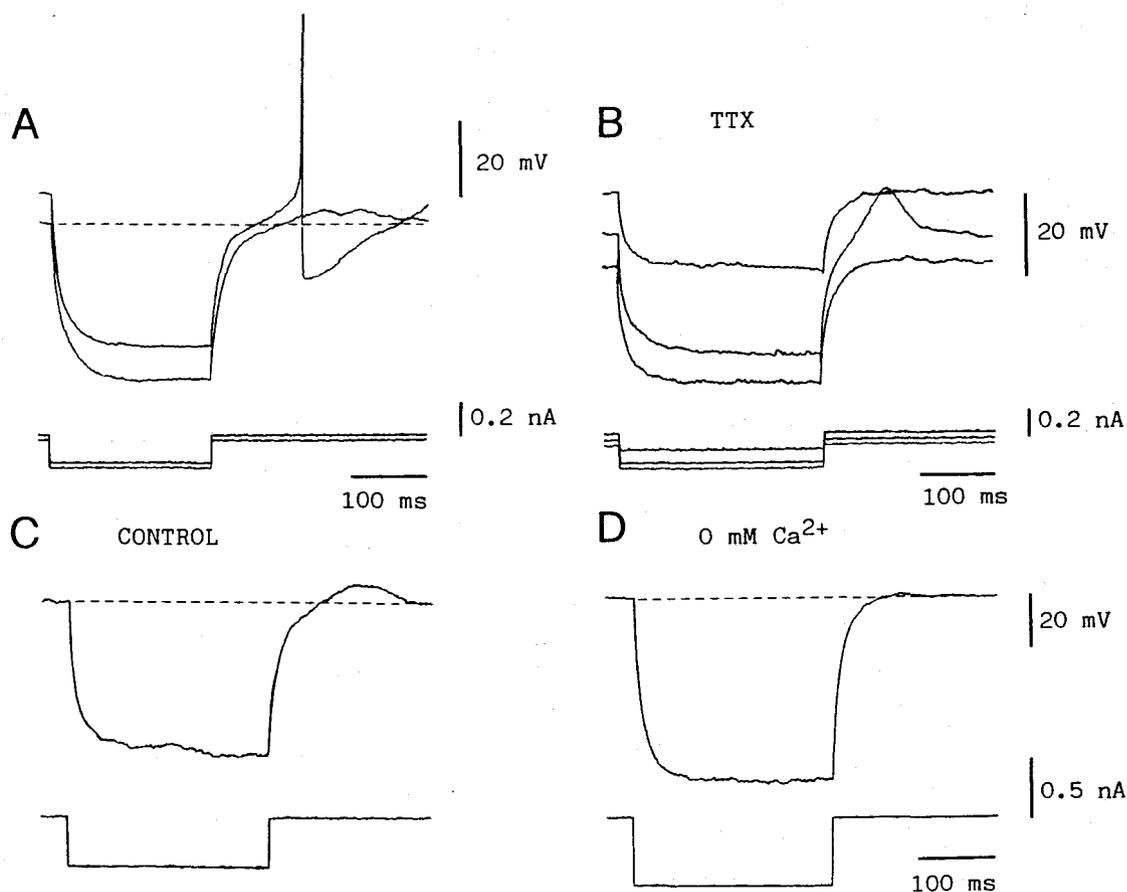


Figura 22. Despolarización de rebote tras un pulso hiperpolarizante en las neuronas de la SGC. A Esta neurona (nº 47) a PMR presenta tras el pulso negativo el fenómeno de vuelta lenta a la línea base seguido de una espiga rápida. La hiperpolarización estable de la célula da lugar a la aparición de un rebote tras el pulso donde antes se generaba la espiga. B En esta célula (nº 61) no se produce este rebote a PMR (registro de voltaje superior), pero al hiperpolarizar la neurona unos 10 mV se presenta un rebote muy evidente. Si seguimos hiperpolarizando la neurona este rebote desaparece (registro inferior de voltaje). La solución de perfusión tiene TTX (10 μ M) C y D muestran la dependencia del Ca^{2+} de este rebote en una neurona de la SGC (nº 43) a PMR y en presencia de TTX (10 μ M).

La despolarización de rebote parece estar originada por una conductancia al Ca^{2+} , como se demuestra al bañar la rodaja con una solución en la que el Ca^{2+} fue sustituido por Co^{2+} (Figura 22 C y D). Así mismo, la adición de Ba^{2+} a la solución de perfusión produjo un incremento en la amplitud del rebote (no mostrado en figura).

Parece claro que este rebote es producido por una conductancia al Ca^{2+} que se encuentra inactivada al potencial de reposo y que requiere una deinactivación con la hiperpolarización para poder activarse al despolarizar la célula. Esta

conductancia se inactiva en poco tiempo. Estas características pueden corresponderse con la conductancia al Ca^{2+} de bajo umbral ($g_{\text{Ca}_{LT}}$) descrita inicialmente en la oliva inferior (Llinás y Yarom, 1981) y hallada en otras estructuras nerviosas (Murase y Randić, 1983; Jahnsen y Llinás, 1984; Crunelli y col., 1987; Alvarez de Toledo y López Barneo, 1988).

No obstante la relevancia con la que este fenómeno se da en las neuronas de la SGC registradas en este trabajo varía mucho dependiendo de la existencia

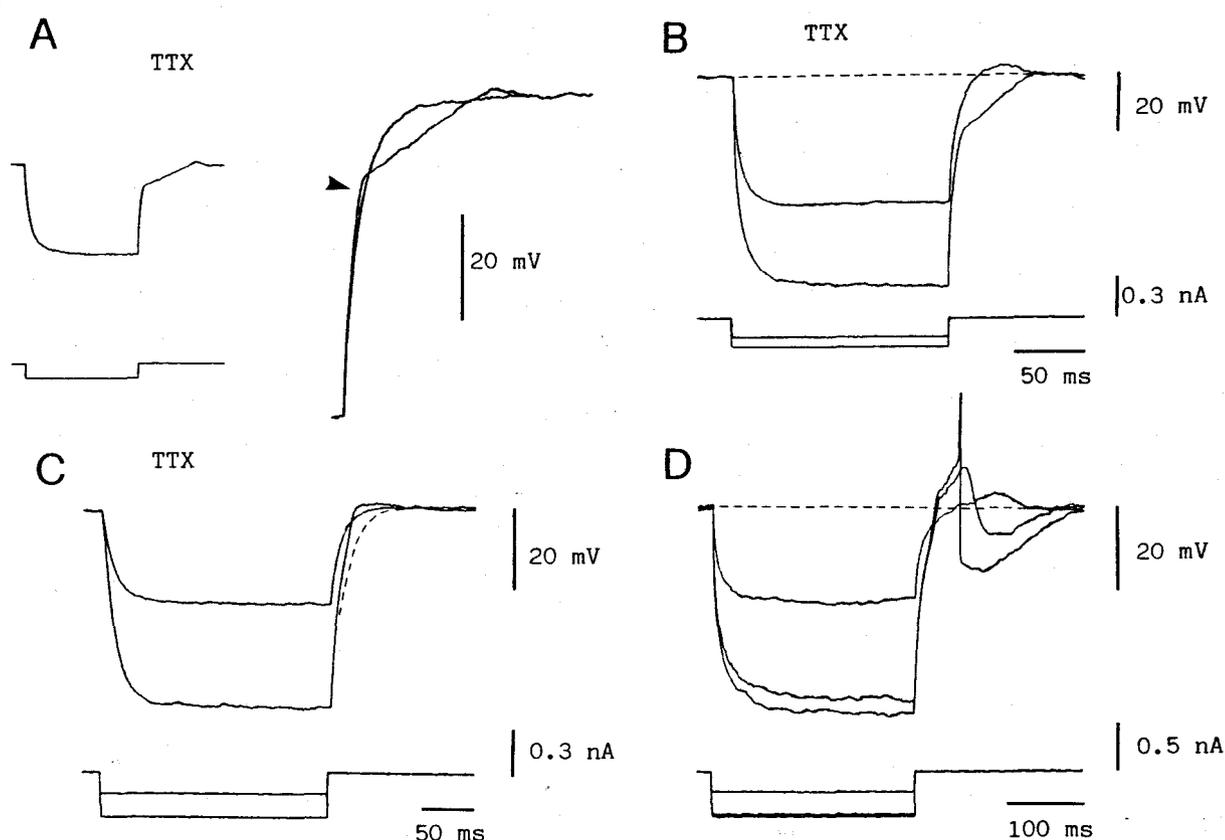


Figura 23. Variabilidad en la presentación de la despolarización de rebote. A A la izquierda se muestra el cambio de potencial producido por un pulso hiperpolarizante en una neurona de la SGC (nº 52) a PMR y en presencia de TTX (10 μM). La superposición de los cambios de potencial producidos al comienzo y al final del pulso, a la derecha, pone de manifiesto la coincidencia del fenómeno de vuelta lenta y del rebote. La flecha muestra una despolarización presente antes de ponerse en marcha el fenómeno de vuelta lenta. B La misma célula muestra un rebote con pulsos de pequeña amplitud; pero si aumentamos dicha amplitud el fenómeno de vuelta lenta impide ver el rebote. C En la neurona nº 61 se muestra un rebote cuya puesta en marcha es muy rápida. D En esta neurona (nº 43) la despolarización de rebote es muy importante, pero al aumentar la amplitud del pulso aparece el fenómeno de enlentecimiento en la fase de ascenso del rebote. La espiga aparece truncada.

de la respuesta de enlentecimiento antes analizada. En la figura 23 se muestran varias formas de coincidencia de ambos fenómenos. En algunos casos

(Figura 23 A) la despolarización de rebote puede estar ya presente al activarse la g_{K_A} , obsérvese la sutil desviación de la vuelta pasiva a la línea base señalada con una flecha en la figura, y puede perdurar originando un pequeño rebote. En otras ocasiones el rebote solo pudo verse cuando la hiperpolarización no era suficiente para deinactivar la g_{K_A} (Figura 23 B). En otras células en las que la $g_{Ca_{LT}}$ era predominante, la amplitud del rebote no es muy grande tal vez por la oposición de la respuesta de enlentecimiento (Figura 23 C). En la figura 23 D se muestra el registro de una célula en la que el rebote es muy importante, pero al aumentar la amplitud del pulso hiperpolarizante la conductancia al K^+ se activa más y aparece el fenómeno de enlentecimiento en la fase de ascenso del rebote.

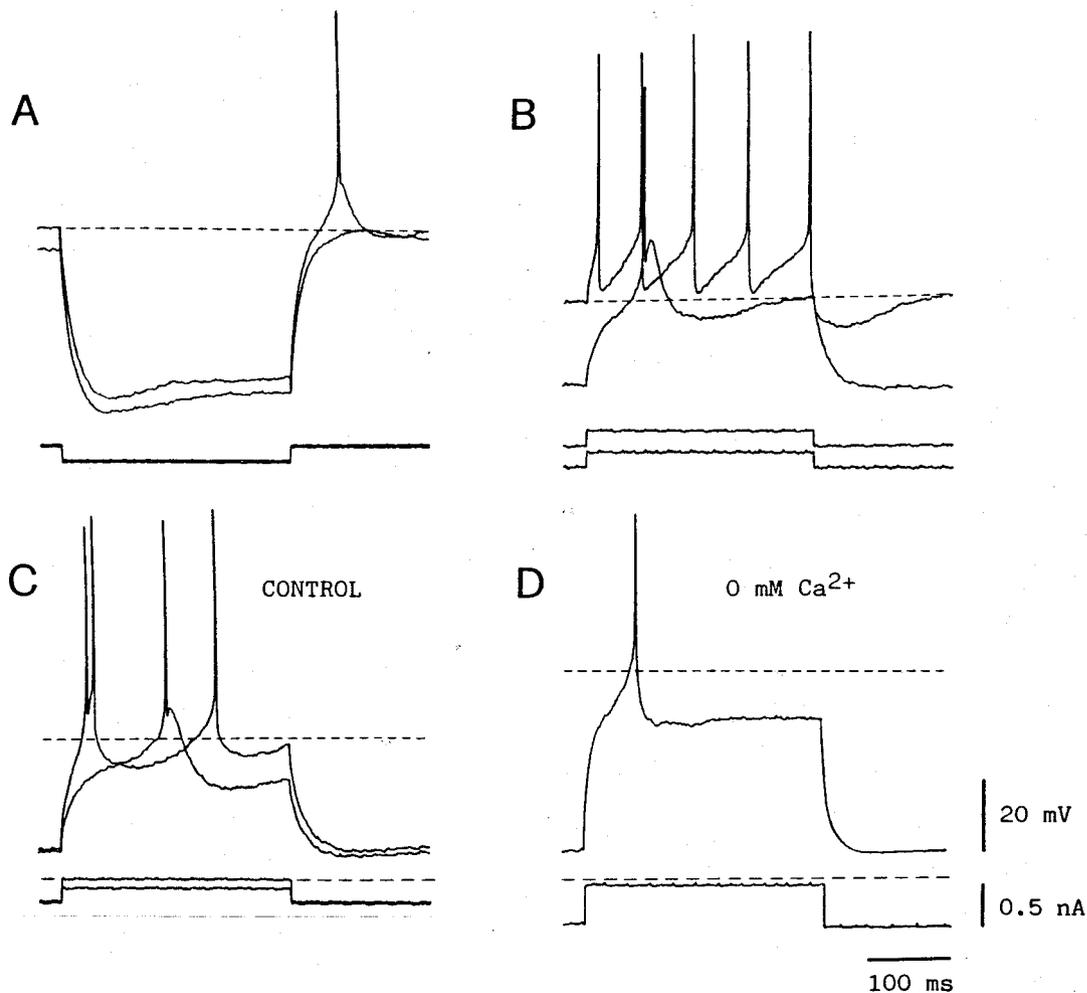


Figura 24. Conductancia al Ca^{2+} de bajo umbral en una neurona de la SGC. A Tras un pulso hiperpolarizante se genera un rebote sobre el que aparece una espiga rápida. Este rebote sólo se observa si se hiperpolariza de forma estable la célula, ya que a PMR el mismo pulso no lo produce. B En la misma neurona (nº 45) un pulso despolarizante a PMR produce a un disparo tónico, mientras que si se hiperpolariza, el mismo pulso da lugar a un rebote claro sobre el que se origina una espiga. C El rebote puede dar lugar a un disparo fásico al comienzo del pulso. D El rebote se anula en presencia de una solución sin Ca^{2+} . La línea discontinua marca en todos los casos el PMR y el nivel 0 de corriente.

Anteriormente citábamos a la conductancia de bajo umbral al Ca^{2+} . Tan sólo en dos neuronas de la muestra se observa una respuesta semejante a la originada por esta conductancia en las neuronas de otras estructuras (Jahnsen y Llinás, 1984; Alvarez de Toledo y López Barneo, 1988).

En la figura 24 A se muestra la respuesta de una de dichas neuronas de la SGC a la estimulación con un pulso de corriente hiperpolarizante. Obsérvese que esta célula muestra rectificación anómala dependiente de tiempo y que, al hiperpolarizarla levemente con corriente estable, el mismo pulso origina una giba sobre la cual se genera una espiga rápida. La figura 24 B muestra la respuesta originada por la $g_{\text{Ca}_L\text{T}}$ al estimular la célula con un pulso positivo previa hiperpolarización con corriente continua estable. Si aumentamos la amplitud del pulso despolarizante se produce un brote de dos espigas (Figura 24 C). La giba es dependiente de Ca^{2+} como se demuestra en la figura 24 D al sustituir el Ca^{2+} por Co^{2+} .

1.3. Estudio del disparo repetitivo de las neuronas de la SGC.

El tratamiento de la información por parte de las neuronas se basa, de forma general, en la transducción de los cambios de potencial originados a nivel sináptico en el disparo axónico de potenciales de acción a una determinada frecuencia.

El análisis de la relación entrada-salida de las neuronas de la SGC se llevó a cabo por medio de la estimulación de dichas células con pulsos de corriente despolarizante inyectados a través de la micropipeta de registro. Por tanto, se asume que, para este tipo de estudio semicuantitativo del disparo repetido, la corriente inyectada es físicamente equivalente a la corriente sináptica.

Hemos estudiado la frecuencia de disparo de las neuronas de la SGC en función de la amplitud, razón de cambio y duración de la corriente inyectada utilizando pulsos rectangulares y pulsos en rampa.

1.3.1. Respuesta ante pulsos rectangulares de corriente.

Al estimular a una neurona de la SGC a potencial de membrana de reposo con un pulso rectangular despolarizante, se produce un tren de potenciales de

acción rápidos. Todas las células registradas mostraron un disparo regular y rítmico. La frecuencia de generación de las espigas incrementa conforme aumenta la amplitud del pulso (Figura 25 A-C). Cada una de las espigas se sigue de una poshiperpolarización cuya duración se incrementa a lo largo de pulso alcanzándose al final el estado estacionario. Esto da lugar a una adaptación del disparo a la inyección de corriente (Bradley y Somjen, 1961). Con pulsos de corriente de hasta 1 nA de amplitud y de una duración de hasta 2 s no fracasa el disparo repetitivo (no mostrado en figura).

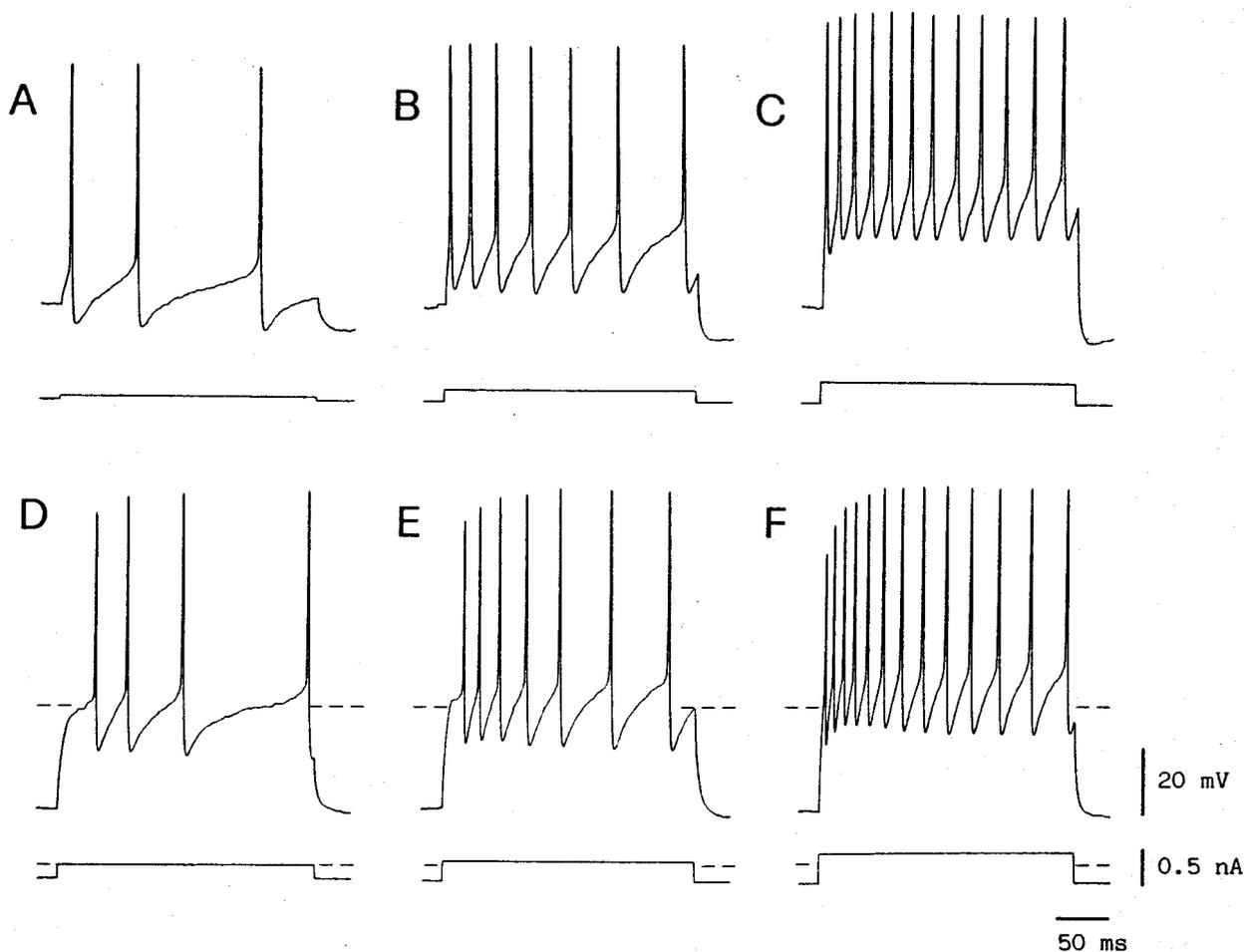


Figura 25. Disparo repetitivo de una neurona de la SGC ante la estimulación con pulsos despolarizantes de amplitud creciente. A, B y C A PMR esta neurona (nº 53) genera un disparo repetitivo cuya frecuencia incrementa con el aumento de la amplitud del pulso. Se observa una adaptación del disparo a lo largo del pulso. D, E y F La misma neurona estimulada desde un potencial de membrana 30 mV mayor que el PMR. Al comienzo de la estimulación con pulsos de baja amplitud se observa un retraso en la aparición de la primera espiga. Con pulsos mayores (F) se produce al comienzo una aceleración del disparo disminuyendo luego la frecuencia del mismo.

Cuando esa misma célula se hiperpolariza inyectándole corriente continua estable y, desde el nuevo potencial de membrana, se estimula con pulsos despolarizantes (Figura 25 D-F) se observa un nuevo patrón de disparo. Al comienzo del pulso se observa, en la aparición del disparo repetitivo, un retraso mayor que el que correspondería a la carga pasiva de la membrana. Con pulsos de mayor amplitud la frecuencia de este disparo se incrementa y se llega a abolir el retraso produciéndose una aceleración del disparo al comienzo del pulso (Figura 25 F). El fenómeno de adaptación antes descrito también está presente durante la estimulación desde potenciales de membrana hiperpolarizados. Los potenciales de acción que aparecen al comienzo del pulso son de menor amplitud, detalle particularmente evidente durante la aceleración del disparo en condiciones de hiperpolarización (Figura 25 F).

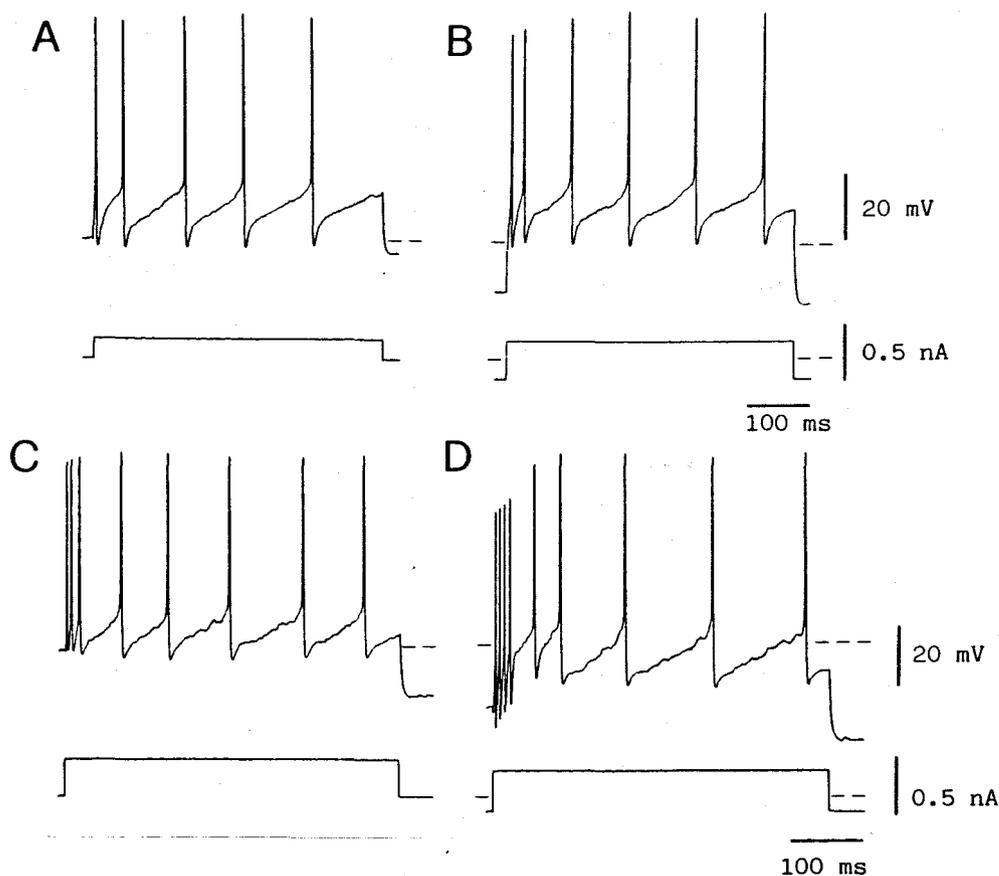


Figura 26. Distintas formas de manifestación del doble patrón de disparo repetitivo en las neuronas de la SGC. En A y B se muestra el disparo repetitivo a PMR y a niveles hiperpolarizados de una neurona (nº 64) de la SGC. La estimulación desde potenciales de membrana mayores que el de reposo produce un brote de dos espigas al comienzo del pulso. El registro, mostrado en C y D, de la neurona (nº 82) pone de manifiesto más claramente este cambio en el disparo. La línea discontinua indica el PMR y el nivel 0 de corriente en ambos casos.

El doble patrón de disparo repetitivo estuvo presente en el 88 % de las neuronas de la muestra poblacional con una intensidad que varió según la célula registrada. La figura 26 A y B muestra la descarga de una neurona de la SGC ante pulsos despolarizantes a dos niveles de potencial de membrana. La amplitud del pulso que parte del nivel hiperpolarizado (B) es tal que llega al mismo nivel de corriente que el pulso dado a nivel de reposo (A). En estas circunstancias la célula se mostró más excitable generando un brote de dos espigas rápidas al comienzo del pulso en B. En otra neurona (Figura 26 C y D) es especialmente evidente el doble patrón de respuesta ya que con el mismo pulso despolarizante inyectado a un potencial de membrana 19 mV más negativo que el de reposo, se genera al comienzo del pulso un brote bien definido de cuatro potenciales de acción cuya morfología es claramente diferente a las espigas que se generaron a potencial de reposo.

Las dos propiedades del disparo repetitivo de las neuronas de la SGC antes analizadas, es decir la adaptación y el doble patrón de disparo, se basan en un cambio en los potenciales de acción y sus poshiperpolarizaciones. Ya vimos que los potenciales de acción de estas células poseen una meseta posiblemente producida por la entrada de Ca^{2+} en las dendritas a través de canales dependientes de voltaje, y esto activa a una o varias conductancias al K^+ dependientes de Ca^{2+} . Por esta razón estudiamos la morfología de las espigas producidas por el pulso.

En la figura 27 A los potenciales de acción, generados desde el PMR, incrementan su duración, fundamentalmente en su fase de descenso, así como su amplitud a lo largo del pulso. La última de las espigas del pulso es 21.4 % más ancha que la primera. La pendiente de la fase de ascenso disminuye suavemente. Al incrementar la amplitud del pulso (Figura 27 B) los cambios en las espigas se hacen más evidentes ya que los potenciales de acción del estado estacionario son ahora más lentos en su fase de ascenso y el último de ellos es un 37.5 % más duradero y un 11.4 % mayor en amplitud respecto al primero. En ambos registros se ve que no hay, o son muy leves los cambios en la pendiente de descenso.

Al hiperpolarizar la neurona las espigas que se producen tras el retraso inicial son de menor amplitud y duración que las del estado estacionario (Figura 28 A). Al aparecer el brote inicial, aumentando levemente la amplitud del pulso (Figura 28 B), se observa que la primera espiga carece de meseta en la fase de

descenso y la amplitud y duración es aún menor que las que aparecían tras el retraso; la última espiga es un 116.6 % mayor en duración y un 28.7 % en amplitud que la primera del brote. En ambos casos las espigas del estado estacionario son muy semejantes entre sí. La pendiente de la fase de ascenso disminuye a lo largo del pulso pero las diferencias no son tan fuertes como en la figura 27 B. Sin embargo, la pendiente de la fase de descenso sufre una disminución importante a lo largo del pulso (Figura 28 B). La diferencia fundamental entre las poshiperpolarizaciones de las espigas del brote y las del estado estacionario radica en su curso temporal, dada la ausencia en las primeras de las dos fases anteriormente analizadas (Figura 28 B panel izquierdo).

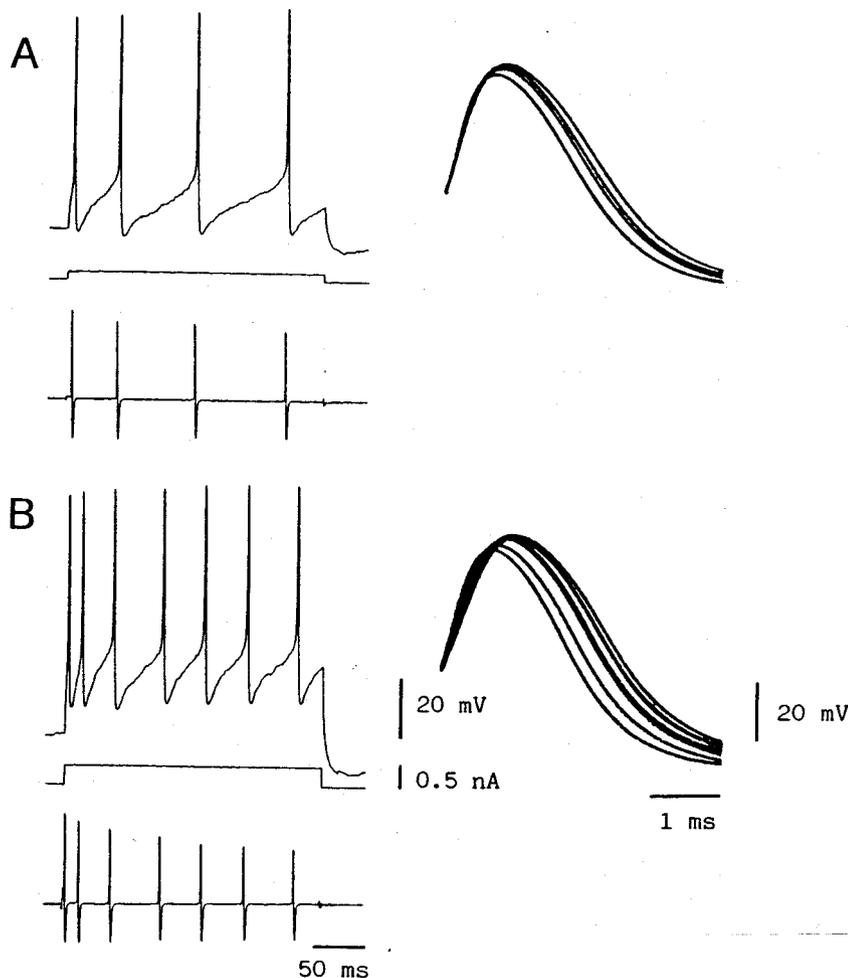


Figura 27. Estudio de la morfología de los potenciales de acción producidos por un pulso despolarizante a PMR. A A la izquierda se muestra el disparo repetitivo en una neurona de la SGC (nº 43) ante un pulso rectangular de corriente despolarizante, y el registro derivado del voltaje. A la derecha se exponen los potenciales de acción superpuestos del registro anterior. Se observa una mayor duración de las espigas debido fundamentalmente al incremento en la duración de la fase de repolarización. B Estos cambios en las espigas se observan de forma más clara al aumentar la amplitud del pulso. Es interesante notar que la pendiente de ascenso de las espigas disminuye a lo largo del pulso mientras que la de descenso varía poco.

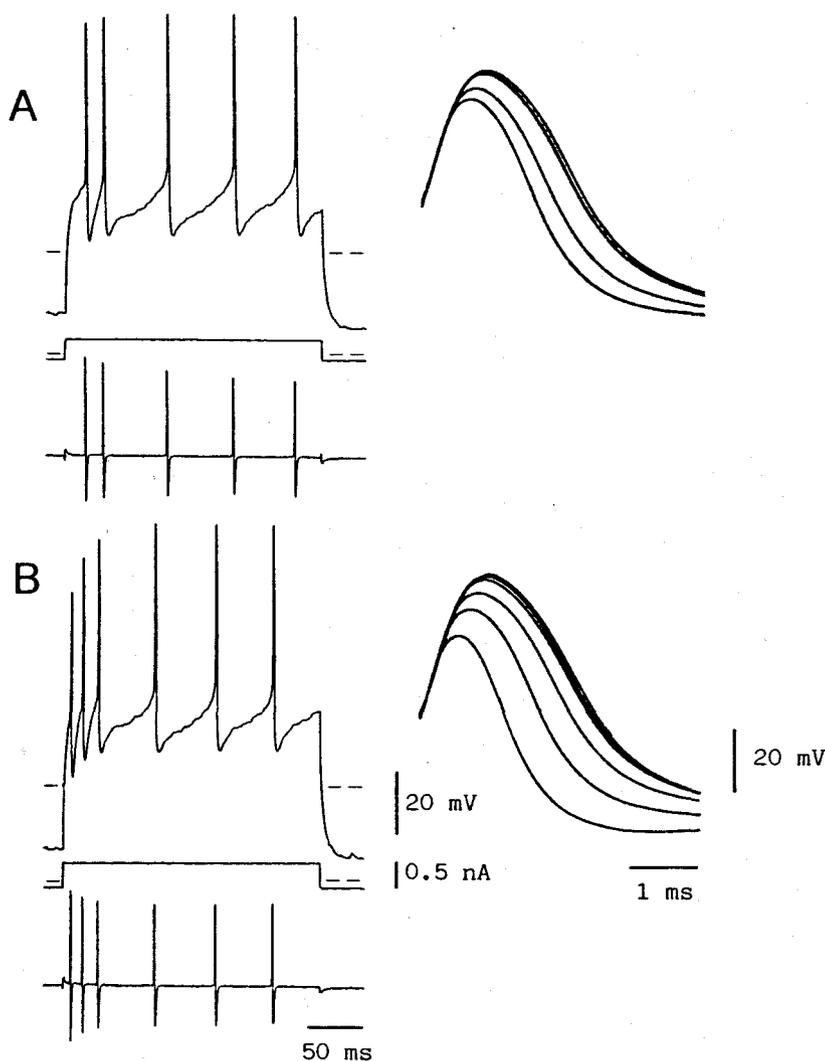


Figura 28. Estudio de la morfología de los potenciales de acción producidos por un pulso despolarizante a potenciales de membrana hiperpolarizados con respecto al de reposo. A La misma neurona que la de la figura 27 fue estimulada con un pulso despolarizante tras hiperpolarizarla con corriente continua hasta unos 30 mV por debajo del PMR. Con un pulso de baja amplitud se produce, tras la carga pasiva de la membrana, un retraso en la aparición de la primera espiga. Las espigas que se generaron a continuación mostraron grandes diferencias entre sí, como vemos en el panel derecho. B Al aumentar la amplitud del pulso se produjo un brote de espigas al comienzo del pulso. Las primeras espigas poseen una menor amplitud y duración que las del final del pulso. El registro diferenciado muestra una importante caída en las pendientes de ascenso y descenso a lo largo del pulso.

Debido al comportamiento no lineal del disparo repetitivo de estas neuronas, estudiamos la relación existente entre la frecuencia de disparo y la corriente inyectada mediante la estimulación con pulsos de 1 s de duración. Se calculó la frecuencia instantánea para el primero, segundo y cuarto intervalos interespiga así como para el considerado como intervalo del estado estacionario

que fue la media de los tres últimos del pulso.

En la figura 29 se muestra uno de estos experimentos. En una neurona a PMR (-50 mV) la relación frecuencia versus corriente ($f-I$) presenta un incremento más o menos lineal en los intervalos considerados salvo el primero, que muestra una cierta saturación de la frecuencia de disparo a partir de 0.15 nA de estímulo (Figura 29 B).

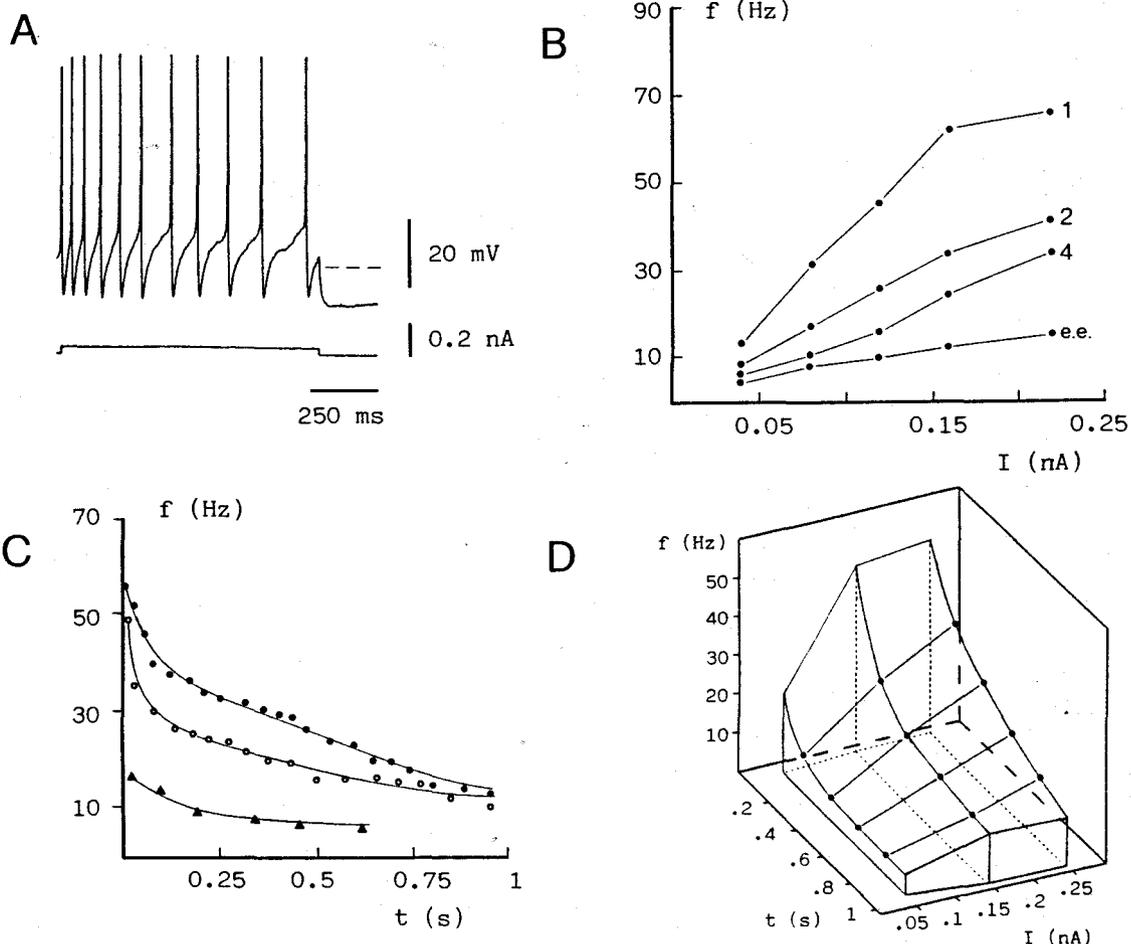


Figura 29. Análisis de las relaciones $f-I-t$ en el disparo de las neuronas de la SGC a PMR. A Registro del disparo de la neurona nº 52 ante la inyección de pulsos de 1 s de duración a PMR (-50 mV). B Gráfica que relaciona la frecuencia instantánea en los siguientes intervalos interespiga: primero (1 en figura), segundo (2), cuarto (4) y en el estado estacionario (e.e.) (media de los tres últimos intervalos interespiga), con la corriente inyectada. C Gráfica de la frecuencia instantánea frente al tiempo en tres pulsos de diferentes amplitudes: 0.25 nA (círculos rellenos), 0.15 nA (círculos vacíos) y 0.05 nA (triángulos). D Gráfica de las relaciones entre frecuencia, corriente y tiempo.

Para estudiar las características de la adaptación que sufre esta célula ante la inyección de corriente se hallaron las relaciones frecuencia versus tiempo ($f-t$) para tres pulsos de distinta amplitud (Figura 29 C). El fenómeno

de la adaptación tiene lugar incluso con los pulsos de menor amplitud. Pueden observarse dos fases en el curso temporal de la adaptación, un descenso rápido de la frecuencia al comienzo del pulso que se sigue de uno lento a partir de los primeros 200 ms. Ambas fases se acompañan de un gradual incremento del umbral de disparo a lo largo del pulso. La amplitud del pulso afecta al curso temporal de la adaptación ya que al aumentarla se incrementa la pendiente de la fase lenta. Salvo con los pulsos de menor amplitud, la frecuencia no alcanza el estado estacionario.

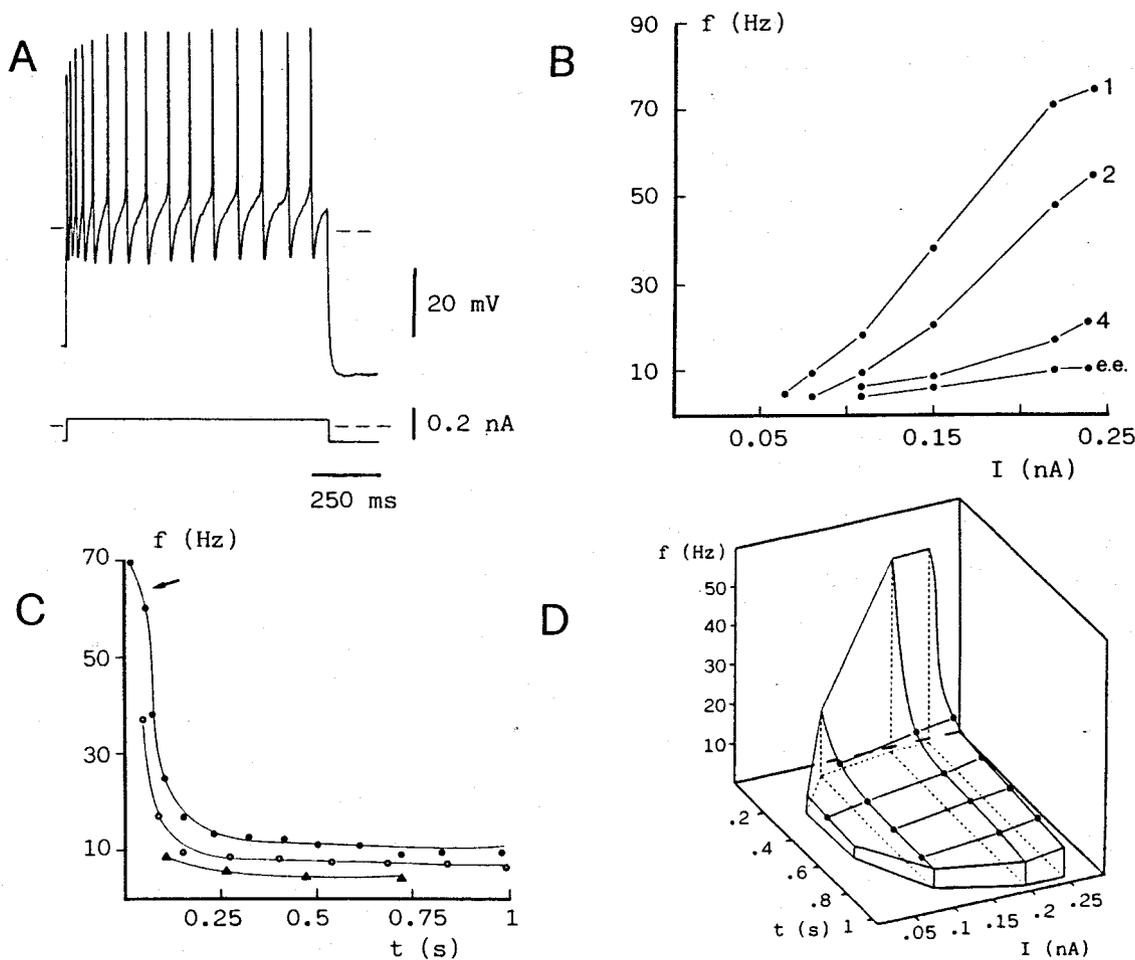


Figura 30. Análisis de las relaciones $f-I-t$ en el disparo de las neuronas de la SGC a potenciales de membrana mas negativos que el de reposo. A Registro del disparo repetitivo de la misma neurona que la de la figura 29 tras la hiperpolarización estable a -85 mV. B Gráfica que relaciona la frecuencia instantánea, en los mismos intervalos que en la figura 29 B, con la corriente inyectada. C Gráfica de la frecuencia instantánea frente al tiempo en tres pulsos de diferentes amplitudes: 0.25 nA (círculos rellenos), 0.15 nA (círculos vacíos) y 0.07 nA (triángulos). La flecha indica el enlentecimiento en la caída de la frecuencia producido por la aceleración inicial del disparo que aparece en estas condiciones. D Gráfica de las relaciones entre frecuencia, corriente y tiempo.

Con la célula hiperpolarizada hasta un potencial de membrana de -85 mV (Figura 30 A) se observa un cambio sustancial en las relaciones entre frecuencia instantánea, tiempo y corriente. En la gráfica $f-I$ (Figura 30 B) se aprecia una mayor pendiente en los dos primeros intervalos interespiga así como una sutil forma sigmoide. Existe, por tanto, una gran diferencia entre los primeros intervalos interespiga y los del estado estacionario, debido a la aceleración del disparo al comienzo del pulso.

Al estudiar la adaptación a este potencial de membrana (Figura 30 C) se aprecia, al comienzo del pulso, una mayor sensibilidad por parte de la neurona a la corriente inyectada. Tras los primeros 150 ms la frecuencia de disparo alcanza el estado estacionario y la corriente inyectada no afecta al curso temporal de la curva. Con los pulsos de mayor amplitud ocurre un enlentecimiento en la caída de la frecuencia (flecha en figura 30 C) indicando la presencia del brote inicial.

En el panel D de las figuras 29 y 30 se representan tridimensionalmente las relaciones entre frecuencia, corriente y tiempo para apreciar mejor las diferencias en el disparo repetitivo según el potencial de membrana.

Dada la diferencia estadísticamente significativa en la resistencia de entrada de las neuronas de la SGC a lo largo del eje caudo-rostral mesencefálico nos planteamos estudiar si existían diferencias en el disparo repetitivo de acuerdo con esta R_N .

En la figura 31 se muestra el estudio de la relación entrada-salida en una neurona de la muestra con moderada R_N (217 M Ω). Se observa una clara diferencia entre el disparo de esta neurona y la de la célula de las figuras 29 y 30, la cual tenía una elevada R_N (463 M Ω). A PMR la relación $f-I$ es lineal en todos los intervalos interespiga en el rango de corrientes usado (Figura 31 B) y existe una ausencia casi total de adaptación (Figura 31 C). Al hiperpolarizar la neurona se puso de manifiesto el brote, en este caso de dos espigas, correspondiente al segundo patrón de disparo hallado en estas células. Sin embargo, salvo en el intervalo interespiga correspondiente al brote, las relaciones entre frecuencia, corriente y tiempo no varían de forma importante (Figura 31 E y F).

Para corroborar estas diferencias en el disparo estudiamos la relación entre la corriente inyectada y el número de espigas producidas por un pulso de 250 ms en un total de 6 neuronas, de las cuales 3 tenían alta R_N

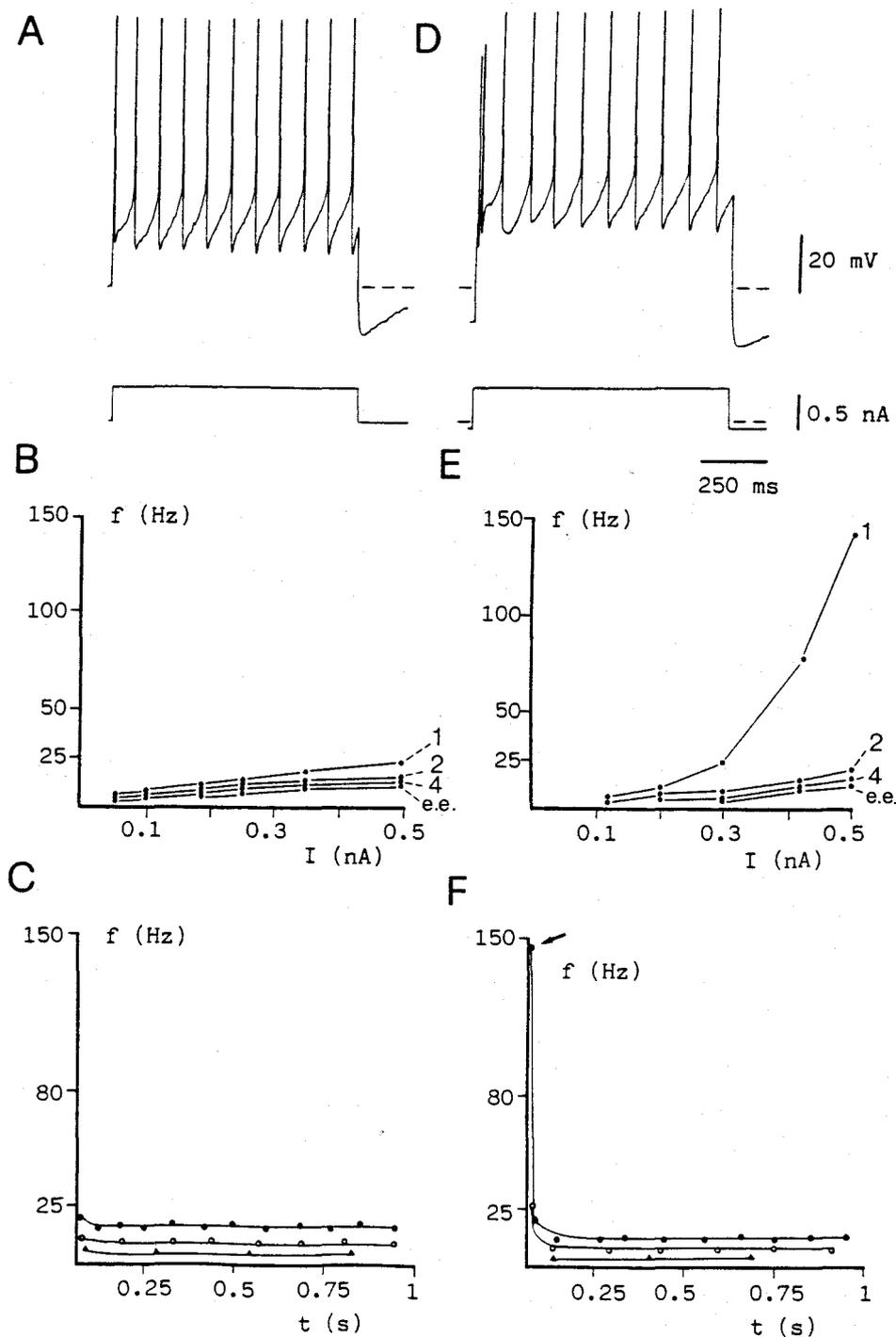


Figura 31. Disparo repetitivo sin adaptación en neuronas de la SGC. A Registro del disparo de la neurona nº 62 a PMR ante la inyección de pulsos despolarizantes de 1 s de duración. B Relación $f-I$ en esta neurona. Se aprecia la escasa diferencia de la frecuencia instantánea en los intervalos interespiga considerados (primero, segundo, cuarto y estado estacionario). C La gráfica $f-t$ muestra de forma más clara la ausencia de adaptación a la inyección de corriente de varias amplitudes (círculos llenos: 0.5 nA; círculos vacíos: 0.25 nA; triángulos: 0.05 nA) a lo largo del pulso. D, E y F muestran el disparo, la relación $f-I$ y la relación $f-t$ en la misma neurona previa hiperpolarización con corriente continua estable. Tan sólo el primer intervalo interespiga presenta un incremento notable de la frecuencia de disparo (flecha en F).

($347.3 \pm 82.5 \text{ M}\Omega$, media \pm desviación estándar) y las tres restantes tenían bajos valores de este parámetro ($135.9 \pm 59.1 \text{ M}\Omega$). La figura 32 A representa dicha relación f - I . De la observación de la gráfica se deduce que las neuronas con alta R_N poseen curvas f - I con una mayor pendiente (29.09 ± 8.12 impulsos/nA, media \pm desviación estándar, $n = 3$) y en las que no se puede determinar claramente la existencia de más de un rango de disparo. Dichas curvas se ajustan a una recta con coeficientes $r \geq 0.94$, pero en todas ellas se aprecia la tendencia a presentar una saturación del disparo ante la inyección de corriente de amplitud creciente. Las curvas f - I de las neuronas con baja R_N presentaron una menor pendiente (5.28 ± 0.32 impulsos/nA) y una mayor linealidad ($r \geq 0.96$).

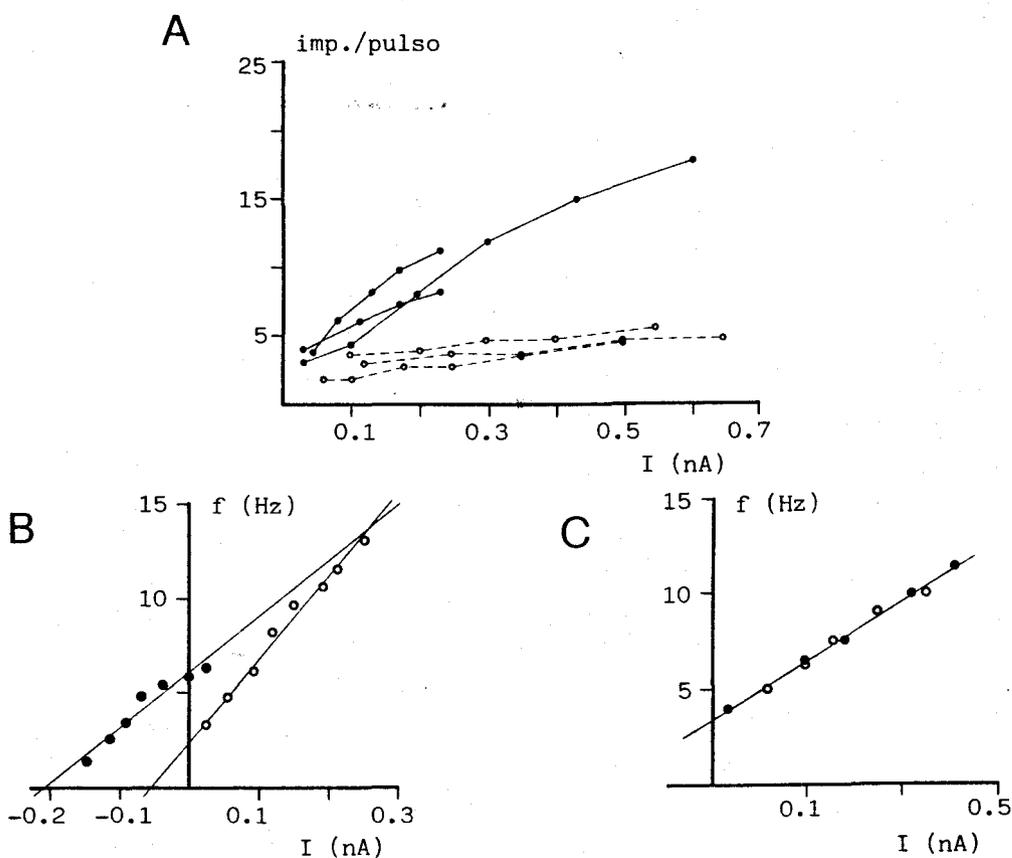


Figura 32. Variación en la relación f - I en neuronas de la SGC con distinta R_N . A Gráfica f - I en la que se representa la frecuencia total en un pulso de 250 ms (impulsos/pulso) en tres neuronas con baja R_N (neuronas nº 17, 62 y 98; círculos vacíos) y en otras tres neuronas de elevada R_N (nº 36, 52 y 53; círculos llenos). Estas últimas presentan una mayor ganancia (pendiente de la recta de ajuste) y una cierta saturación en el disparo con pulsos de gran amplitud. B Gráfica f - I en la neurona nº 52; con elevada R_N , estimulada con pulsos de 1 s de duración a PMR (círculos vacíos) y bajo hiperpolarización hasta -85 mV (círculos llenos). La pendiente de la recta de regresión y el coeficiente de correlación fueron $88.3 \text{ espigas}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{nA}^{-1}$ y 0.99 para el primer caso (célula a PMR) y $59.4 \text{ espigas}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{nA}^{-1}$ y 0.97 para el segundo. Cuando la estimulación parte de niveles hiperpolarizados, los valores se calculan sumando algebraicamente la corriente hiperpolarizante estable y el pulso despolarizante. C El mismo experimento realizado en la neurona nº 62, con baja R_N . La pendiente de la recta de regresión y el coeficiente de correlación fueron $17.4 \text{ espigas}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{nA}^{-1}$ y 0.98 para los dos casos.

En la figura 32 B y C se presentan las gráficas $f-I$ de dos células, una con alta R_N (B) y otra con baja R_N (C) ante la inyección de pulsos de 1 s de duración a potencial de membrana de reposo (círculos vacíos) y a un potencial de membrana más hiperpolarizado, en el que se observó el segundo patrón de disparo (círculos rellenos). La parte negativa del eje X muestra la amplitud real del pulso cuando la neurona fue hiperpolarizada. Las relaciones $f-I$ fueron más o menos lineales en todos los casos en el rango de amplitudes de corriente usado. La pendiente de la recta en B es mayor con la célula a PMR pero es interesante notar que, sin ninguna corriente neta inyectada, la frecuencia de disparo fue mayor para potenciales de membrana más negativos. En C se aprecia que tanto la pendiente de la recta, mucho menor que en el caso anterior, como el corte con el eje Y no varían bajo condiciones de hiperpolarización.

Para completar el estudio de las diferencias en el disparo según la R_N se probó la existencia de cambios en la morfología de los potenciales de acción en relación con la R_N (Figura 33). La comparación de la primera y última espigas del tren de alta frecuencia de potenciales de acción generado ante la inyección de un pulso rectangular de corriente de 1 s de duración, pone de manifiesto que la duración de la espiga incrementa, y decrece la amplitud de la misma, de forma clara en la neurona con alto R_N , mientras que en la que tiene bajo R_N no se observan diferencias significativas en estos parámetros (D y E). También se observan cambios en la razón de ascenso de dichas espigas en el disparo repetitivo (A y B). En C se grafica el porcentaje de cambio en el máximo de la función derivada entre la primera y la última espiga del pulso en función de la corriente inyectada. La neurona con mayor R_N muestra una mayor disminución en dicho máximo que la de menor R_N .

1.3.2. Respuesta ante pulsos de corriente en forma de rampa.

La existencia de adaptación en parte de las neuronas de la SGC nos lleva a pensar que el disparo repetitivo de dichas neuronas puede ser dependiente de la dI/dt además de la amplitud de la corriente.

Para estudiar esta dependencia utilizamos pulsos de corriente en forma de rampa ya que la dI/dt es constante durante la rampa. En la figura 34 A y C se muestra un experimento en el cual a una célula, que mostraba adaptación a la estimulación con pulsos rectangulares, se le inyectó un pulso en rampa de amplitud constante al que se le fue variando su duración, consiguiendo así

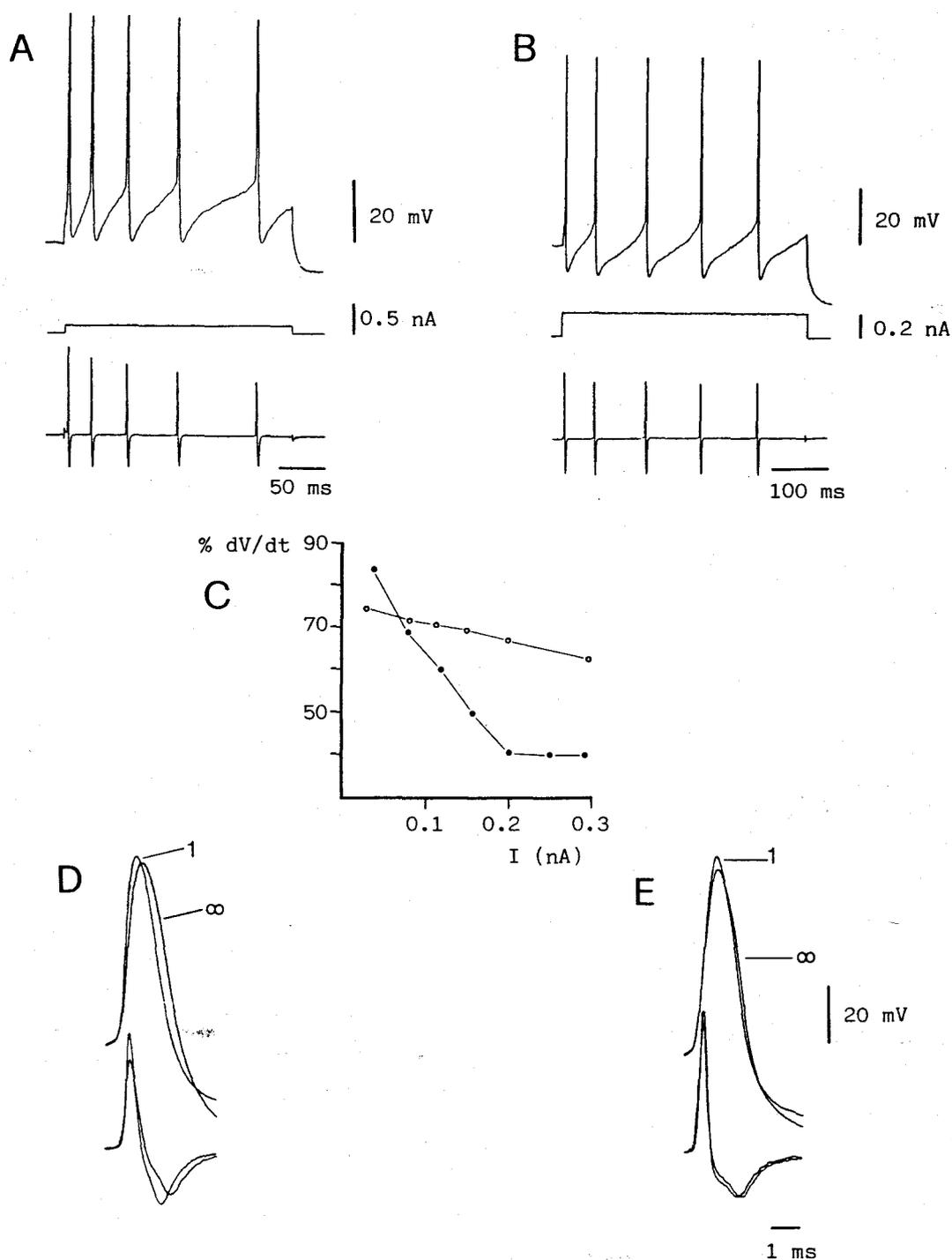


Figura 33. Variaciones en la morfología de las espigas observadas en la respuesta durante un pulso rectangular de corriente en neuronas de la SGC con distinta R_m . A y B Registros de voltaje, corriente y dV/dt en la neurona nº 52, $R_m = 463 \text{ M}\Omega$, y en la nº 17, $R_m = 77.7 \text{ M}\Omega$. C Gráfica que relaciona el porcentaje de cambio de la máxima pendiente de ascenso de la espiga, a lo largo de un pulso de 1 s de duración (valor de la máxima pendiente de la última espiga del pulso respecto al de la primera), con la corriente inyectada en las neuronas mostradas en A (círculos llenos) y en B (círculos vacíos). D Registros de voltaje y dV/dt superpuestos de la primera (1) y última espiga (∞) producida por un pulso de 0.3 nA de amplitud y 1 s de duración en la neurona mostrada en A. E Los mismos registros en la neurona presentada en B.

distintas pendientes de la rampa. Relacionando la frecuencia instantánea con el tiempo observamos que la primera incrementa conforme aumenta la pendiente de la rampa y que la frecuencia en el pico de la rampa es en todo momento mayor que la frecuencia de disparo en el estado estacionario de un pulso rectangular de la misma amplitud que la rampa. El disparo repetitivo de esta célula es, por tanto, dependiente de la dI/dt en la rampa así como de la amplitud de ésta.

En la figura 34 B y D realizamos el mismo experimento en una célula cuyo disparo repetitivo carecía de adaptación. Esta neurona se muestra sensible a la variación de amplitud de la corriente pero la dI/dt no parece influir de forma decisiva en su disparo. Nótese la escasa variación de la frecuencia máxima en cada rampa.

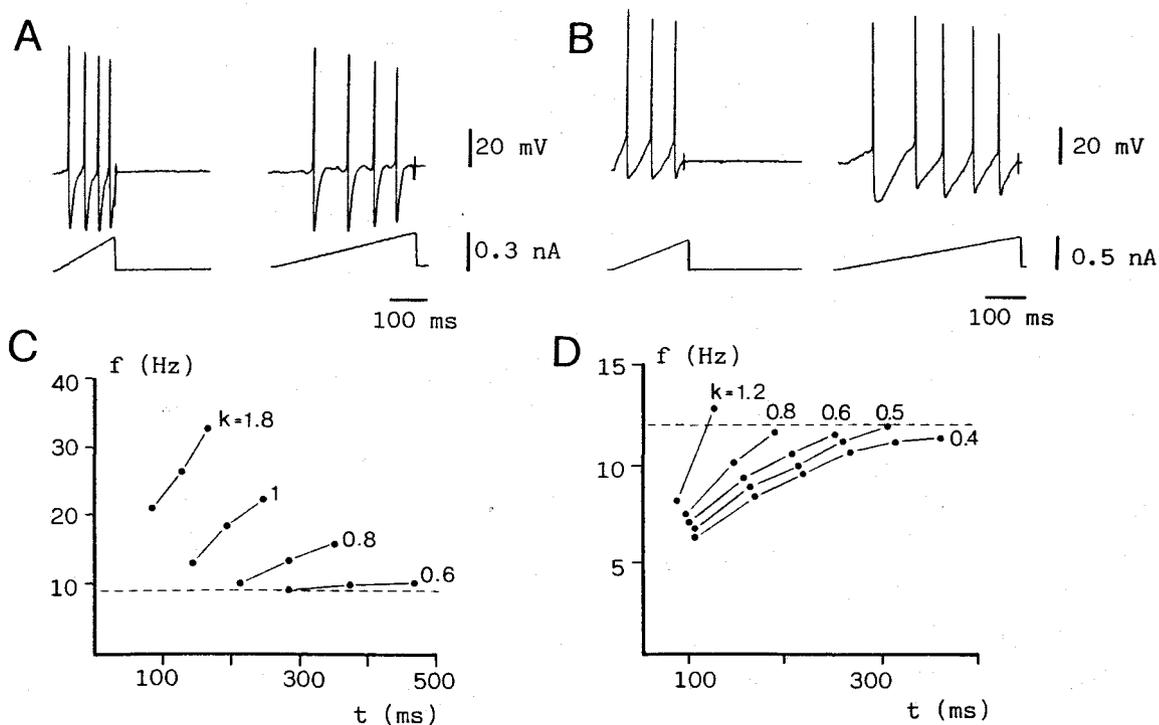


Figura 34. Respuesta de las neuronas de la SGC a la inyección de corriente en forma de rampa. A y B Registros filtrados del disparo repetitivo de las neuronas nº 58 y 62, respectivamente. El disparo de la primera de ellas posee adaptación. La segunda (B) no presenta adaptación. C y D Relaciones entre la frecuencia de disparo instantánea y el tiempo, en las dos células citadas, ante la estimulación con pulsos en rampa de diferentes pendientes (k , en nA/s). Las líneas discontinuas representan la frecuencia de disparo en el estado estacionario de un pulso rectangular de la misma amplitud que la rampa.

1.4. Bases iónicas del disparo repetido.

Los potenciales de acción que forman el disparo espontáneo rítmico de las neuronas de la SGC se generan, como ya vimos, por una conductancia al Na^+ fundamentalmente axosomática (g_{Na}) y otra al Ca^{2+} posiblemente somatodendrítica ($g_{\text{Ca}_{\text{HT}}}$). En su repolarización pueden participar varias conductancias al K^+ : un rectificador retrasado clásico ($g_{\text{K}_{\text{DR}}}$), una o dos dependientes de Ca^{2+} ($g_{\text{K}_{\text{Ca}}}$) y otra transitoria con una cierta dependencia del Ca^{2+} ($g_{\text{K}_{\text{A}}}$), las cuales dan lugar a una importante PHP, bifásica en su vuelta a la línea base. También hemos visto que en el disparo repetitivo ante pulsos rectangulares las espigas modifican su morfología a lo largo del pulso. ¿Cuales son entonces los cambios en las conductancias iónicas que suceden con la citada estimulación y que originan los patrones de disparo observables en estas células?

Para estudiar el papel de la g_{KDR} en el disparo repetitivo utilizamos el TEA (5 mM) ya que bloquea a esta corriente iónica en la mayoría de las células en que se ha estudiado (Rudy, 1988). En la figura 35 A se muestra el pulso control. Esta neurona tenía una clara adaptación fruto de una gran variación en la amplitud y en el curso temporal de las PHP de las espigas. Al añadir el TEA las PHP incrementan su amplitud y todas ellas muestran aproximadamente el mismo curso temporal, lo cual hace menos evidente el fenómeno de la adaptación. Las espigas también incrementan su amplitud y duración, posiblemente por una mayor entrada de Ca^{2+} en las dendritas, como apuntábamos al estudiar las bases iónicas de los potenciales de acción espontáneos. Estos resultados hacen pensar que la g_{KDR} podría determinar, al menos en parte, la duración de los primeros intervalos interespiga del pulso pero que la adaptación es originada por la paulatina activación de una o más $g_{\text{K}_{\text{Ca}}}$ debido a la entrada de Ca^{2+} con cada potencial de acción. Igualmente estas $g_{\text{K}_{\text{Ca}}}$ podrían determinar el disparo rítmico del estado estacionario.

Para contrastar esta hipótesis probamos el efecto que sobre el disparo repetitivo tiene una solución en la que el Ca^{2+} es reemplazado por Co^{2+} . En la figura 36 A se ve el registro control con un tren de espigas con adaptación. El disparo en ausencia de Ca^{2+} fracasa al ir disminuyendo gradualmente la amplitud de las espigas y de las PHP (Figura 36 B). En la recuperación, al volver a la solución estándar, se produce el disparo repetitivo de potenciales de acción

(Figura 36 C), pero estos presentan una morfología diferente al disparo control tal vez por las razones ya expuestas en 1.2.3.

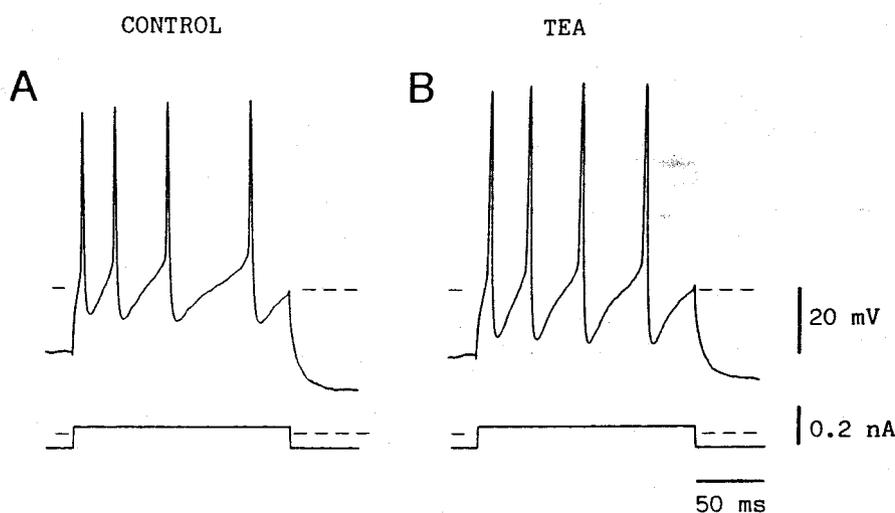


Figura 35. Efecto del TEA en el disparo repetitivo de las neuronas de la SGC. A Registro control del disparo repetitivo de la célula nº 52. B Respuesta de la misma neurona ante el mismo pulso tras la adición de TEA (10 mM). Las líneas discontinuas representan el nivel de PMR y de 0 de corriente.

Parece entonces que, en ausencia de Ca^{2+} extracelular, no se activan las g_{Ca} al no entrar Ca^{2+} con las espigas, y la PHP se vuelve insuficiente para recuperar de la inactivación a los canales para Na^+ que se inactivan con la despolarización producida con cada espiga. De ser esto cierto, el fracaso del disparo podría ser evitado al hiperpolarizar la célula de forma artificial con corriente continua estable. La confirmación de esta sospecha se ilustra en la figura 37 A y B.

En algunos experimentos en los que se bañaba a la rodaja con una solución sin Ca^{2+} , como el de la figura 37 C y D, se observó la aparición de pequeñas espigas de 5 a 10 mV de amplitud, con una fase de ascenso rápido y un lento descenso. Estas espiguitas incrementan su amplitud con la hiperpolarización, disparan a potenciales de acción de Na^+ (flecha en figura 37 D) y son bloqueadas por TTX (no mostrado en figura). Se han descrito espiguitas semejantes a las halladas en las neuronas de la SGC en otras estructuras del SNC de los mamíferos (Jahnsen, 1986). La razón por la que estas respuestas

subumbrales aparecen en ausencia de Ca^{2+} y su posible papel fisiológico no han sido abordados en este trabajo.

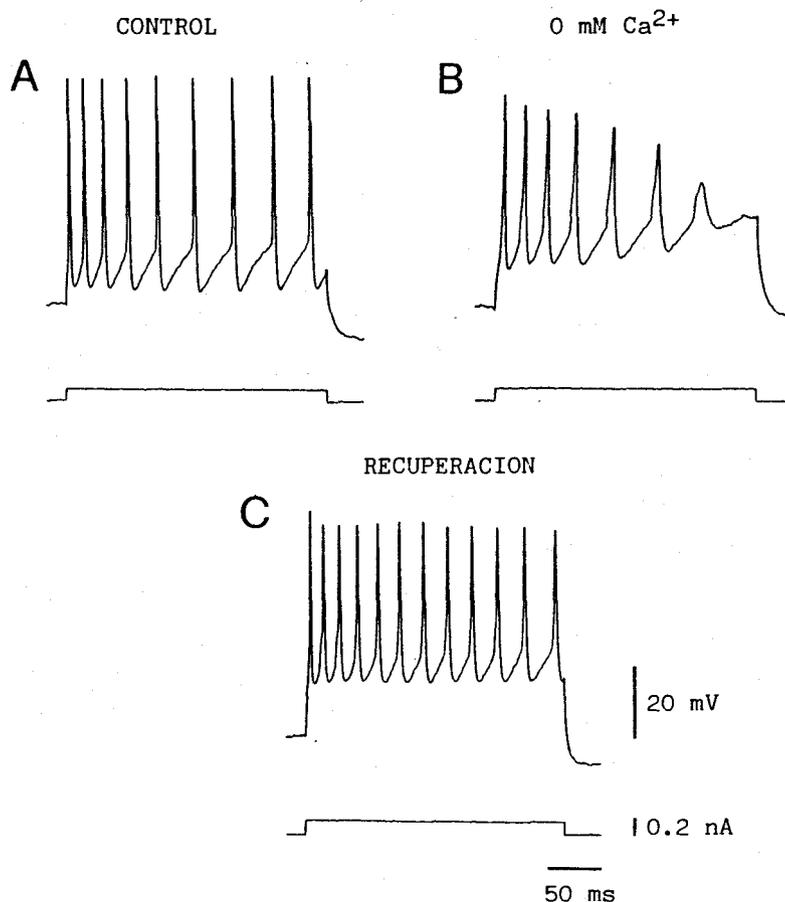


Figura 36. Papel del Ca^{2+} en el disparo repetitivo de las neuronas de la SGC. A Registro control a PMR de la neurona nº 48. B Registro en ausencia de Ca^{2+} . C Disparo repetitivo en la misma neurona tras volver a pasar solución estándar.

Dada la supuesta existencia de gK_{Ca} que condicionan el disparo repetitivo, y una vez demostrado el bloqueo de parte de la PHP de las espigas por apamina, probamos el efecto de esta sustancia sobre el disparo de las neuronas de la SGC. En la figura 38 A se presenta el registro control y en B el registro en presencia de apamina ($0.1 \mu\text{M}$). Se aprecia la menor amplitud en la PHP y la progresiva disminución en la amplitud de los potenciales de acción que lleva al fracaso del disparo al final del pulso. La frecuencia de disparo aumenta durante el pulso y desaparece el fenómeno de adaptación. Con pulsos de mayor duración

se aprecia mejor el fracaso y la aparición esporádica de dobletes de espigas rápidas (no mostrado en figura).

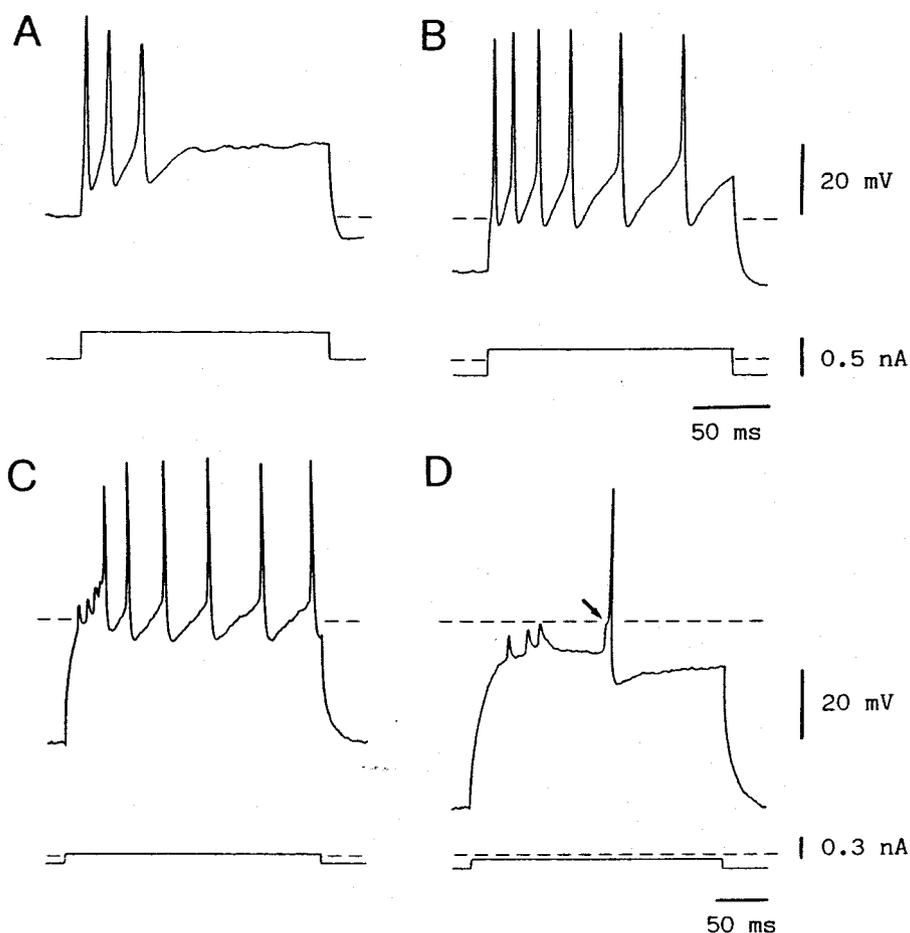


Figura 37. A Anulación del disparo repetitivo en una neurona de la SGC (nº 43) en ausencia de Ca^{2+} en la solución de perfusión. B Recuperación del disparo repetitivo al estimular la misma neurona, también en ausencia de Ca^{2+} , desde niveles hiperpolarizados del potencial de membrana. C y D Presencia de pequeñas espigas en registros de la neurona nº 48 en ausencia de Ca^{2+} . Nótense los diferentes umbrales de dichas espiguitas y el disparo por una de ellas de un potencial de acción rápido (flecha). La línea discontinua señala el PMR y el nivel 0 de corriente.

1.5. Poshiperpolarización de larga duración. Bases iónicas.

La mayoría de las neuronas de la SGC de la muestra (90.4 %) presenta una poshiperpolarización de larga duración (PHPL) tras finalizar el tren de potenciales de acción generados por un pulso despolarizante. Esta PHPL tiene una amplitud de 13.6 ± 4.6 mV ($n = 38$) que es dependiente del número de espigas del pulso (Figura 39 A y B). En algunas células se pueden distinguir dos fases en el

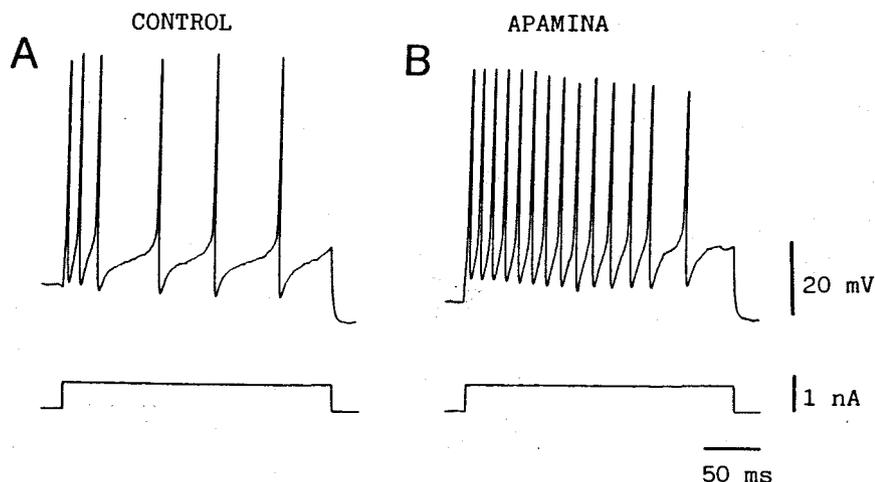


Figura 38. Efecto de la apamina en el disparo repetitivo de las neuronas de la SGC. A Registro control a PMR en la célula nº 104. B Registro del disparo ante el mismo pulso de estimulación al añadir apamina (0.1 μ M).

curso temporal de la vuelta a la línea base (Figura 39 B). La duración de esta PHPL es de 0.15 a 2.7 s, según la célula. La aparición de la PHPL retrasa el disparo espontáneo en aquellas neuronas que lo poseen (Figura 39 C y D). Durante la PHPL se observa un incremento en la conductancia de la célula que depende del número de espigas generadas por el pulso (Figura 40 A).

El curso temporal del cambio de conductancia que origina la PHPL se estudió midiendo la resistencia de entrada de la neurona durante dicha PHPL. Al llevar la proporción del cambio de potencial a lo largo de la PHPL respecto al de reposo a una gráfica semilogarítmica frente al tiempo se observa que el curso temporal de dicho voltaje posee dos exponenciales, lo que pone de manifiesto la posible participación de dos conductancias distintas (Figura 40 B). En la figura 40 C se muestra que, al inyectar corriente hiperpolarizante estable, el potencial al que se anula la PHPL (-93 mV en este caso) corresponde aproximadamente al potencial de equilibrio para el K^+ y que la anulación sucede para las dos fases, rápida y lenta, de la PHP. De esto se deduce que dos conductancias al K^+ podrían participar en la PHPL.

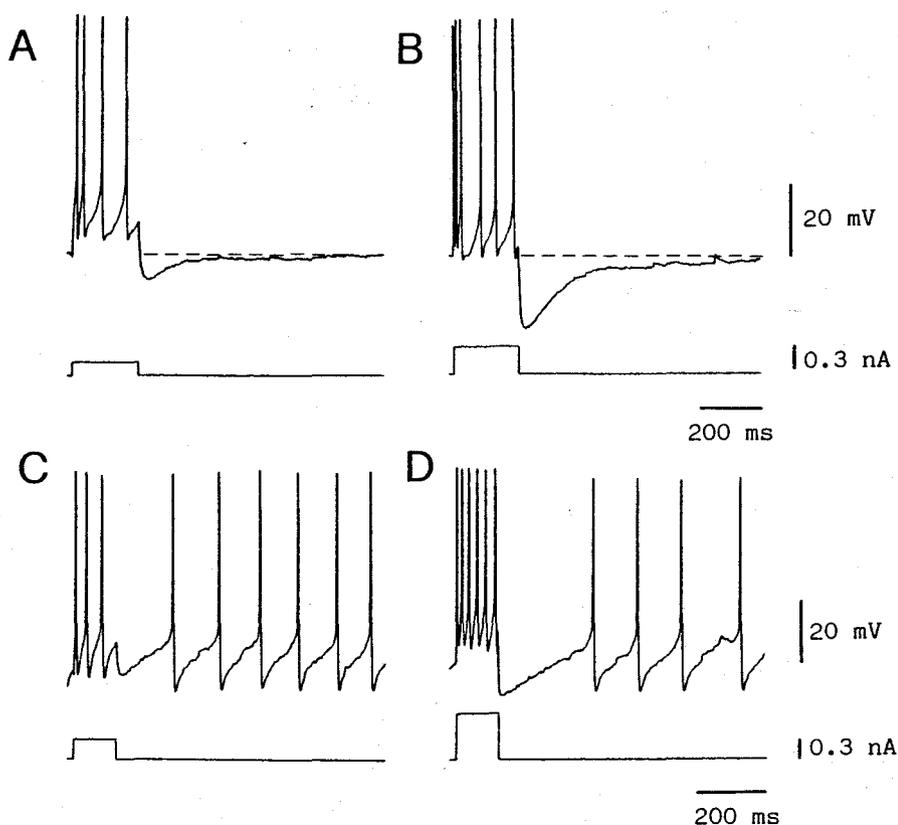


Figura 39. Poshiperpolarización de larga duración tras el disparo producido por un pulso rectangular de corriente despolarizante. A y B El aumento en la amplitud del pulso origina una mayor poshiperpolarización tras él. Neurona nº 36 a PMR. C y D Efecto de la poshiperpolarización de larga duración sobre el disparo espontáneo de la célula nº 17.

En variadas estructuras del SNC de los mamíferos se ha hallado la participación fundamental de las gK_{Ca} en la PHPL (Hotson y Prince, 1980; Bourque y col., 1985; Yarom y col., 1985; Minami y col., 1986). Por esta razón el estudio de las bases iónicas de la PHP se dirigió a la demostración de la participación de estas gK_{Ca} .

En la figura 41 A y B se muestra, respectivamente, el registro control de la PHPL y el registro en ausencia de Ca^{2+} . La PHPL desaparece casi por completo, quedando una pequeña poshiperpolarización tras el pulso que puede ser debida a una gK_{DR} activada por la despolarización. Al añadir apamina ($0.1 \mu M$) a la solución de perfusión (Figura 41 C y D) se observa que desaparece toda la primera fase de la PHPL quedando un componente lento de la misma.

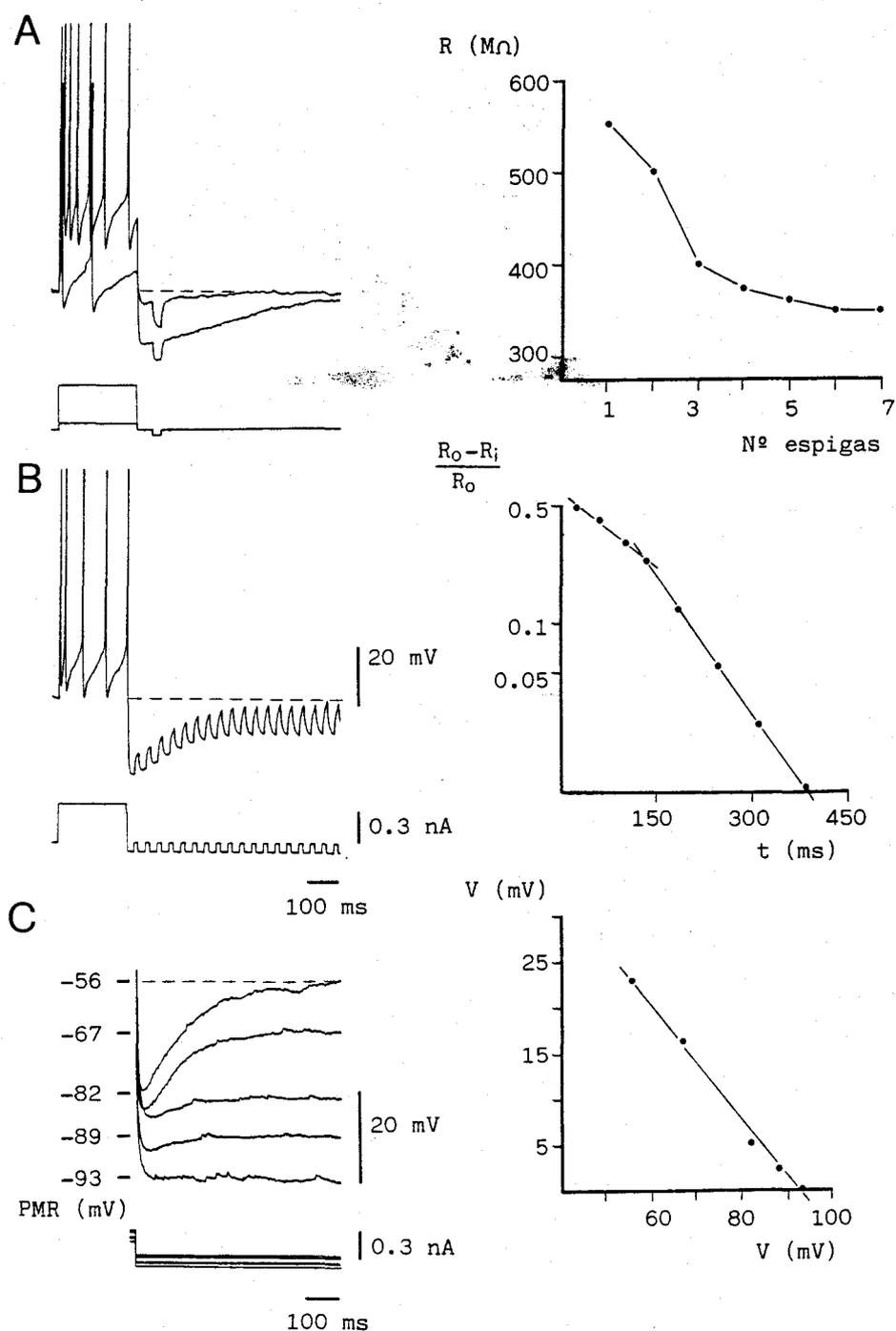


Figura 40. Estudio de la poshiperpolarización de larga duración. A Medida de la resistencia en el pico máximo de dicha poshiperpolarización generada en la neurona nº 74 a PMR. A la derecha se relaciona la resistencia con el número de espigas generadas por el pulso. B Curso temporal del cambio en la resistencia durante la poshiperpolarización de larga duración en la misma célula. En la gráfica semilogarítmica de la derecha se representa la proporción del cambio de resistencia ($R_0 - R_i$) respecto a la de reposo (R_0) a lo largo de la poshiperpolarización, frente al tiempo. C A la izquierda se presenta la paulatina anulación de la poshiperpolarización al incrementar el potencial de membrana inyectando a la célula corriente hiperpolarizante estable. A la derecha se grafica la diferencia de potencial entre el pico máximo de la poshiperpolarización y el potencial de membrana en cada caso. La anulación total se produce a -93 mV. Célula nº 47. En todos los casos la línea discontinua indica el PMR.

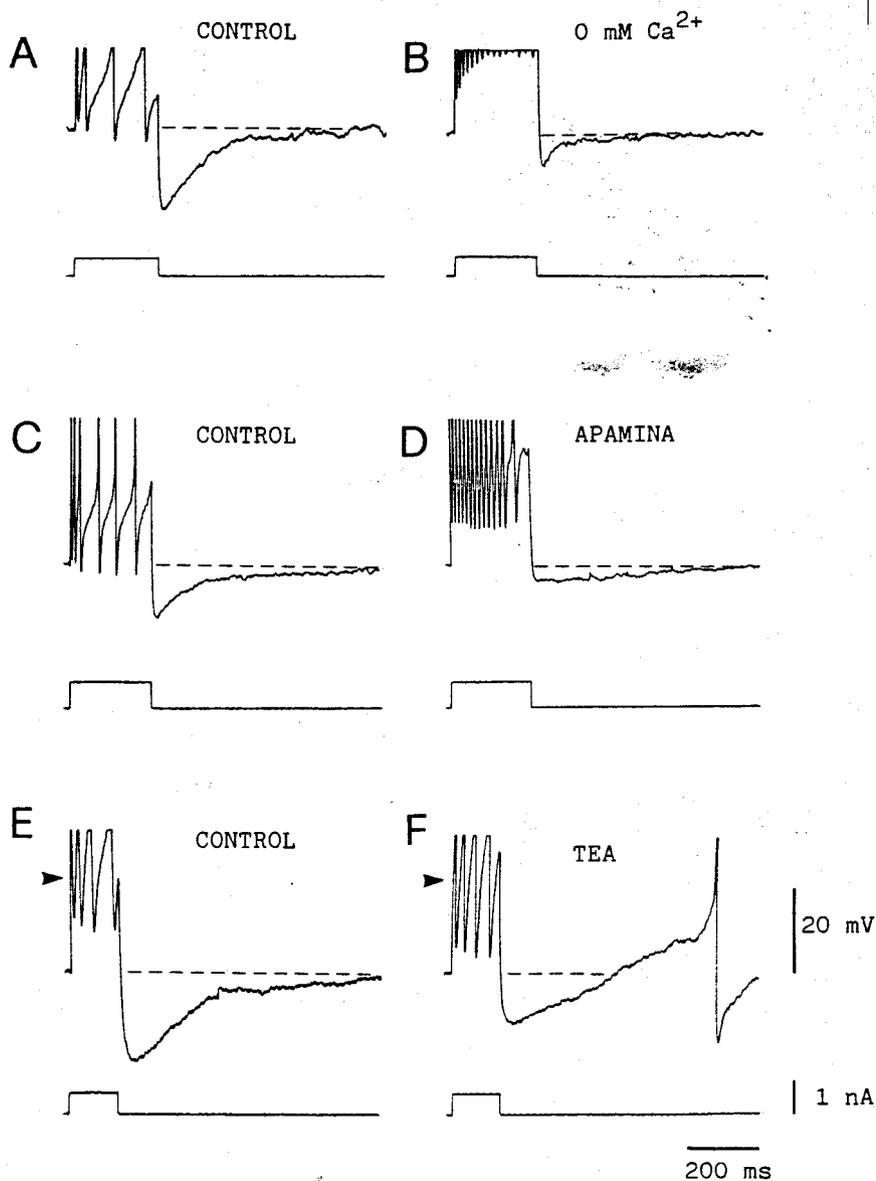


Figura 41. Bases iónicas de la poshiperpolarización de larga duración. En A, C y E se muestran los registros control de las neuronas nº 48, 104 y 52, respectivamente. En B se muestra el registro en ausencia de Ca^{2+} . D Registro en presencia de apamina ($0.1 \mu\text{M}$). F Efecto del TEA (10 mM) sobre la poshiperpolarización de larga duración. En todos los registros las espigas generadas por el pulso despolarizante aparecen truncadas. Los registros A-D se realizaron a PMR (línea discontinua), mientras que en E y F el PMR se indica con una flecha.

El efecto del TEA, que bloquea uno de los dos tipos de gK_{Ca} (Latorre y col., 1982; Wong y Adler, 1986), se muestra en la figura 41 E y F. Con el mismo número de espigas la PHPL disminuye su amplitud máxima a pesar de haberse aumentado la entrada de Ca^{2+} con cada espiga. No podemos observar claramente si

la fase lenta de la PHPL se afecta por el TEA ya que se produjo un incremento de la excitabilidad general de la célula.

1.6. Participación de la conductancia transitoria al K^+ en el patrón de disparo de las neuronas de la SGC.

Uno de los hallazgos más importantes en cuanto al disparo repetitivo de las neuronas de la SGC fue la eventual generación de dos patrones de disparo dependiendo del potencial de membrana. Hemos descrito anteriormente que el brote, o aceleración de las espigas, ocurre al comienzo del pulso en un periodo de tiempo en el que, con pulsos de menor amplitud, se observa un retraso en la aparición del tren de potenciales de acción.

Todo esto nos hace pensar en que el brote inicial puede generarse durante la activación de la gK_A . Para probar esto inyectamos un pulso negativo para ver la vuelta lenta a la línea base producida por la gK_A (Figura 42 A) y la comparamos con el registro de voltaje obtenido ante un pulso positivo inyectado sobre un potencial de membrana 19 mV por debajo del PMR. En B se observa que al comienzo del pulso se produce una pequeña inflexión seguida del retraso antes de que se llegue al umbral de los potenciales de acción y se origine el disparo repetitivo. En ocasiones, sobre la inflexión inicial se genera una espiga de menor umbral y de características distintas a las del disparo repetido posterior (Figura 42 D). Si despolarizamos levemente el potencial de membrana (13 mV bajo el de reposo) y estimulamos con el mismo pulso se produce un brote de cuatro espigas tras el que persiste, aunque menor, el periodo de retraso.

Todos los potenciales de acción generados al comienzo del pulso se diferencian de los del disparo repetitivo en su menor umbral, menor duración (25 %) y amplitud y en la ausencia de meseta de Ca^{2+} en la fase de descenso (Figura 42 C y E). Las PHP fueron también de mayor amplitud y menor duración careciendo de las dos fases descritas anteriormente.

Es curioso que durante la fase de activación de una corriente hiperpolarizante se pueda generar un brote de potenciales de acción cuya frecuencia es mayor que la de los generados tras la inactivación de dicha gK_A . En la figura 43 se estudia la excitabilidad de la célula durante el periodo de activación de la gK_A (Figura 43 A). Sobre un pulso negativo de larga duración

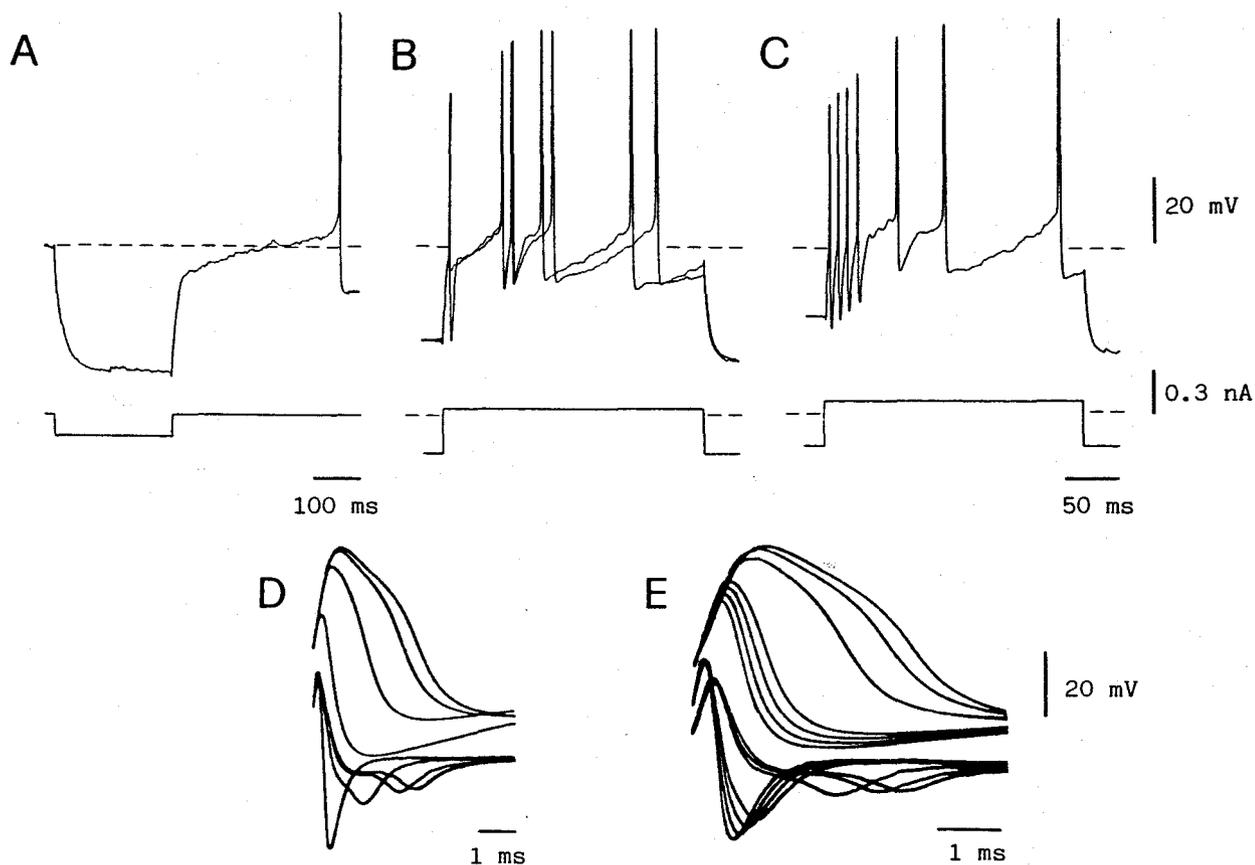


Figura 42. Relación entre el fenómeno de vuelta lenta a la línea base y el patrón de disparo que se produce previa hiperpolarización de la neurona. A Fenómeno de vuelta lenta a la línea base tras un pulso hiperpolarizante a PMR (línea discontinua) en la neurona nº 82. B La estimulación de la misma célula desde niveles hiperpolarizados, mediante un pulso despolarizante, pone de manifiesto dicho fenómeno al comienzo del pulso. Nótese la inflexión inicial producida por la activación de la posible conductancia transitoria al K^+ sobre la que, en ocasiones, se genera una espiga. C Sobre el periodo de vuelta lenta a la línea base se produce, al disminuir levemente la corriente estable hiperpolarizante, la aparición de un brote de cuatro espigas. En D y E se muestran superpuestos los potenciales de acción, y su registro derivado, generados en B y C. Se pueden ver las notables diferencias entre las espigas generadas durante la vuelta lenta a la línea base y las que se producen tras ella.

se superpone un pulso positivo de 15 ms que se desplaza a lo largo del anterior (Figura 43 B). Antes de finalizar el pulso negativo, la despolarización originó una inflexión transitoria tras la cual se ve el efecto de la g_{K_A} . Si el pulso positivo coincide con el inicio del periodo de actividad de la g_{K_A} se genera una espiga de baja amplitud y duración y tras ella se ve el transiente y el retraso hasta que se alcanza el umbral para una espiga más ancha y de mayor amplitud. No obstante, el resultado más importante de este experimento es que, si el pulso positivo se le inyecta a la célula durante la fase en que está activa la g_{K_A} se

producen tres potenciales de acción, mientras que el mismo pulso tras dicha fase da lugar a dos espigas.

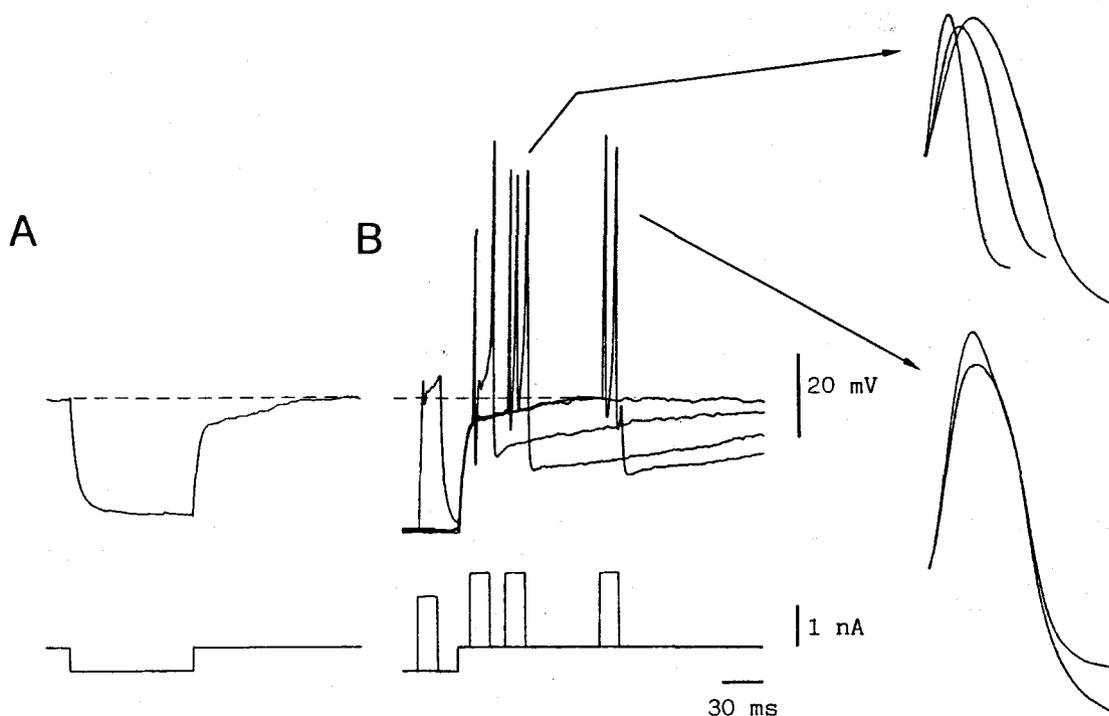


Figura 43. Estudio de la excitabilidad de la neurona durante la fase de activación de la conductancia transitoria al K^+ . A En la neurona nº 19, a PMR (línea discontinua), se muestra la vuelta lenta a la línea base producida tras un pulso negativo. B En la misma célula se muestra la parte final de un pulso semejante al ilustrado en A donde se aprecia la vuelta lenta ya comentada. Sobre este pulso se desplaza otro despolarizante de pequeña duración y de gran amplitud. Es interesante notar el distinto disparo producido por el pulso positivo dependiendo de la posición con respecto al periodo en que se supone activada la conductancia transitoria al K^+ . A la derecha se muestran superpuestas las espigas de los pulsos de los que parten las flechas para resaltar las diferencias morfológicas de las mismas.

Esto significa que se produce un aumento de excitabilidad durante la vuelta lenta a la línea base producida por la g_{K_A} . Este incremento en la excitabilidad puede deberse a la distinta morfología de los potenciales de acción producidos durante la fase de actividad de la g_{K_A} y los producidos tras ella. En el primer caso, las espigas iniciales del pulso poseen una menor duración debido a un menor componente de Ca^{2+} en la fase de descenso.

Tras el análisis de los anteriores resultados nos planteamos como hipótesis de trabajo que la activación de la g_{K_A} pueda evitar la activación de la $g_{Ca_{HT}}$. Así se favorecería el disparo de potenciales de acción

fundamentalmente somáticos que, dada su menor duración, pueden disparar a mayor frecuencia. Si pudiéramos, por tanto, atenuar el efecto de la activación de la g_{K_A} , las espigas producidas al comienzo del pulso tendrían más duración debido a la entrada de Ca^{2+} dendrítico.

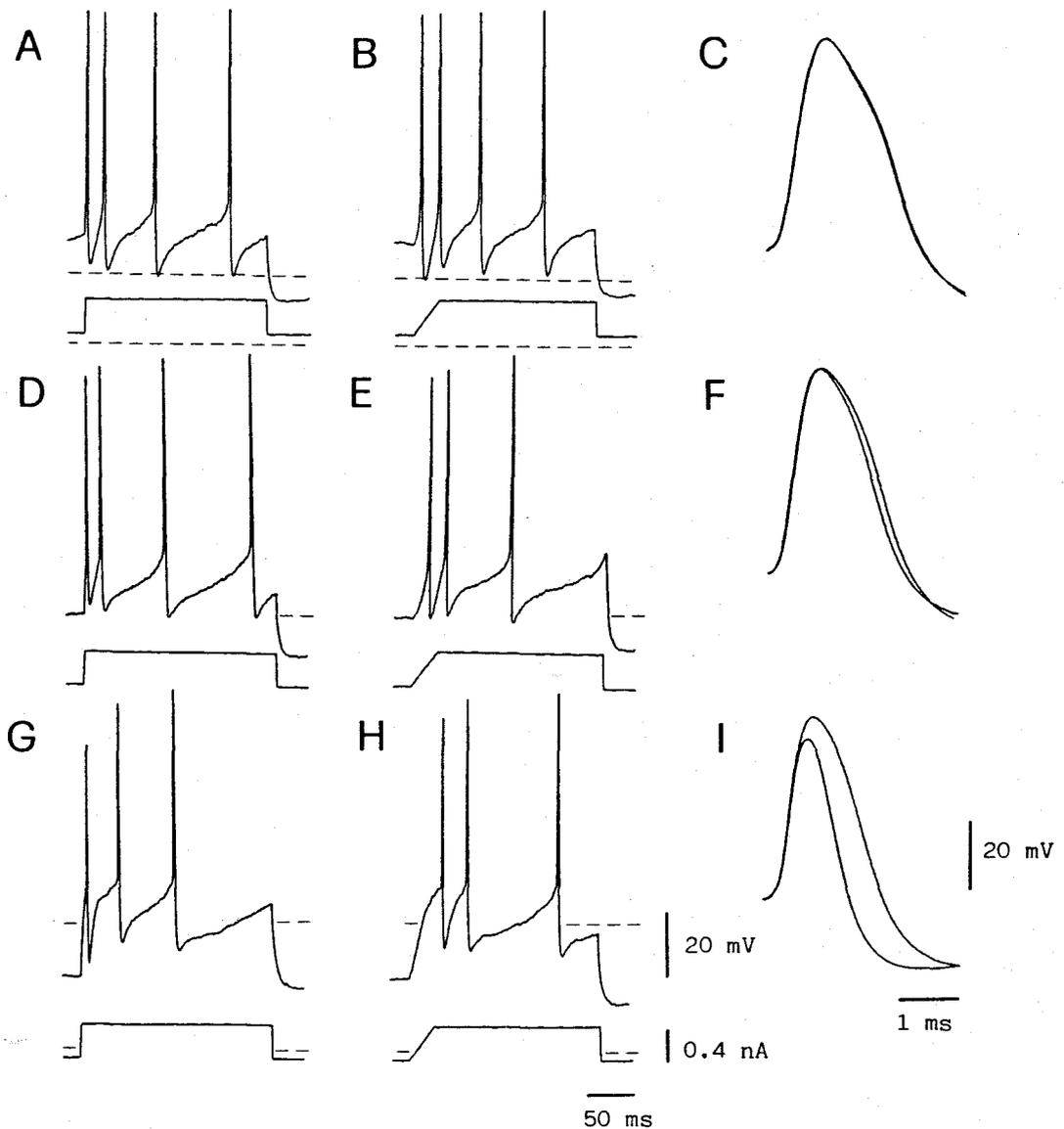


Figura 44. Efecto de la disminución de la pendiente de ascenso de un pulso despolarizante en la morfología del primer potencial de acción que produce dicho pulso a distintos niveles de potencial de membrana. A y B Registros del disparo de la neurona nº 68, a un potencial de membrana de -60 mV, producido (A) por un pulso cuadrado y (B) por otro de la misma amplitud en el que se enlenteció la fase de subida. En C se muestran, superpuestas, las espigas iniciales de los dos pulsos. El mismo protocolo experimental se llevó a cabo a un potencial de membrana de -70 mV, D-F, y de -86 mV, G-I. Las líneas discontinuas indican el PMR y el nivel 0 de corriente.

Tratamos de disminuir el efecto de la gK_A , enlenteciendo la fase de ascenso del pulso positivo. Este experimento se ilustra en la figura 44. En una neurona con un potencial de membrana de -60 mV, los potenciales de acción iniciales muestran una evidente meseta de Ca^{2+} y no se produce ningún cambio al disminuir la razón de ascenso del pulso (Figura 44 A-C). Al PMR de esta célula (-70 mV), la espiga inicial del pulso con rampa tiene mayor duración debido a un incremento en la meseta de la fase de descenso (Figura 44 D-F). A -86 mV se genera con el pulso rectangular una espiga sin componente de Ca^{2+} seguida del retraso producido por la gK_A . Aquí el potencial de acción producido con el pulso con rampa tiene mayor amplitud y duración debido a la entrada de Ca^{2+} con la despolarización (Figura 44 G-I).

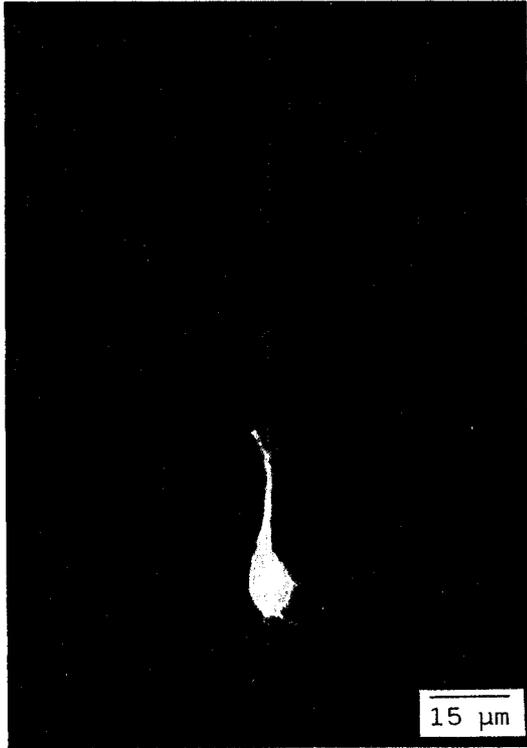
2. Estudio morfológico de la región ventral de la SGC.

2.1. Marcaje de neuronas mediante la inyección intracelular de colorantes fluorescentes.

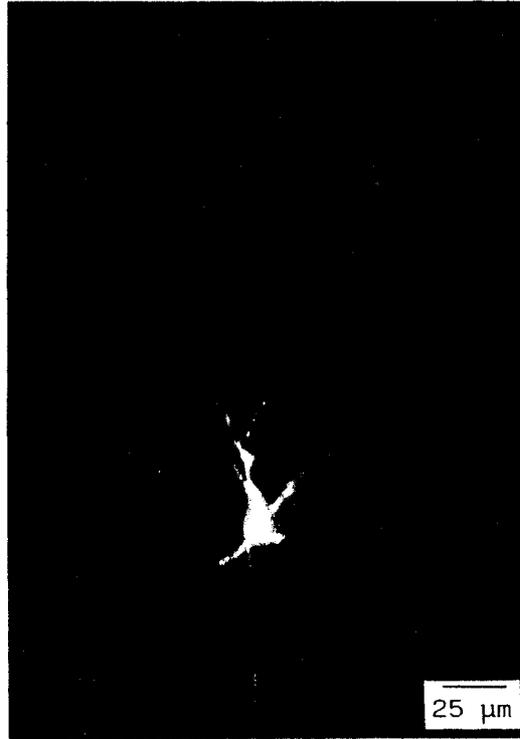
Con esta técnica, se marcaron 31 neuronas de la SGC-ventromedial y ventrolateral. La forma de los somas de estas neuronas es variable aunque, teniendo en cuenta que los cortes fueron siempre coronales, podemos clasificarlas en fusiformes, multipolares, y triangulares (Figura 45). El tamaño de estos somas varía entre 10 y 40 μm en su eje mayor y su orientación es fundamentalmente perpendicular al acueducto mesencefálico, aunque bastantes neuronas disponen su soma paralelamente a éste.

Dadas las supuestas diferencias regionales, según el eje caudo-rostral del mesencéfalo, halladas en algunos de los parámetros electrofisiológicos estudiados anteriormente, analizamos la morfología de las neuronas inyectadas con amarillo Lucifer a lo largo de dicho eje. En cuanto al tamaño del soma se aprecia un moderado incremento en las neuronas más caudales. Los valores varían de 11.2 a 40 μm (21.02 ± 9.3 , media \pm desviación estándar, $n = 9$) en la parte caudal; de 10 a 30 μm (17.8 ± 6.8 , $n = 12$) en la zona media y de 10 a 30 μm (17.11 ± 6.85 , $n = 9$) en la parte más rostral de la SGC. Sin embargo, al realizar la prueba de hipótesis de la igualdad de medias mediante el análisis de la varianza con un solo factor de variación se obtuvieron diferencias no significativas desde el punto de vista estadístico.

A



B



C

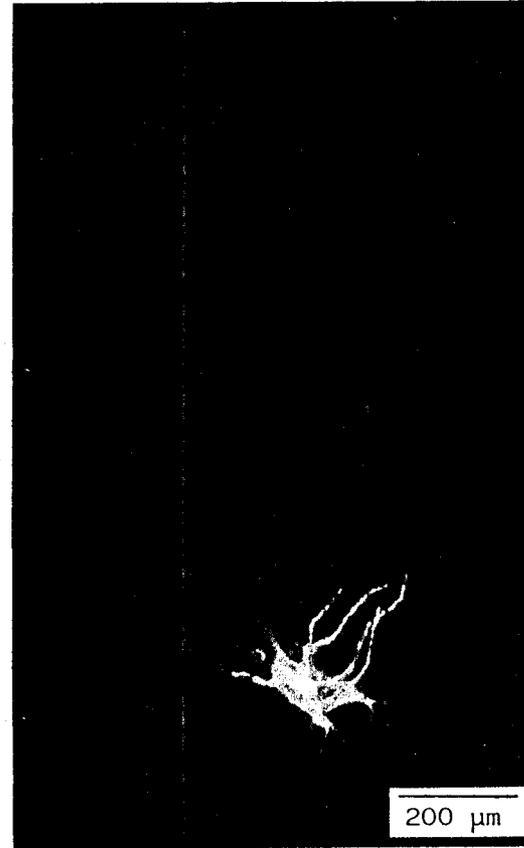


Figura 45. Microfotografía de tres neuronas de la SGC marcadas con amarillo Lucifer. A Neurona bipolar o fusiforme. B Neurona triangular. C Neurona multipolar en la que el soma aparece fuera de foco para mostrar las ramificaciones del árbol dendrítico, algunas de las cuales se extienden paralelamente al acueducto de Silvio.

En la figura 46 se muestra la gráfica de la distribución de frecuencias del diámetro somático. Se observa una clara distribución bimodal en la que el primer grupo de valores se encuentra entre 5 y 17 μm , quedando el segundo, de forma más dispersa entre 17 y 40 μm .

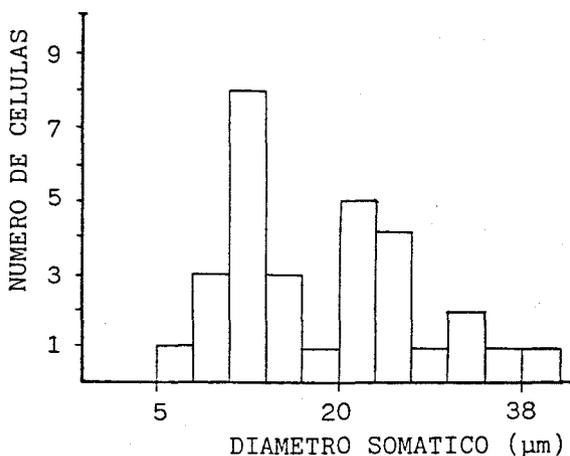


Figura 46. Distribución de frecuencias del diámetro somático en las neuronas de la SGC inyectadas con amarillo Lucifer.

Respecto a los procesos dendríticos de estas neuronas, el diámetro dendrítico máximo oscila entre 170 y 700 μm . La mayoría de las neuronas disponen sus dendritas orientadas hacia el acueducto de forma perpendicular. No obstante, una excepción parecen ser las neuronas bipolares próximas a dicho acueducto cuyas dendritas generalmente se orientan paralelamente al mismo (Figura 47).

Contabilizando el número de dendritas primarias también hallamos una diferencia en función del eje caudo-rostral ya que de 2 a 10 procesos (6 ± 2.4 , $n = 9$) fueron observados en las neuronas caudales, de 3 a 9 (5 ± 2 , $n = 12$) en las medias y de 3 a 8 (4.6 ± 1.6 , $n = 9$) en las rostrales. Tampoco estas diferencias fueron significativas estadísticamente. Las dendritas primarias se ramificaron apreciablemente de forma más profusa en la zona caudal (Figura 47), conservando así el supuesto patrón de arborización a lo largo del eje caudo-rostral.

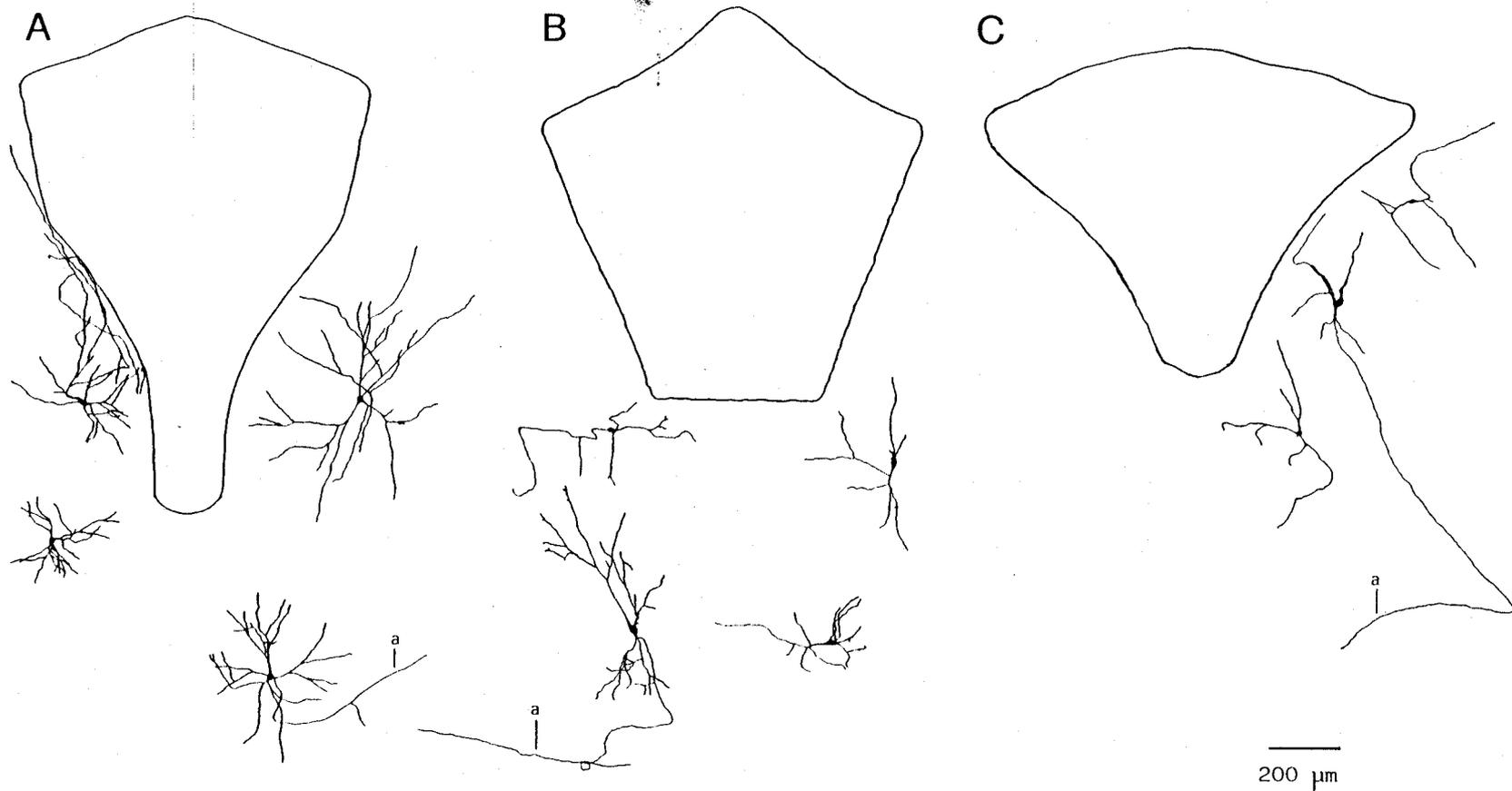


Figura 47. Dibujo de once neuronas de la SGC marcadas con amarillo Lucifer y su localización, respecto al acueducto de Silvio, en tres niveles distintos del eje caudo-rostral. A Zona caudal. B Zona media. C Zona rostral. En algunas neuronas se aprecia claramente el axón (a).

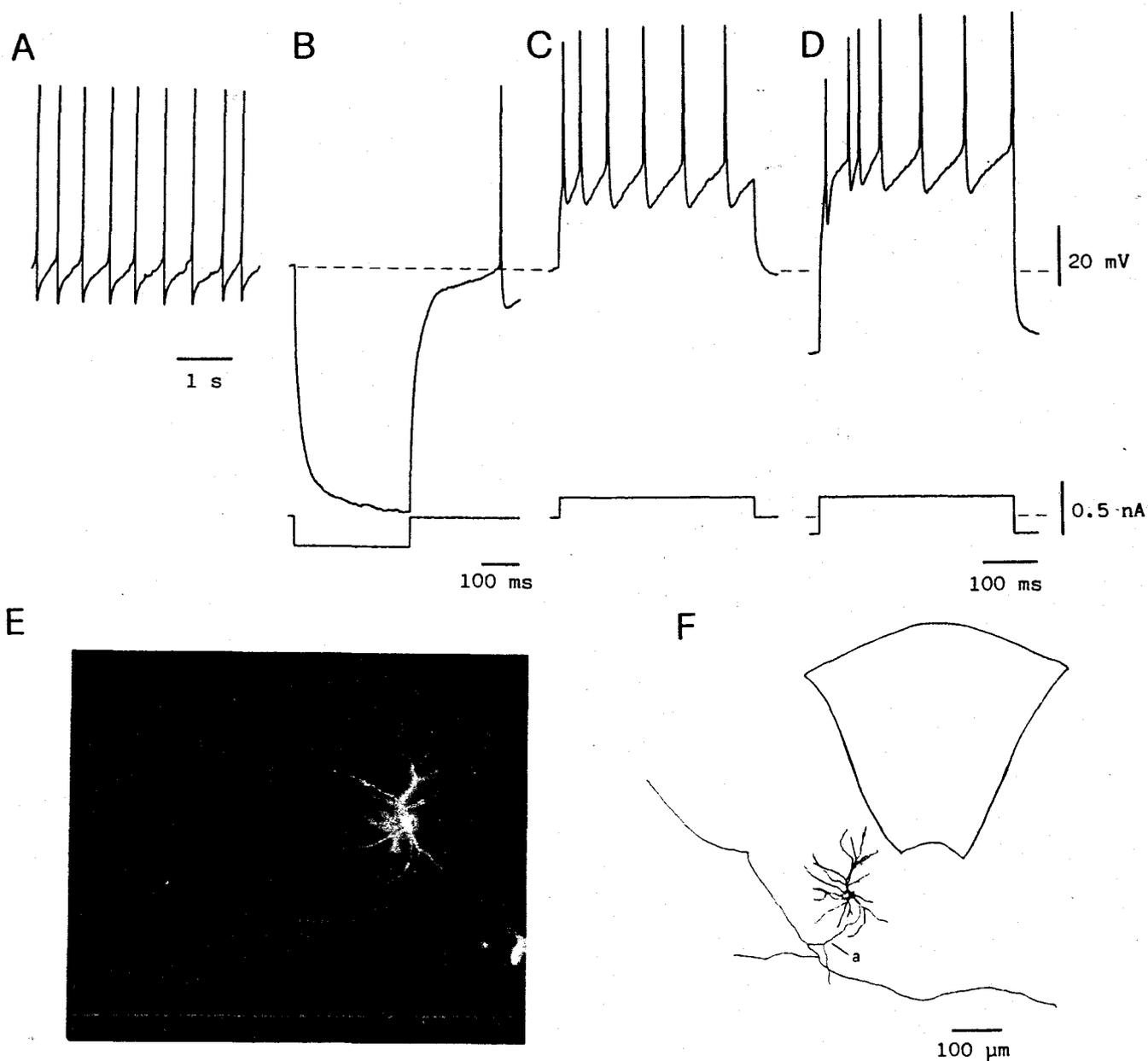


Figura 48. Registro electrofisiológico y marcaje de una neurona de la SGC con amarillo Lucifer. A Dicha célula presenta disparo espontáneo. B Aparece el fenómeno de vuelta lenta a la línea base tras un pulso hiperpolarizante. C El disparo repetitivo producido por un pulso rectangular despolarizante muestra adaptación. En D se aprecia claramente el diferente patrón de disparo al hiperpolarizar la neurona. La línea discontinua indica el PMR y el nivel 0 de corriente. La neurona en la que se realizaron estos registros es la fotografiada en E y dibujada en F. Nótese el axón claramente visible y sus colaterales.

El axón se observó netamente en ocho de las neuronas marcadas en este trabajo, naciendo directamente del soma en el 55.5 % de los casos y emergiendo de una dendrita proximal en el resto. En algunas células se pueden identificar claramente colaterales axónicas (Figura 47, y 48 E y F). En todos los casos los axones, directamente o cruzando la línea media, se dirigen transversalmente a la sustancia reticular vecina, hecho ya descrito por Ramón y Cajal (1911).

A pesar de que con esta técnica es muy difícil hacer registros electrofisiológicos de calidad, debido a la baja conductividad eléctrica de la solución de amarillo Lucifer, los registros de la figura 48 A-D corresponden a la neurona fotografiada y dibujada en E y F, y en ellos se pone de manifiesto que las neuronas inyectadas poseen las características electrofisiológicas expuestas anteriormente. En la tabla V se muestra el sumario de los parámetros morfológicos de las neuronas marcadas con esta técnica.

Tabla V. Parámetros morfológicos. Marcaje con Amarillo Lucifer.

Nº Cel.	Local.	Ø soma (µm)	Forma soma	Nº dendr.1ª	Ø árbol dendr. (µm)
3	C	25	T	5	400
7	C	40	F	8	340
8	C	13	M	9	200
15	C	20	T	4	350
16	C	32.5	M	10	375
17	C	12.5	F	4	450
19	C	15	M	5	250
20	C	11.2	F	2	340
21	C	15	M	7	600
1	M	30	M	9	500
2	M	25	T	3	600
4	M	20	M	6	700
9	M	12.5	T	4	400
10	M	7.5	F	3	250
11	M	17.5	T	8	400
13	M	14	M	7	450
18	M	25	F	5	750
22	M	10	T	3	225
23	M	23	T	4	-
27	M	20	F	5	300
28	M	10	F	3	200
5	R	12.5	T	3	475
12	R	10	F	3	280
14	R	12.5	F	4	170
24	R	15	M	8	350
25	R	12.5	F	3	400
26	R	22.5	M	4	250
29	R	26.2	F	5	190
30	R	30	T	6	175
31	R	12.5	T	6	250

Local.: localización en el eje caudo-rostral; C: caudal, M: medial, R: rostral. Ø soma: diámetro máximo del soma. La forma del soma se clasifica en F: fusiforme o bipolar, T: triangular o M: multipolar. Nº dendr.1ª: número de dendritas primarias o principales. Ø árbol dendr.: diámetro máximo del árbol dendrítico.

2.2. Tinción de Nissl.

La ausencia de diferencias significativas en cuanto al tamaño del soma en las neuronas inyectadas de amarillo Lucifer nos llevó a realizar un análisis morfológico más amplio de la SGC y a contabilizar las neuronas de la zona en la que se llevaron a cabo los registros, agrupándolas según su diámetro.

En la figura 49 A-C se muestra el área, enmarcada en negro, en la que se realizaron los conteos y un detalle de dicho área en los tres niveles considerados en el eje caudo-rostral (E-F). Se contabilizaron un total de 3776 y 1678 neuronas respectivamente. En ambos casos se observó una disminución en la densidad neuronal en el área de registro a lo largo del eje caudo-rostral, siendo la densidad media aproximada en la región caudal de $2.8 \cdot 10^6$ neuronas/mm²; $2.05 \cdot 10^6$ en la media y $1.68 \cdot 10^6$ en la región rostral. La figura 50 muestra las gráficas correspondientes a los resultados de dicho conteo celular. En ambas se relaciona la proporción de neuronas con diámetro $\leq 13 \mu\text{m}$ y $> 13 \mu\text{m}$, en las tres regiones en que hemos dividido longitudinalmente la SGC (caudal, media y rostral). La elección del valor del diámetro somático usado para dividir las neuronas en dos grupos se basa en la distribución de frecuencias de los diámetros de las neuronas marcadas con amarillo Lucifer (ver Discusión).

Estos resultados muestran una disminución progresiva en la proporción de neuronas de más de $13 \mu\text{m}$ de diámetro en el sentido caudal-rostral, así como un incremento de las neuronas pequeñas (diámetro $\leq 13 \mu\text{m}$) en dicho sentido. Las diferencias entre los valores de las proporciones medias en las tres regiones consideradas son estadísticamente significativas ($P < 0.001$, $F = 9.58$, 2 y 51 grados de libertad en el primer cobaya y $P < 0.001$, $F = 28.8$, 2 y 36 grados de libertad en el segundo).

2.3. Método de Golgi.

Los resultados obtenidos con este método corroboran la clasificación de las neuronas de la zona analizada de la SGC, según la forma de su soma, en fusiformes o bipolares, multipolares y triangulares (Figura 51). En todos los casos no se detectaron grandes diferencias cualitativas entre aquellas neuronas que se impregnaron con el método de Golgi-Kopsch (Figura 51 A-C) y con las impregnadas con la variante de del Río Hortega (Figura 51 D y E).

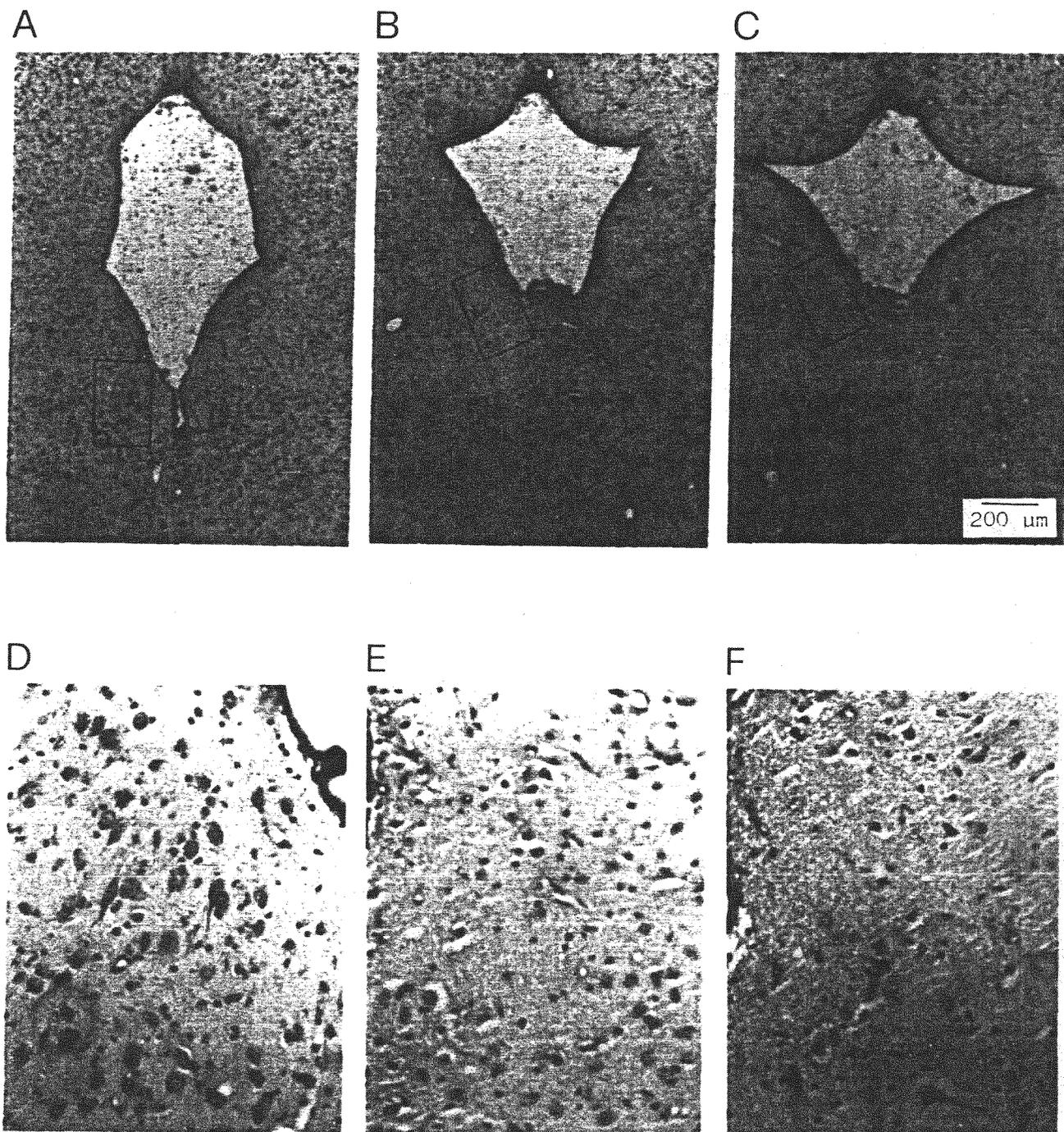


Figura 49. Microfotografías de la SOC teñida con el método de Nissl. Se muestran las secciones a nivel caudal (A), medio (B) y rostral (C). Nótese la forma diferente del acueducto en los tres niveles del eje caudo-rostral. Los rectángulos indican el área en el que se hicieron los conteos celulares. D-F Detalle de dicho área en los tres niveles considerados en los que se observa la decreciente densidad celular en sentido caudo-rostral y la creciente proporción de neuronas de mayor tamaño en sentido rostro-caudal.

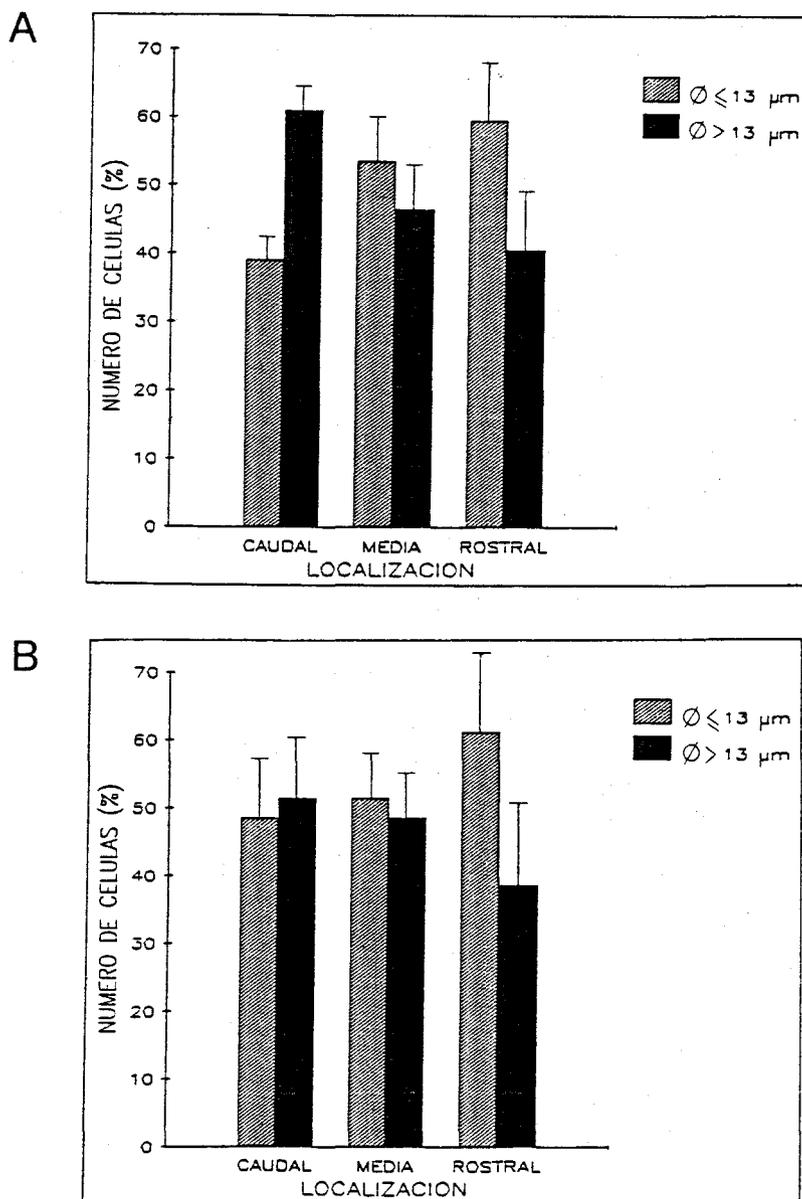


Figura 50. Gráficas en las que se muestra la relación entre la proporción de neuronas de diámetro somático $\leq 13 \mu\text{m}$ y $> 13 \mu\text{m}$ en los tres niveles considerados del eje caudo-rostral en dos cobayas distintos. Media y desviación estándar.

Las neuronas fusiformes se caracterizan por su soma alargado y son, en general, las que poseen un diámetro más pequeño. De ambos polos del soma emergen dos largas dendritas principales que siguen la orientación del eje mayor del soma. Tras una distancia variable ambas dendritas se dividen en finas y largas dendritas secundarias (Figura 51 A y D). Con la metodología utilizada no

son observables los axones mielinizados. No obstante en algunas células se vieron procesos de características axónicas. En ningún caso dichas prolongaciones nacieron del soma, por lo que es probable que el axón emerja de una de las dendritas principales, como señala la flecha en la figura 51 D. Este tipo de neuronas fusiformes es el único de la SGC que, en general, mantiene una orientación paralela al acueducto.

En las neuronas multipolares el soma es redondeado o ligeramente prismático. De él emergen, de forma radial, tres (Figura 51 B) o más (Figura 51 E) dendritas primarias. En aquellos casos en los que una de las dendritas principales es más larga, las otras poseen la apariencia de dendritas basales, siendo mucho más cortas y ramificándose de forma más profusa (Figura 51 B). Las ramas de la dendrita principal más larga suelen ser más finas que las restantes. En casi todos los casos tanto las dendritas primarias como sus ramas se encuentran tachonadas de delicadas espinas (Figura 51 B). En otras ocasiones las espinas son muy escasas o faltan (Figura 51 E).

Las neuronas triangulares, tercer tipo observado en este estudio, muestran una morfología pseudopiramidal (Figura 45 B y 51 C). De cada uno de los ángulos de su soma triangular, o discretamente poligonal, parten las dendritas primarias. De éstas, y de manera constante, una es de mayor longitud y grosor que el resto y, tras un largo recorrido, se divide profusamente en dendritas secundarias y terciarias de gran longitud que generalmente poseen espinas. Las otras dendritas primarias, mucho más finas, finalizan libremente o se dicotomizan a poca distancia de su origen. En este tipo neuronal el axón suele nacer directamente del soma (Figura 47 A y 51 C).

En todos los tipos neuronales aquí descritos se han observado espinas, de manera más o menos regular, a lo largo de su árbol dendrítico. La figura 51 F muestra dichas espinas, en este caso erizando todo el árbol dendrítico de una neurona bipolar. Dos casos merecen especial atención en cuanto a la distribución de dichas estructuras postsinápticas. El primero de ellos se trata de una población de neuronas bipolares en las que las espinas se encuentran sólo en la región distal del árbol dendrítico, mientras que las dendritas primarias son lisas. A esta categoría pertenece la neurona ilustrada, a pequeño aumento, en la figura 51 A. El segundo caso se caracteriza por carecer de espinas en todo su árbol dendrítico, siendo este hecho más frecuente en algunas neuronas fusiformes y en otras multipolares con dendritas primarias de igual longitud.

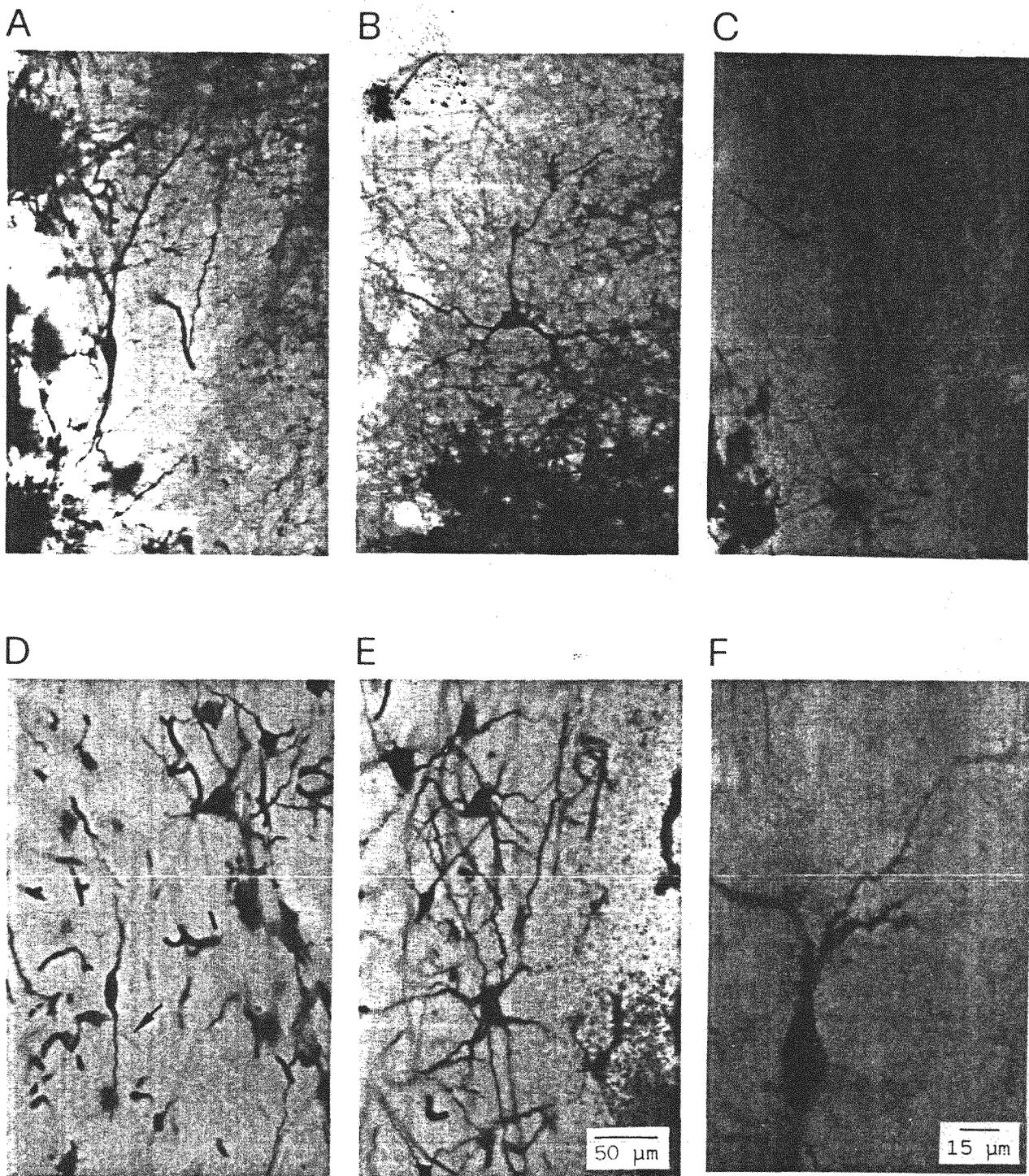


Figura 51. Microfotografías de neuronas impregnadas con el método de Golgi. A Neurona fusiforme o bipolar. B Neurona multipolar. C Neurona triangular. D Neurona bipolar. Se aprecia también una multipolar fuera de foco. La flecha indica el posible axón. E Dos neuronas multipolares. F Una neurona bipolar en la que el árbol dendrítico muestra múltiples espinas. A-C y F Método de Golgi-Kopsch. D y E Método de Golgi-del Río Hortega.

IV. DISCUSION

1. Metodología.

Los resultados descritos anteriormente indican que la metodología utilizada en el presente trabajo es adecuada para el estudio del tratamiento de la información en las neuronas de la SGC ventral.

Las ventajas y desventajas de la técnica de rodajas de tejido cerebral mantenidas *in vitro* han sido ampliamente descritas (Kerkut y Wheal, 1981; Alger y col., 1984). Sin embargo, un punto que puede ser especialmente discutido es la distinta concentración de electrólitos de las soluciones empleadas respecto al líquido cefalorraquídeo. Estas diferencias son especialmente importantes en el caso del K^+ y del Ca^{2+} ya que las concentraciones usadas en este trabajo (5 y 2.4 mM respectivamente) son casi el doble de las fisiológicas (Langmoen y Andersen, 1981).

El uso de estas altas concentraciones se debe, en el caso del K^+ , al intento de mantener unos niveles bajos de la $[Ca^{2+}]_i$ mediante la estimulación de la bomba Na^+-K^+ y del intercambiador Na^+-Ca^{2+} , el cual provoca en último término la extrusión de Ca^{2+} de la neurona (Dekin y Getting, 1987). La elevada $[Ca^{2+}]_E$ se requiere para estabilizar las membranas y mejorar la calidad de la unión membrana-micropipeta (Wong y Prince, 1978). La existencia de una mayor $[K^+]_E$ despolariza el PMR unos 6 mV (Scholfield, 1978) y hace que el gradiente electroquímico para el K^+ disminuya, por lo que es probable que algunas de las conductancias iónicas observadas en estas células se presenten con distinta relevancia en condiciones fisiológicas.

No obstante, estas suposiciones se basan en los valores fisiológicos del líquido cefalorraquídeo y realmente no sabemos cual es la composición del medio extracelular en la SGC. No podemos afirmar, por tanto, que se alteren de forma importante las propiedades electrofisiológicas de las neuronas estudiadas.

La temperatura de la solución con la que se baña a la rodaja (35°C) es algo menor que la fisiológica pero esta pequeña variación favorece la estabilidad de los registros probablemente por una disminución del metabolismo celular (Alger y Nicoll, 1979).

También desde el punto de vista metodológico, el análisis electrotónico puede ser discutido en cuanto a la adopción de un modelo matemático neuronal

concreto. El modelo utilizado en este trabajo (Rall, 1977) asume la válida simplificación de una neurona como un cilindro equivalente unido a un soma esférico isopotencial, y puede describir el comportamiento pasivo de una neurona con cuatro parámetros (ver Metodología). Asume además otras consideraciones referentes a la geometría dendrítica (ley de los tres medios) y la uniformidad de R_m a lo largo de toda la membrana neuronal.

Sin embargo, estas asunciones no tienen porqué ser correctas en todas las neuronas del SNC. Bastantes neuronas parecen no obedecer la ley de los tres medios, por ejemplo las células de Purkinje (Hillman, 1979), las piramidales del neocórtex (Hillman, 1979) y las granulares del hipocampo (Desmond y Levy, 1984). Se han creado recientemente nuevos modelos en los que se tiene en cuenta el afinamiento distal del árbol dendrítico (Rose y Vanner, 1988) y parece que de esta forma se reproduce de forma más fiable el curso temporal de la respuesta de voltaje de la célula ante la inyección de un pulso de corriente. Por otra parte, la presencia de conductancias activas a PMR, o cerca de él; una actividad sináptica tónica y el daño causado por el electrodo pueden originar la no uniformidad de la R_m , como ya se ha estudiado en el hipocampo (Durand y col., 1983), en las motoneuronas espinales (Jansek y Redman, 1973; Rose y Vanner, 1988) y en las células de Purkinje (Shelton, 1985). También se han detectado diferencias en la longitud electrotónica (L) de las dendritas en una misma neurona (Redman y Walmsley, 1983).

El cálculo de τ_0 mediante el análisis del estado transitorio está justificado dado que, según predice el modelo de Rall, existiría un error si consideráramos la existencia de una sola τ . En las neuronas de la SGC registradas en este trabajo, en las que se pudieron determinar τ_0 y τ_1 , el error cometido consistiría en una subestimación del 5.55 %.

En el presente trabajo hemos empleado dos métodos, Johnston y Brown, para hallar los valores de L y de la dominancia dendrítica (ρ) a partir del cálculo de τ_0 , τ_1 , a_0 y a_1 . Los resultados obtenidos en otras neuronas del SNC se han contrastado con los valores predichos por el modelo de Rall (Rose y Dagum, 1988). Se estima que en los modelos de cilindro equivalente con valores de L menores de 1.75 y valores de ρ menores de 4, como ocurre en las neuronas de la SGC, el error cometido en los cálculos de L , basados en la técnica de Johnston, no es mayor al 5 % y ρ puede ser sobrestimada, aunque no más del 30 %. La técnica de Brown es aplicable para valores bajos de L y ρ ($L \leq 0.75$ y $\rho < 4$).

Es evidente que pueden ser muchos los errores que cometamos al reducir la compleja forma y función de las neuronas a un modelo simplificado, al aplicar los métodos de ajuste para el cálculo de las τ y al realizar este estudio, por medio del registro intracelular con micropipetas, en una preparación de rodajas con todas las limitaciones que ésta plantea. No obstante, consideramos necesario el estudio electrotónico de las neuronas de la SGC debido a la importancia de este tipo de información para la comprensión, aunque parcial, de las propiedades integrativas de estas células.

2. Análisis morfológico.

El estudio morfológico se cifó a las neuronas de la zona de la SGC en la que se realizaron los registros electrofisiológicos, debido al interés que supone el intentar establecer correlaciones morfofuncionales en esta estructura.

Las neuronas estudiadas mostraron una importante heterogeneidad en cuanto a la forma de su soma. Mediante la inyección intracelular de amarillo Lucifer encontramos neuronas fusiformes, triangulares y multipolares, tipos que han sido corroborados en nuestras preparaciones realizadas con el método de Golgi. Estas tipologías han sido descritas en la SGC de la rata (Mantyh, 1982; Beitz y Shepard, 1985) y del gato (Ramón y Cajal, 1911). En cuanto a la orientación de estas neuronas, la mayoría se localizan perpendicularmente al acueducto, aunque las células cercanas al mismo se orientan preferentemente de forma paralela a sus paredes. Estos resultados concuerdan con la orientación de estas neuronas en la rata (Beitz, 1985). No obstante, no se han relacionado hasta el momento estos tipos morfológicos con funciones concretas.

Dados los resultados electrofisiológicos obtenidos en este trabajo, un tema importante a discutir desde el punto de vista morfológico es el del tamaño de las neuronas de la zona de la SGC estudiada. De forma general, las neuronas estudiadas con la inyección de amarillo Lucifer poseen un soma cuyo diámetro mide de 10 a 40 μm . Los mismos resultados se obtienen mediante la técnica de Golgi. Estos valores son semejantes a los hallados, con otras técnicas, en la rata, en el gato y en el mono (Mantyh, 1982; Beitz, 1985). Sin embargo, observamos que este parámetro morfológico varía, aunque de forma no significativa desde el punto de vista estadístico, a lo largo del eje caudo-rostral del mesencéfalo.



Para intentar resolver el problema que se plantea a partir de estos últimos resultados, y de las variaciones de algunos parámetros electrotónicos observadas a lo largo de este eje, se llevó a cabo el estudio del tamaño y densidad celular mediante la tinción de Nissl. Hemos seleccionado el valor de 13 μm de diámetro como límite para agrupar a las neuronas en grandes y pequeñas, dado que en la distribución de frecuencias de los valores de este parámetro la primera moda se halla aproximadamente a los 13 μm (ver Resultados). Este estudio reveló que en la zona caudal de la SGC, siempre considerando el área de registro, hay una mayor densidad de células predominando las neuronas grandes. En la parte rostral disminuye la densidad neuronal y hay una mayor proporción de células pequeñas con somas \leq 13 μm .

Este hallazgo coincide con las observaciones de Mantyh (1982) en la SGC completa de la rata, el gato y el mono, aunque este autor sugiere que la tendencia a hallar neuronas pequeñas en la región rostral de la SGC se debe a que el tamaño somático incrementa gradualmente con la distancia al acueducto, y ésta es menor en la parte rostral de la SGC. Beitz no refiere en su trabajo (1985) una diferencia en la media del diámetro del soma en las tres regiones consideradas (caudal, media y rostral); pero analizando la tabla I de este trabajo se aprecia que en la región caudal los valores mínimo y máximo del área neuronal son menor y mayor, respectivamente, que los mismos valores en la región rostral. Esto indica que caudalmente existe una mayor heterogeneidad en la población celular, mientras que la zona rostral es más homogénea y en ella predominan las neuronas de pequeño tamaño.

En cuanto a la densidad celular, nuestros resultados no pueden ser comparados con los de los autores citados dado que ellos consideran la SGC completa.

Un segundo bloque de información en este estudio morfológico es el referente a los procesos neuronales. Tanto el número de dendritas primarias como el diámetro máximo del campo de arborización dendrítica de las neuronas marcadas con amarillo Lucifer son semejantes a los determinados por Mantyh (1982) y Beitz y Shepard (1985). También en cuanto a la orientación del árbol dendrítico están nuestros resultados de acuerdo con los de estos autores, predominando la orientación paralela al acueducto en las neuronas cercanas al mismo y haciéndose perpendicular conforme las células se alejan de dicho acueducto.

Los procesos axónicos de las neuronas inyectadas con amarillo Lucifer parten, casi en igual porcentaje, del soma y de las dendritas primarias coincidiendo con los resultados hallados por Beitz y Shepard (1985). La orientación de estos axones es fundamentalmente lateral dirigiéndose a la sustancia reticular vecina, hecho ya descrito por Ramón y Cajal (1911) y confirmado por Beitz y Shepard (1985).

3. *Propiedades electrotónicas*

El PMR de las neuronas de la SGC registradas en este trabajo tiene un valor bajo (-53.3 mV de media) en comparación con otras estructuras estudiadas con la misma técnica y en la misma especie animal (Llinás y Sugimori, 1980a; Jahnsen y Llinás, 1984a; Yarom y col., 1985; Alvarez de Toledo y López Barneo, 1988). Parece existir un acuerdo tácito entre los neurocientíficos para aceptar como válidos los PMR mayores de -50 mV, pero se han hallado valores medios más bajos (-49.1 mV) en las motoneuronas vagales (Laiwand y col., 1988) y otros autores incluyen en sus trabajos neuronas con PMR menores de -50 mV (Godfraind, 1985; Champagnat y col., 1986). En el presente trabajo observamos bastantes neuronas (35.7 % de la muestra) con valores de PMR por debajo de -50 mV. Hemos aceptado estos valores de PMR dado que dichas células mostraron características electrofisiológicas pasivas y activas semejantes al resto, registros estables hasta de dos horas de duración y no se observaron diferencias en los patrones de disparo repetitivo. Únicamente en el disparo espontáneo se establece, como es lógico, una correlación con el PMR de las neuronas de la muestra. Por otra parte no existen medidas del PMR de estas neuronas *in vivo* con las que comparar nuestros resultados.

¿A que se debe la existencia de esta importante dispersión de valores de PMR en células tan homogéneas en el juego de conductancias iónicas que poseen?. Hay que descartar en primer lugar la existencia de daño por parte de la micropipeta ya que neuronas con la misma R_m y penetradas con micropipetas de resistencia semejante, muestran valores significativamente distintos del PMR. Tampoco parece existir correlación entre la localización de la neurona en el eje caudo-rostral y el PMR. Podemos considerar tres hipótesis para dar cuenta de estos resultados: 1) la existencia de una distinta $[K^+]_E$ en el microambiente celular, a pesar de la constante $[K^+]$ en la solución de perfusión; 2) el posible efecto sináptico de diferentes circuitos neuronales conservados en cada rodaja y

3) la presencia en algunas células de una conductancia despolarizante, que no se inactiva, abierta a PMR (Williams y col., 1984). Estas hipótesis no pueden ser contrastadas de forma adecuada con la metodología usada en este trabajo por lo que quedan abiertas a posterior investigación.

Las neuronas de la SGC de la muestra poseen valores altos de R_N (195.4 M Ω de media) en relación con algunas estructuras del SNC (Jahnsen, 1986a; Dekin y col., 1987; López Barneo y Llinás, 1988) pero semejantes a otras estructuras (Williams y col., 1984), algunas de ellas, como el núcleo dorsal del rafe (Freedman y Aghajanian, 1987), íntimamente relacionadas con la SGC. No obstante, estos valores pueden no corresponderse con los existentes *in vivo* debido a la pérdida en la rodaja de procesos dendríticos y de la mayoría de las entradas sinápticas.

Esta elevada R_N puede ser debida a una alta R_m y a bajos valores del área neuronal. El tamaño del soma y la extensión del árbol dendrítico de las neuronas de la SGC están en el rango de otras neuronas del SNC de los mamíferos registradas y teñidas intracelularmente con la técnica de rodajas (Jahnsen y Llinás, 1984a; Jahnsen, 1986a; Minami y col., 1986a; Crunelli y col., 1987). Sin embargo, los valores de R_N hallados en estas preparaciones son comparativamente menores a los encontrados en la SGC. Por tanto, podría ser importante la contribución de R_m a esta elevada R_N .

Existen diferencias estadísticamente significativas entre la R_N de las células a lo largo del eje caudo-rostral mesencefálico correspondiendo los mayores valores a la zona rostral de la SGC.

Los valores de τ_o obtenidos en la SGC (12.6 ms de media) fueron elevados comparados con los de las motoneuronas espinales (Barrett y Crill, 1974; Rose y Vanner, 1988) o los de las neuronas tectobulboespinales (Grantyn y col., 1983) estudiadas *in vivo*, pero están en el rango de otras neuronas del SNC estudiadas en rodajas (Brown y col., 1981; Williams y col., 1984; Crunelli y col., 1987; Dekin y col., 1987). Lo mismo ocurre con los valores de R_m (media de 12.63 K $\Omega \cdot \text{cm}^2$) debido a la proporcionalidad directa de ésta con τ_o .

Existe también una cierta distribución regional de estos valores, incrementándose en la dirección caudo-rostral.

En cuanto a L y a ρ , las neuronas estudiadas tienen valores medios de L y de ρ de 0.6 y 1.6, respectivamente. Estos valores son semejantes a los obtenidos en neuronas del córtex olfatorio (Constanti y Galvan, 1983), del núcleo geniculado lateral del tálamo (Crunelli y col., 1987) y del hipocampo (Brown y col., 1981) entre otras, pero bastante bajos comparándolos con las motoneuronas espinales (Barrett y Crill, 1974; Rose y Vanner, 1988). El factor de atenuación (H) nos da una estimación de la caída de voltaje a lo largo del cable equivalente, siendo esta reducción tan solo del 15.9 % de la corriente inicialmente inyectada, valor éste bastante bajo en comparación con el hallado en neuronas del hipocampo (Brown y col., 1981) y del núcleo geniculado lateral del tálamo (Crunelli y col., 1987).

No se observa una clara distribución regional de los valores de estos tres parámetros según el eje caudo-rostral del mesencéfalo.

Los valores de ρ deben ser interpretados con cautela ya que, aparte de la dificultad de obtener valores fiables de este parámetro, los diámetros grandes de las dendritas proximales observados en algunas células de la SGC (ver resultados) y la alta R_m de estas neuronas hacen que estas dendritas incrementen la región isopotencial somática. Por tanto, ρ debe ser considerada como la razón entre la conductancia de las dendritas distales y la región isopotencial formada por el soma y las dendritas proximales. El bajo valor de ρ puede indicar que una parte significativa de la conductancia total medida en el soma corresponde a las dendritas proximales.

Nuestros resultados ponen de manifiesto que a lo largo del eje caudo-rostral del mesencéfalo las neuronas de la SGC presentan una creciente R_N , R_m y τ_0 y una leve disminución de L y H . Las variaciones regionales de la R_N podrían estar relacionadas con una moderada disminución del área somática y de la arborización dendrítica, y un incremento en la R_m a lo largo de dicho eje caudo-rostral. No obstante, los resultados morfológicos obtenidos indican que, a pesar del gradiente de tamaño observado en la dirección del eje, la proporción de neuronas de pequeño tamaño en la región caudal del área en estudio es importante. Pueden, por tanto, generarse dos hipótesis: 1) o bien cometemos un error de apreciación del parámetro R_N dado que es más probable penetrar neuronas grandes, de baja R_N teórica, en lugares en los que la proporción de dichas células es mayor, o bien 2) es la R_m la fundamental responsable del gradiente de R_N observado en este trabajo. Puede seguirse el mismo razonamiento

con las pequeñas variaciones regionales de L y H. Dado que los presentes resultados no pueden ser comparados con los de un análisis *in vivo*, no podemos rechazar la influencia de la técnica de rodajas *in vitro* en ellos.

Sin atender a la localización de las neuronas estudiadas en la SGC, parece que estas células presentan en general una gran eficacia en la transmisión de señales sinápticas de baja amplitud debido a la elevada R_N que presentan. La τ_o , moderadamente alta, mejora la eficacia sináptica aumentando la posibilidad de sumación temporal. Los bajos valores de L, H y ρ indican que, a pesar de una extensa arborización dendrítica, estas neuronas son compactas desde el punto de vista electrofisiológico y esto hace que la información sináptica se transmita de forma fiable y rápida al soma.

4. Generación de los potenciales de acción. Propiedades oscilatorias.

Una característica esencial de las neuronas de la SGC ventral estudiadas en este trabajo es su tendencia a oscilar espontáneamente generando potenciales de acción rápidos. El rango de oscilación se sitúa entre 3 y 13 Hz, con una media de 5.6 Hz. Dicha actividad espontánea de baja frecuencia ha sido observada también en la SGC de la rata, tanto anestesiada como despierta, mediante el registro extracelular unitario (Sandner y col., 1986; Heinricher y col., 1987). La existencia de este disparo depende del potencial de reposo de la neurona. Tan solo el 50 % de las células de la muestra disparaban a su PMR; pero si aquellas células cuyo PMR era elevado se despolarizaban hasta alrededor de -50 mV, también se producía el disparo rítmico y regular de potenciales de acción.

El disparo espontáneo pudiera considerarse un artefacto debido al daño ocasionado por la penetración con la micropipeta. Sin embargo, la presencia del disparo antes de penetrar la neurona (Figura 6 A), la no existencia de signos electrofisiológicos de daño celular en las propiedades electrofisiológicas y en las espigas, y la capacidad de disparar regularmente a PMR en cualquier momento de la sesión de registro (la cual duró en ocasiones hasta 3 horas), anulan la posibilidad de un disparo artefactual y nos inclinan a considerar a este disparo como una propiedad intrínseca de las neuronas de la SGC ventral.

Es evidente que la composición de la solución de perfusión, sobre todo en lo concerniente a la $[K^+]$, puede alterar esta actividad espontánea, pero lo que consideramos importante es la posible capacidad de las neuronas de la SGC de

oscilar rítmicamente, con todas las implicaciones funcionales que esto conlleva para esta estructura.

Los potenciales de acción poseen mayor duración que los generados en las neuronas de otras estructuras nerviosas (Williams y col., 1984; Jahnsen, 1986; Hounsgaard y col., 1988) lo cual puede deberse a las menores pendientes de ascenso y descenso de dichas espigas así como a la presencia de una pequeña meseta o giba en la fase de repolarización. Esta meseta ya ha sido observada en otras neuronas del SNC (Llinás y Yarom, 1981a; Williams y col., 1984; Yarom y col., 1985; López Barneo y Llinás, 1988) y SN periférico (Gallego, 1983; Belluzzi y col., 1985).

Al variar el potencial de membrana las espigas cambian su morfología (ver Resultados). Estas modificaciones en las características de los potenciales de acción son las responsables de la variación de la frecuencia del disparo espontáneo dependiente del PMR de las neuronas de la SGC.

Estos potenciales de acción sufren una acomodación de su disparo, como ocurre en las motoneuronas espinales (Schlue y col., 1974; Jodkowsky y col., 1988), dependiendo de la velocidad de la despolarización que lleva a cada espiga a su umbral de disparo. Dicha acomodación parece estar producida por la mayor inactivación de los canales para Na^+ que generan los potenciales de acción cuando la despolarización es lenta.

Este fenómeno también influye en la frecuencia del disparo espontáneo ya que la mencionada inactivación dependerá del curso temporal de la PHP que sigue a cada espiga. La velocidad de la vuelta a la línea base en la PHP origina la modulación de la frecuencia de disparo debido a la variación de la duración de dicha PHP, sumada al efecto del cambio dinámico de la excitabilidad dependiente de la modificación del umbral de disparo.

En el presente trabajo hemos descrito dos tipos de potenciales de acción en las neuronas de la SGC ventral, unas espigas rápidas y otras lentas. Los potenciales de acción rápidos están generados por una conductancia al Na^+ (g_{Na}) dependiente de voltaje, que se inactiva y es bloqueable por TTX. El umbral de disparo de estas espigas es cercano al PMR de estas células. Esta conductancia se encuentra hipotéticamente localizada en la región axosomática y parece ser omnipresente en las neuronas de vertebrados (Llinás, 1988).

Los potenciales de acción lentos, llamados así por su mayor duración y menores pendientes de ascenso y descenso, tienen un umbral (≈ -30 mV) mayor que el de las espigas rápidas. Estos potenciales de acción se producen por la activación de una conductancia al Ca^{2+} ($g_{\text{Ca}_{HT}}$).

Estas espigas parecen estar generadas en el arbol dendrítico (Llinás y Sugimori, 1980a y b; Crill y Schwindt, 1983) en los llamados "puntos calientes", los cuales son zonas donde se concentran los canales para Ca^{2+} dependientes de voltaje. Queda aún por aclarar si estas zonas se encuentran en las bifurcaciones de las dendritas (Llinás, 1975, 1988) o bien en las espinas dendríticas (Hounsgaard y Midtgaard, 1988).

En las neuronas de la SGC estas espigas de Ca^{2+} dendríticas se observan fácilmente mediante el bloqueo de los potenciales de acción rápidos con TTX, y sin necesidad de utilizar bloqueantes de conductancias al K^+ para mejorar el acoplamiento somatodendrítico. Esto indica la importancia de los procesos eléctricos dendríticos en la integración somática, hecho que puede ser favorecido por el caracter electrotónicamente compacto de estas neuronas.

Las corrientes de Ca^{2+} que originan estas espigas se inactivan muy lentamente (Llinás y Yarom, 1981a; Llinás y col., 1984) pero se discute si corresponden a alguno de los tipos de corrientes para Ca^{2+} descritos por Nowycky y col. (1985) y Fox y col. (1987a y b) en las neuronas sensoriales del pollo.

Parece que la repolarización de este tipo de espigas lentas se debe fundamentalmente a la activación de una conductancia al K^+ dependiente de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Llinás y Yarom, 1981b; Yarom y col., 1985). Se han descrito dos tipos de esta conductancia; una de ellas, $g_{\text{K}_{Ca}}(\text{BK})$, es de gran amplitud y se bloquea por TEA y caribdotoxina (Blatz y Magleby, 1984; Miller y col., 1985) y la otra, $g_{\text{K}_{Ca}}(\text{SK})$, es de pequeña amplitud y bloqueable por apamina (Romey y Lazdunski, 1984).

Las espigas de Ca^{2+} de las neuronas de la SGC presentan una fase de descenso de mayor pendiente que la de ascenso, lo que implica que una importante conductancia, probablemente al K^+ , repolariza a dichas espigas y origina una PHP considerable tras ellas. El efecto del Ba^{2+} apoya la idea de que una $g_{\text{K}_{Ca}}$ repolariza a las espigas lentas. El TEA incrementa la amplitud y duración de las espigas lentas y disminuye levemente la pendiente de descenso de éstas (Figura 12 B). Estos cambios pueden deberse al bloqueo de una

conductancia al K^+ dependiente de voltaje (gK_{DR}) y al de la gK_{Ca} (BK), y a la mayor entrada de Ca^{2+} debida a una disminución de la distancia electrotonica entre el soma y las dendritas. Sin embargo, el incremento de duración de la espiga es, a la concentración de TEA utilizada (10 mM), mucho menor que el observado en otras espigas de Ca^{2+} (Llinás y Yarom, 1981b; Yarom y col., 1985); la PHP que sigue a estos potenciales de acción parece no afectarse por el TEA y la poshiperpolarización de larga duración que sigue al pulso se incrementa en su presencia. Esto nos lleva a pensar en un bloqueo parcial del TEA. Por otra parte la apamina, a una concentración de 0.1 μM , reduce la PHP pero no anula el proceso de repolarización de las espigas lentas.

Según los resultados obtenidos en este trabajo no queda claro, aunque no puede descartarse, que una gK_{Ca} (BK) intervenga de forma fundamental en la repolarización de los potenciales de acción lentos. La conductancia al K^+ que se inhibe por apamina tampoco parece ser vital para la repolarización de estas espigas aunque sí parece subyacer a la PHP producida tras ellas. Queda por determinar el tipo de conductancia al K^+ que da lugar a la repolarización de estas espigas y el posible papel de la inactivación de los canales para Ca^{2+} que las generan. Sin embargo debe considerarse la posibilidad de que las concentraciones de las sustancias bloqueantes usadas en este trabajo no sean las adecuadas.

En los potenciales de acción de Ca^{2+} registrados en el soma no se aprecian fluctuaciones, o varios componentes todo o nada, que hagan pensar en su generación discontinua y en múltiples lugares del árbol dendrítico, como ocurre en las células de Purkinje (Llinás y Sugimori, 1980b) y de la oliva inferior (Llinás y Yarom, 1981a). Tampoco es posible generar de forma natural un disparo repetitivo de estas espigas lentas. Ambos fenómenos parecen deberse a un importante periodo refractario ocasionado por la activación de las gK_{Ca} .

Por todo lo anterior, no es de extrañar la importante contribución del disparo dendrítico en los potenciales de acción rápidos generados en el soma de las neuronas de la SGC. La entrada de Ca^{2+} participa tanto en la fase de ascenso, aumentando la amplitud de las espigas, como en la de descenso dando lugar a la meseta o giba mencionada anteriormente. La variabilidad en cuanto a la región del potencial de acción en la que se observa la meseta depende, como es lógico, del lugar de la penetración por la micropipeta así como de la

distribución regional de las conductancias iónicas en la membrana. En las neuronas de la SGC la meseta de Ca^{2+} se produce de forma general en la primera parte de la repolarización de las espigas rápidas, de lo cual se deduce que el origen de la misma está electrotónicamente cercano al soma (Traub y Llinás, 1977).

En los procesos de repolarización de las espigas rápidas participan la inactivación de la g_{Na} y la activación de varias conductancias al K^+ .

La conductancia al K^+ dependiente de voltaje ($g_{K_{DR}}$), muy importante en otras neuronas (Hodgkin y Huxley, 1952; Barrett y col., 1980), puede serlo también en las neuronas de la SGC pero es difícil determinar su papel dado que el TEA, su inhibidor más selectivo (Hille, 1967; Stanfield, 1983), enmascara su bloqueo con un incremento de la $g_{Ca_{HT}}$ y, por consiguiente, de las $g_{K_{Ca}}$. Dentro de éstas, también es complicado probar la presencia de la $g_{K_{Ca}}$ (BK) dado que al añadir TEA, la disminución en la pendiente de descenso es pequeña. El otro tipo de conductancia al K^+ dependiente de Ca^{2+} , $g_{K_{Ca}}$ (SK), bloqueable por apamina y muy sensible a las variaciones en la $[Ca^{2+}]_i$, no parece estar presente en la repolarización de la espiga de las motoneuronas espinales. Son éstas las únicas neuronas del SNC de mamíferos en las que, hasta ahora, se ha probado el efecto bloqueante de la apamina (Zhang y Krnjevic, 1987). Sin embargo, en las neuronas de la SGC parece que esta conductancia puede activarse con la importante entrada de Ca^{2+} durante el potencial de acción somático y participar en la repolarización del mismo.

Tras la repolarización se produce una PHP de considerable amplitud, la cual mostró, en la mayoría de las células, dos fases en su vuelta a la línea base: una rápida de corta duración (FPHP) y otra lenta de menor pendiente y mayor duración (LPHP). Este complejo curso temporal, presente y bien estudiado en otras neuronas (Yoshimura y col., 1986; Storm, 1987), indujo a pensar en la participación de varias conductancias en su generación. Al estudiar la relación semilogarítmica del voltaje con el tiempo se aprecia que la PHP puede ajustarse a dos exponenciales de muy distinta τ lo cual sugiere que al menos dos conductancias están involucradas en su formación.

La existencia de diferencias morfológicas en la PHP según el PMR de la neurona estudiada está de acuerdo con las variaciones que ocurren en dicha PHP al modificar el potencial de membrana. La presencia de más de un componente en

la PHP puede dar lugar a diferencias en la morfología al variar el potencial de membrana (Lancaster y Pennefather, 1987). El aumento artificial de éste produce varias alteraciones en la PHP.

El incremento de duración no puede explicarse por variaciones en las conductancias al K^+ mencionadas hasta ahora, ya que el aumento del potencial de membrana provoca, por un lado, la disminución del gradiente electroquímico para el K^+ , y por otro la menor activación de las conductancias al K^+ dependientes de voltaje y de las dependientes de Ca^{2+} . Parece, por tanto, que la mayor duración de la PHP se produce al disminuir la pendiente de la FPHP lo que hace que se incremente la duración de dicha fase.

La disminución de la pendiente de la FPHP podría explicarse por la desaparición a PMR, y no al incrementar el potencial de membrana, de las conductancias al K^+ que producen la PHP. De las conductancias al K^+ citadas tanto la $g_{K_{DR}}$ como la $g_{K_{Ca}}$ (BK) son muy sensibles al voltaje, disminuyendo la probabilidad de apertura de los canales que la generan con la hiperpolarización (Hodgkin y Huxley, 1952; Adams y col., 1982). Por lo tanto, si desaparecen tras la espiga a PMR también lo harían a niveles más hiperpolarizados, lo cual no explica los resultados obtenidos en este trabajo. Por otra parte, ya vimos en los resultados que la τ_m (constante de tiempo de la FPHP) es menor que la τ_o de la membrana.

Estas dos circunstancias, las alteraciones en la morfología de la PHP con el potencial de membrana provocadas por las variaciones en la pendiente de la FPHP, y el hecho de que τ_m sea menor que τ_o , nos llevan a postular la presencia tras la repolarización de la espiga de una conductancia despolarizante, la cual originaría la FPHP. No hemos observado la existencia en la SGC de conductancias despolarizantes que no se inactivan y que originan despolarizaciones de larga duración en forma de meseta, como se han observado en otras neuronas del SNC (Llinás y Sugimori, 1980a; Jahnsen, 1986a). No obstante, en algunas células de la SGC se detectó una disminución de la R_m a PMR respecto a mayores potenciales de membrana ante la estimulación con pulsos negativos. Estas observaciones también se han hecho en las neuronas del locus coeruleus donde se ha demostrado la presencia de una conductancia al Ca^{2+} tónicamente activa a PMR mediante la técnica de fijación de voltaje (Williams y col., 1984). En la SGC las espigas de Ca^{2+} , en presencia de TTX, tienen una PHP semejante a la de los potenciales de acción rápidos y el efecto de la variación del potencial de membrana es el mismo por lo que la conductancia despolarizante, caso de existir, debe ser al

Ca^{2+} o bien una conductancia al Na^+ no bloqueable por TTX. Otra consideración importante es la ausencia en las neuronas de la SGC de una conductancia al K^+ de rectificación anómala dependiente de tiempo, la cual podría explicar en ciertos casos la despolarización producida tras el pico máximo de la PHP.

La LPHP parece estar relacionada con la activación de una conductancia transitoria rápida al K^+ cuyas características discutiremos más adelante, ya que el curso temporal de la LPHP es semejante al enlentecimiento observado en la vuelta a la línea base tras un pulso negativo. La moderada disminución de la pendiente de la LPHP al aumentar el potencial de membrana puede ser explicada por la disminución del gradiente electroquímico para el K^+ .

La PHP de las neuronas de la SGC se produce por la activación de conductancias al K^+ . El número y tipos de estas conductancias es difícil de determinar con la técnica empleada en el presente trabajo, pero el estudio de las bases iónicas mediante bloqueantes añadidos a la solución de perfusión nos da una idea aproximada de dichas conductancias y, por supuesto, genera nuevas hipótesis para contrastar en el futuro.

El incremento de la FPHP y la disminución de la LPHP producidos por el TEA pudieran ser debidos a la mayor activación de las conductancias al K^+ dependientes de Ca^{2+} , por la facilitación de la entrada de este ión, y al bloqueo de las dependientes de voltaje. El TEA, hasta una concentración 10 mM, no afecta a la conductancia transitoria al K^+ , por lo que la disminución de la LPHP solo puede ser explicada por la favorecida entrada de Ca^{2+} . Tanto el bloqueo de la entrada de Ca^{2+} mediante cationes divalentes como la adición de apamina hicieron disminuir la amplitud de la PHP. Esta disminución general de la amplitud de la PHP se ha observado en las neuronas de los núcleos profundos del cerebelo (Jahnsen, 1986b) y del núcleo supraóptico (Bourque y col., 1985). Sin embargo, en estas preparaciones la participación de las conductancias al K^+ dependientes de Ca^{2+} parecen mediar los procesos lentos de la PHP y, así, se ha descrito que tanto los bloqueantes de los canales para el Ca^{2+} como los específicos de los canales para K^+ dependientes de Ca^{2+} no afectan a la fase rápida de la PHP (Jahnsen y Llinás, 1984b; Yarom y col., 1985; Yoshimura y col., 1986; Zhang y Krnjević, 1987; Hounsgaard y col., 1988).

Proponemos, evidentemente de forma preliminar, que la despolarización y la entrada de Ca^{2+} con cada potencial de acción activan a tres conductancias al K^+ :

Un rectificador retrasado (gK_{DR}), una dependiente de Ca^{2+} y muy sensible al voltaje ($gK_{Ca}(BK)$) y otra, fundamental, bastante sensible al Ca^{2+} ($gK_{Ca}(SK)$). Estas conductancias contribuyen a la repolarización del potencial de acción y generan la fase inicial de la PHP. El ascenso rápido tras esta fase se produce por la desaparición parcial o total de las conductancias anteriores aunque también puede estar implicada una conductancia despolarizante activada parcialmente a PMR o bien una conductancia de bajo umbral al Ca^{2+} activada por la hiperpolarización. Tras esta despolarización, la fase lenta de la PHP se produce por la activación de una conductancia transitoria al K^+ (gK_A), aunque es probable que alguna de las anteriores conductancias al K^+ , sobre todo la $gK_{Ca}(SK)$, puedan seguir parcialmente activas durante esta fase.

La demostración de un enlentecimiento en la vuelta del voltaje a la línea base tras finalizar un pulso negativo nos lleva a proponer la existencia de una conductancia transitoria al K^+ en las neuronas de la SGC, ya que este fenómeno ha sido observado en otras neuronas que han sido estudiadas bajo condiciones de fijación de corriente y de voltaje y se corresponde con la existencia de dicho tipo de conductancia al K^+ (Williams y col., 1984; Aghajanian, 1985; Yarom y col., 1985; Dekin y Getting, 1987). Todas las características eléctricas de esta conductancia (voltaje y tiempo necesarios para la recuperación de la inactivación, tiempo de inactivación y umbral de activación) descritas en las neuronas de la SGC, poseen valores semejantes a otras conductancias transitorias estudiadas en rodajas de cobaya (Yarom y col., 1985; Dekin y Getting, 1987; Alvarez de Toledo y López Barneo, 1988).

El estudio de las bases iónicas reveló que este fenómeno está producido por una salida de K^+ del interior de la célula, y que la activación de esta conductancia es además, de alguna forma, dependiente de la entrada de Ca^{2+} y no bloqueable por 4-AP. Esta cierta dependencia del Ca^{2+} ha sido descrita en otras preparaciones de SNC (Brown y col., 1982; McDermott y Weight, 1982; Junge, 1985; Storm, 1986), así como la ineffectividad de la 4-AP para bloquear dicha corriente (Brown y col., 1982; Zbicz y Weight, 1985; Alvarez de Toledo y López Barneo, 1988). Dada la enorme diversidad y ubicuidad de los canales para K^+ dependientes de Ca^{2+} (Rudy, 1988; Llinás, 1988), algunos autores han sugerido que este tipo de conductancia transitoria puede representar una forma especial de gK_{Ca} , probablemente del tipo BK, que se pone en marcha al aumentar de forma transitoria la $[Ca^{2+}]_i$, debido posiblemente a la activación de una gCa tras la

hiperpolarización de la célula (Brown y col., 1982; Alvarez de Toledo y López Barneo, 1988).

Los resultados descritos respecto a la conductancia que origina el enlentecimiento en la vuelta a la línea base tras una hiperpolarización, necesitan de una confirmación mediante el estudio de las neuronas de la SGC con la técnica de fijación de voltaje. Pero de ser ciertos, harían ingresar a esta conductancia en el creciente catálogo (Rudy, 1988) de conductancias transitorias que se apartan de las típicas, y hasta ahora mayoritarias, corrientes transitorias de K^+ (I_A) inicialmente descritas en invertebrados y halladas posteriormente en otras estructuras del SNC de mamíferos.

Las funciones atribuidas a este tipo de conductancias transitorias se relacionan primeramente con sus efectos de incremento de los intervalos interespiga (Connor y Stevens, 1971) lo cual conlleva una regulación del disparo repetido (Storm, 1986), tanto del espontáneo como del producido por una despolarización sináptica o artificial. En segundo lugar puede intervenir en la generación de un fenómeno de despolarización retrasada (Getting, 1983; Yarom y col., 1985; López Barneo y Llinás, 1988) debido al aumento en la latencia de disparo de la primera espiga generada por un pulso inyectado sobre un nivel de hiperpolarización constante. Por último, en algunas preparaciones parece que este tipo de conductancias participa en la repolarización del potencial de acción (MacDermot y Weight, 1982).

En la SGC esta conductancia parece que participa en las dos primeras funciones citadas anteriormente. Dado el PMR de las neuronas de la SGC y el umbral de activación de la conductancia transitoria al K^+ no parece posible que ésta pueda intervenir en la repolarización de los potenciales de acción. Como veremos posteriormente, la presencia de la conductancia transitoria produce en determinadas condiciones un fenómeno totalmente distinto en el patrón de disparo repetitivo.

Tras el enlentecimiento producido por la activación de la conductancia transitoria se observa que la mayoría de las neuronas de la SGC generan una despolarización de rebote producida por la entrada de Ca^{2+} probablemente por canales para el Ca^{2+} dependientes de voltaje. Una despolarización de este tipo se ha descrito fundamentalmente en neuronas con propiedades oscilatorias (Llinás y Yarom, 1981; Llinás, 1988); de aquí la importancia de esta conductancia para la capacidad de oscilación que presentan las neuronas de la SGC.

La importancia de este rebote depende de la presencia del fenómeno de enlentecimiento en la vuelta a la línea base antes comentado. La coincidencia de ambas conductancias ha sido descrita en otras estructuras del SNC (Jahnsen y Llinás, 1984a; Alvarez de Toledo y López Barneo, 1988) y juega un importante papel en la modulación de la duración del intervalo interespiga y del disparo espontáneo de la célula. Cabe, por otro lado, la posibilidad de que esta conductancia participe en la despolarización producida tras el pico máximo de la PHP y que origina la fase rápida de ésta.

Tras la discusión de todas las bases iónicas de los potenciales de acción de las neuronas de la SGC, estamos en condiciones de resumir el posible proceso de generación de la oscilación de estas células. En la figura 52 se muestra una representación esquemática de este comportamiento oscilatorio. La variación estable del potencial de membrana, artificial o sinápticamente, produce cambios en la morfología de la espiga así como en la PHP, lo cual permite a la neurona una adecuada modulación de la frecuencia de disparo manteniendo sus propiedades oscilatorias. La entrada de Ca^{2+} durante el potencial de acción y la activación de una o más conductancias al K^+ dependientes de la $[Ca^{2+}]_i$ influyen decisivamente en la oscilación de las neuronas de la SGC. Por tanto, la modulación del disparo dendrítico, dada la importante capacidad de regulación por neurotransmisores y segundos mensajeros de las conductancias al K^+ dependientes de Ca^{2+} (Rudy, 1988), condiciona el disparo espontáneo somático. Esto parece confirmar el papel preponderante de las dendritas en la generación de la oscilación rítmica de estas células, como ocurre en otras estructuras del SNC (Wong y Prince, 1978; Llinás y Sugimori, 1980b; Llinás y Yarom, 1981b).

Además de la capacidad oscilatoria de las neuronas de la SGC, queda por estudiar la posibilidad de que estas células se comporten como "resonadores", esto es, que respondan de forma preferencial a entradas oscilatorias sinápticas o eléctricas de una determinada frecuencia o rango de frecuencias. Para dicho estudio necesitamos inyectar pulsos triangulares de corriente y analizar la excitabilidad de la neurona a determinadas frecuencias de estimulación. Sin embargo, ciertas características electrofisiológicas halladas en estas neuronas como son: las variaciones de la frecuencia del disparo repetitivo debido a los cambios en la morfología del potencial de acción y de su PHP al variar el PMR; la existencia de una acomodación del umbral de disparo, dependiendo de la dI/dt del estímulo, y de una gK transitoria que condicionan la frecuencia de disparo;

la aparente generación de las espigas de Ca^{2+} en lugares únicos y electrotonicamente cercanos al soma y, por último, el importante periodo refractario que sigue a estas espigas y que imposibilita un disparo dendrítico repetitivo, hacen pensar en la existencia de frecuencias resonantes en estas células.

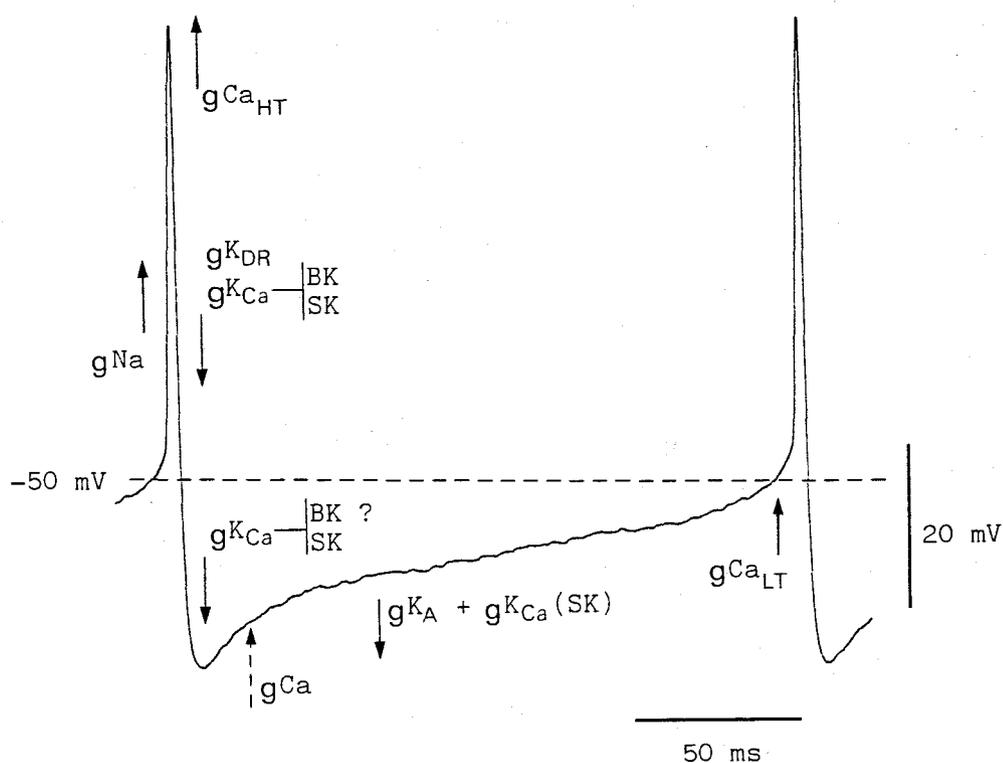


Figura 52. Representación esquemática de los mecanismos que participan en la generación de la oscilación de las neuronas de la SGC. La espiga inicial se debe fundamentalmente a la activación de una conductancia al Na^+ (g_{Na}), participando también una conductancia de alto umbral al Ca^{2+} ($g_{\text{Ca}_{\text{HT}}}$). En la repolarización de la espiga participan una serie de conductancias al K^+ dependientes del voltaje ($g_{\text{K}_{\text{DR}}}$) y del Ca^{2+} ($g_{\text{K}_{\text{Ca}}}$, de dos tipos: BK y SK). En la poshiperpolarización que sigue a la espiga parece fundamental la participación de la $g_{\text{K}_{\text{Ca}}}$ del tipo SK, aunque no puede descartarse la participación de la del tipo BK. En la vuelta a la línea base proponemos la existencia de una conductancia al Ca^{2+} (flecha discontinua). Por otra parte, la hiperpolarización deinactiva a una $g_{\text{K}_{\text{A}}}$, de tipo transitorio, que junto a la $g_{\text{K}_{\text{Ca}}}$ (SK), que sigue activada, incrementa la duración de la PHP. Tras la inactivación de las g_{K} anteriores, un rebote producido por una conductancia al Ca^{2+} de bajo umbral ($g_{\text{Ca}_{\text{LT}}}$) produce una despolarización que lleva el potencial de membrana al umbral de un nuevo potencial de acción.

5. Patrones de disparo repetitivo.

Una vez analizada la oscilación espontánea de las neuronas de la SGC y sus bases iónicas, pasamos a discutir un segundo aspecto en el procesamiento neuronal de la información que es el estudio de la respuesta en frecuencia de la célula ante un estímulo sináptico supraumbral. Hemos utilizado la inyección de pulsos de corriente cuadrados y en rampa dada la dificultad de controlar y medir las corrientes sinápticas. No obstante, los resultados del análisis de la relación entrada-salida en las motoneuronas espinales parecen ser equivalentes si se emplea la estimulación sináptica natural o la inyección artificial de corriente (Granit y col., 1966).

Un primer punto de discusión es el hallazgo de diferencias en la respuesta en frecuencia, dependiendo de la R_N de la neurona. No existe un valor límite de R_N para este cambio en las propiedades de disparo pero podemos considerar que las neuronas que poseen un alto valor de este parámetro tienden a presentar una adaptación del disparo repetitivo, disminuyendo la frecuencia a lo largo del pulso de corriente inyectado hasta alcanzar un estado estacionario. Una menor R_N conlleva una ausencia, más o menos patente, de este fenómeno de adaptación.

La descripción semicuantitativa de las relaciones entrada-salida pone de manifiesto más claramente estas diferencias. La pendiente, o ganancia, de las gráficas $f-I$, es significativamente mayor en las neuronas con mayor R_N y dichas curvas presentan una menor linealidad. Una correlación semejante entre la R_N y la ganancia de la gráfica $f-I$ ha sido observada en las motoneuronas espinales del gato (Kernell, 1966) y de la rata (Fulton y Walton, 1986).

La citada tendencia a la saturación en la frecuencia de disparo nos indujo a analizar las relaciones $f-I$ para determinados intervalos interespiga y las relaciones $f-t$. En las primeras se observa que la diferencia entre las neuronas con distinta R_N se basa fundamentalmente en los primeros intervalos interespiga dado que la frecuencia instantánea de éstos es significativamente mayor en las neuronas con alta R_N . Además dicha frecuencia parece llegar a la saturación con pulsos de gran amplitud. Sin embargo, la frecuencia instantánea en el estado estacionario crece muy lentamente, de forma lineal con la corriente inyectada, y alcanza valores semejantes en las neuronas estudiadas, independientemente de la R_N .

En las gráficas $f-t$ se observan las diferencias en cuanto a la adaptación

en estos dos tipos de neuronas establecidos en la SGC. En las neuronas de alta R_N es el disparo del comienzo del pulso el que hace aumentar la frecuencia total y el que determina la saturación de la frecuencia ante la inyección de corrientes despolarizantes crecientes.

La ausencia de dos o más rangos de disparo en las curvas $f-I$ de las neuronas de la SGC pudiera deberse a una insuficiente inyección de corriente. No obstante creemos que las amplitudes de corriente utilizadas en este trabajo son razonables dada la gran R_N de estas células y el uso de micropipetas de gran resistencia.

La relación entre la frecuencia de disparo y la razón de cambio de la corriente inyectada presenta también diferencias entre los dos tipos celulares estudiados. Hemos observado que las neuronas que presentan adaptación son, por lo general, sensibles tanto a la amplitud de la corriente como a la dI/dt , cosa que ocurre por ejemplo en las motoneuronas espinales (Baldissera y col., 1982) y en las neuronas del córtex somatosensorial del gato (Stafstrom y col., 1984). Aquellas neuronas en las que la adaptación fue leve o ausente parecen responder fundamentalmente a la amplitud y no a la dI/dt , como sucede en las motoneuronas frénicas del gato (Jodkowski y col., 1988).

El fenómeno de la adaptación ha sido observado en muchas neuronas del SNC (Bradley y Somjen, 1961; Stafstrom y col., 1984; Yarom y col., 1985; Gueritaud, 1988; Hounsgaard y col., 1988) y el mecanismo propuesto para su generación es la activación paulatina a lo largo del pulso de una gK_{Ca} .

En las neuronas de la SGC con mayor R_N y con adaptación la pendiente de ascenso de los potenciales de acción muestra una mayor caída a lo largo del pulso. Así mismo ocurre un mayor incremento en la duración de las espigas debido al incremento de la meseta. Esto conduce a pensar que una inactivación progresiva de la gNa , sumada a la mayor entrada de Ca^{2+} con los potenciales de acción a lo largo del pulso son los responsables de la adaptación del disparo repetitivo.

El estudio de las bases iónicas del disparo repetido puede dar luz acerca de los mecanismos que generan la adaptación. El efecto del TEA, aumentando la amplitud de las PHP y haciendo desaparecer moderadamente la adaptación (Figura 35) parece apuntar a una participación fundamental de las gK_{Ca} en ella. El

efecto de la apamina sobre el disparo y su adaptación es similar a los resultados hallados en las motoneuronas espinales del gato (Zhang y Krnjević, 1987) y la tortuga (Hounsgaard y col., 1988), salvo que en estas preparaciones no se observa el fracaso del disparo al final del pulso.

Todo lo anterior está a favor de un papel fisiológico fundamental del Ca^{2+} y de las conductancias al K^+ activadas por él en la aparición de la adaptación. Queda por establecer de forma definitiva, dados los curiosos resultados obtenidos con el bloqueo por TEA, la presencia e importancia de la gK_{Ca} (BK) y de la gK_{DR} en la PHP de las espigas del disparo repetitivo.

En la mayoría de los estudios en los que se ha probado el papel de la entrada de Ca^{2+} en la neurona durante el disparo repetitivo, se ha obtenido un incremento en la frecuencia de disparo y una paralela reducción de la adaptación al bloquear la entrada de Ca^{2+} o disminuir la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{E}}$ (Jahnsen y Llinás, 1984a; Madison y Nicoll, 1984; Bourque y col., 1985; López Barneo y Llinás, 1988). En otros casos se produce la desaparición del disparo repetitivo quedando un brote de espigas al comienzo del pulso (Barrett y Barrett, 1976), y en otras neuronas se ha encontrado que los cambios de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{I}}$ provocan brotes de espigas y disparo espontáneo de espigas rápidas (Grace y Bunney, 1984a y b).

En las neuronas de la SGC el bloqueo de la entrada de Ca^{2+} y la retirada del Ca^{2+} de la solución de perfusión de forma transitoria, reemplazándolo por Co^{2+} , produjeron la incapacidad de mantener un disparo repetitivo duradero. Algo semejante se ha visto en las neuronas del septum dorsolateral (Alvarez de Toledo y López Barneo, 1985), del estriado (Galarraga y col., 1989) y de las motoneuronas espinales de la tortuga (Hounsgaard y col., 1988). No obstante, si se aumenta artificialmente el potencial de membrana o bien si el PMR es elevado, respecto a la media, puede generarse un disparo repetitivo, aunque algo distinto al normal, en presencia de una solución sin Ca^{2+} .

También en relación con la entrada de Ca^{2+} hemos hallado la existencia de una poshiperpolarización de larga duración tras un pulso despolarizante supraumbral que está relacionada con la progresiva entrada de Ca^{2+} con cada potencial de acción del pulso. En la duración de esta PHPL puede influir, además de las gK_{Ca} discutidas anteriormente, la conductancia transitoria al K^+ que parece ser también dependiente de Ca^{2+} .

En otras estructuras del SNC (Hotson y Prince, 1980; Bourque y col., 1985; Yarom y col., 1985; Llinás y López Barneo, 1988) se ha hallado esta PHPL con una

gran variabilidad en cuanto al curso temporal y a su amplitud y duración; pero en todas ellas se demuestra la participación del Ca^{2+} activando a gK_{Ca} de características cinéticas diversas. El efecto general de la activación de estas gK_{Ca} durante un tren de espigas es, en cualquier caso, la puesta en marcha de un periodo refractario tras el cese del disparo repetitivo. Sin embargo, de acuerdo con las características particulares de esta conductancia en cada preparación, se ha involucrado a la misma en la producción de un disparo en forma de brote (Llinás y Yarom, 1981b; Bourque y col., 1985; Yarom y col., 1985) así como en la generación de una adaptación a largo plazo en el colículo superior (Llinás y López Barneo, 1988) relacionada con el proceso de habituación sensorial.

El segundo punto de discusión, quizás el más sobresaliente en relación con la generación del disparo repetitivo, trata de la variación del patrón de disparo según el potencial de membrana de la neurona.

En un gran número de estructuras del SNC de los mamíferos se han observado cambios en el disparo repetitivo al variar el potencial de membrana de la célula. En las neuronas talámicas (Jahnsen y Llinás, 1984a), en las de la sustancia negra (Llinás y col., 1984) y en las neuronas del septum intermedio (Alvarez de Toledo y López Barneo, 1988) se ha descrito una descarga tónica de espigas rápidas con una variable adaptación a PMR y una respuesta fásica, generada por una conductancia al Ca^{2+} de bajo umbral, a niveles hiperpolarizados de potencial de membrana. En numerosas estructuras del sistema nervioso de invertebrados (Byrne, 1980; Getting, 1983) y de vertebrados mamíferos: motoneuronas del núcleo del vago (Yarom y col., 1985), neuronas del núcleo del tracto solitario de la rata (Champagnat y col., 1986) y del cobaya (Dekin y Getting, 1984; Dekin y col., 1987), neuronas del colículo superior (López Barneo y Llinás, 1988), árbol dendrítico de las neuronas de Purkinje del cerebelo de la tortuga (Hounsgaard y Midtgaard, 1988), neuronas del hipocampo (Segal y col., 1984) y neuronas del neocórtex (Bargas y col., 1989), se ha descrito un fenómeno, denominado por algunos autores despolarización retrasada, consistente en la aparición de un periodo de latencia antes del disparo repetitivo al estimular la neurona desde potenciales de membrana que varían de -60 a -90 mV, según la preparación. En todos estos casos se ha involucrado en este fenómeno la presencia de una conductancia transitoria al K^+ , en algunos casos probada con la técnica de fijación de voltaje (Segal y col., 1984; Yarom y col., 1985; Dekin y

col., 1987), cuya activación originaría el enlentecimiento inicial del disparo. El efecto de esta conductancia sobre el disparo repetitivo ha sido discutido ampliamente por uno de sus descubridores (Connor, 1982, 1985). Un último ejemplo de disparo diferencial según el potencial de membrana lo constituyen las neuronas de los núcleos profundos del cerebelo, las cuales muestran un disparo tónico con una leve adaptación a PMR, pero la estimulación desde potenciales de membrana más hiperpolarizados provoca una aceleración inicial del disparo seguida de una descarga tónica con una clara adaptación. Curiosamente en estas células no han sido descritas ni una conductancia transitoria al K^+ ni una conductancia al Ca^{2+} de bajo umbral (Jahnsen, 1986a).

Los resultados del presente trabajo demuestran que las neuronas de la SGC ventral poseen dos patrones de disparo dependiendo del potencial de membrana. Este cambio en el disparo rítmico consiste en que, a potenciales de membrana aproximadamente entre -40 y -60 mV, la neurona presenta un disparo tónico que muestra una mayor o menor adaptación dependiendo de la R_M . Cuando la estimulación parte de potenciales de membrana entre -60 y -80 mV, puede apreciarse un brote de espigas seguido de un disparo tónico o bien una aceleración del disparo en la región inicial del pulso que hace más evidente la adaptación.

Este brote o aceleración del disparo surge sobre un periodo en el que, con pulsos despolarizantes de menor amplitud, se aprecia el fenómeno de despolarización retrasada anteriormente comentado. Hemos probado, aunque no mediante técnicas de fijación de voltaje, la existencia en las neuronas de la SGC de una posible conductancia transitoria al K^+ (ver Resultados).

El análisis de las relaciones entre la frecuencia instantánea, la corriente y el tiempo en las neuronas de la SGC (Figuras 29 y 30) demuestra que, en condiciones hiperpolarizantes, la variación en el disparo se presenta al comienzo del pulso y cuando la amplitud de la corriente sobrepasa un cierto valor umbral. Tras este periodo inicial de unos 150 a 200 ms, la frecuencia instantánea baja drásticamente y llega a un estado estacionario. Es de notar la importante diferencia entre las gráficas tridimensionales mostradas en dichas figuras, que representan las relaciones $f-I-t$ a dos potenciales de membrana.

La mayoría de las neuronas de la muestra, independientemente de su R_M , presentaron este doble patrón de disparo de acuerdo con el potencial de membrana. No obstante, existe una diferencia entre los dos tipos de neuronas en

relación con la consistencia del fenómeno que estamos discutiendo. Cuando estimulamos con pulsos largos (1 a 2 s), la relación entre la frecuencia media (impulsos/s) y la corriente inyectada revela una diferencia fundamental entre neuronas con distinta R_N . En neuronas con alta R_N y que suelen presentar adaptación, la ganancia del sistema (pendiente de la recta de regresión $f-D$) es, lógicamente, menor a potenciales de membrana mayores. Sin embargo, se produce un incremento en la excitabilidad de la neurona expresado como un desplazamiento del punto de intersección de la recta con el eje de abscisas en la gráfica $f-I$. Por el contrario, en neuronas con baja R_N y que no presentan una clara adaptación, no existen diferencias entre las pendientes de las rectas de regresión $f-I$ a dos diferentes potenciales de membrana. La contribución a la frecuencia media ante estimulaciones de larga duración del patrón de disparo que aparece en condiciones hiperpolarizantes depende, por tanto, de las características de la neurona en cuanto a su R_N y a la adaptación de su disparo.

A pesar de que en las neuronas de la SGC y en todas las citadas anteriormente coinciden la aparición de una despolarización retrasada con la existencia de una conductancia transitoria al K^+ , parece difícil establecer relaciones causa-efecto entre la activación de dicha conductancia transitoria y la generación del patrón de disparo diferencial que hemos analizado anteriormente. Esto se debe, en parte, a la no correspondencia con los resultados obtenidos en otras estructuras nerviosas en los que la conductancia transitoria tiende a favorecer la aparición de un disparo tónico y nunca a producir brotes o aceleraciones del disparo y, de otra parte, a las limitaciones de la técnica usada para determinar la distribución regional de las conductancias en las neuronas estudiadas y la participación secuencial de dichas conductancias en la generación del disparo repetitivo.

No obstante, debido a una serie de consideraciones que a continuación se citan, articulamos una hipótesis de trabajo que intenta explicar los resultados obtenidos. La aparición del retraso en el disparo repetitivo de las neuronas de la SGC coincide con el periodo en el que está activa la conductancia transitoria, y la máxima duración de dicha latencia es semejante al tiempo medio que permanece activa dicha conductancia (100 a 200 ms). En este periodo de latencia se produce el brote o aceleración del disparo repetitivo.

En algunas preparaciones (López Barneo y Llinás, 1988; Champagnat y col., 1986) un pulso despolarizante de suficiente amplitud provoca la aparición de un

potencial de acción sobre el pico de inflexión que refleja la activación de la conductancia transitoria al K^+ . Esta espiga también aparece en las neuronas de la SGC y presenta una menor amplitud y duración que las del resto del pulso. Los potenciales de acción que componen el brote poseen una muy diferente morfología respecto a los que constituyen el disparo del resto del pulso ya que tanto la amplitud como la duración son menores correspondiendo a la ausencia del componente de Ca^{2+} que describimos en estas células. También aumenta la amplitud de la PHP de dichas espigas, lo que se corresponde con lo esperado en un periodo en que está saliendo K^+ de la célula. Las especiales características de los potenciales de acción del brote favorecen el disparo a alta frecuencia si conseguimos alcanzar el umbral de activación de estas espigas rápidas.

Hemos probado que durante el periodo de latencia, o de activación de la conductancia transitoria, existe un incremento en la excitabilidad ante la estimulación con un pulso despolarizante de pequeña duración. También hemos comprobado que si atenúamos el efecto que tiene la activación de la conductancia transitoria al K^+ sobre la fase de subida del pulso, desaparecen las diferencias entre las espigas generadas durante el periodo de latencia y las del resto del pulso.

Recientemente se ha sugerido que las conductancias transitorias podrían tener un origen dendrítico (Chan y col., 1988; Hounsgaard y Midtgaard, 1988).

Tomando en consideración lo anterior además de las restantes propiedades electrofisiológicas y conductancias iónicas descritas en la SGC proponemos la siguiente hipótesis para explicar el doble patrón de disparo observado en las neuronas de la SGC ventral:

El disparo repetitivo que se produce cuando la neurona se estimula desde potenciales de membrana entre -40 y -60 mV (potencial de reposo en la mayoría de las células estudiadas) se debe a la activación de la conductancia al Na^+ (g_{Na}) que se encuentra parcialmente inactivada a estos potenciales de membrana. Esto genera los primeros potenciales de acción del pulso cuya repolarización se debe a la inactivación rápida de la g_{Na} y a la posible activación de una $g_{K_{DR}}$. Tras estas espigas iniciales, las despolarizaciones sucesivas producidas por ellas hacen que entre Ca^{2+} en las dendritas de la neurona y así se generan espigas de mayor duración. La amplitud de estas espigas, que tendería a disminuir por inactivación de la g_{Na} , se mantiene por la entrada de Ca^{2+} . En la repolarización de estas espigas también intervienen una $g_{K_{C}}$ bloqueable por

apamina y, posiblemente, otra bloqueable por TEA. Las PHP de estas espigas es de mayor amplitud y duración debido a la activación de las gK_{Ca} y de una gK transitoria. Todo esto conlleva la aparición del fenómeno de la adaptación. En las neuronas que no muestran adaptación la participación del Ca^{2+} y de las gK_{Ca} ocurre desde el comienzo del pulso.

Cuando se hiperpolariza a una neurona hasta, o su PMR es de, -70 a -90 mV y se le despolariza con un pulso rectangular se activa la gK transitoria y se produce un retraso en la aparición de potenciales de acción. Tras este retraso se produce el disparo repetitivo con o sin adaptación. Como base para la explicación que damos a continuación acerca del cambio en el disparo repetitivo, proponemos que la gK transitoria se localiza en el árbol dendrítico interpuesta entre el lugar de origen de los potenciales de acción somáticos y el de las espigas de Ca^{2+} dendríticas. De este modo, si se incrementa la amplitud del pulso, la corriente inyectada puede hacer que se alcance el umbral para el disparo axosomático sin producirse la activación de la gCa dendrítica debido al desacoplamiento somatodendrítico producido por la gK transitoria. Teniendo en cuenta la recuperación de la inactivación de la gNa provocada por la hiperpolarización, puede producirse un brote de potenciales de acción rápidos en este periodo. Tras la inactivación de la gK transitoria se produce la despolarización dendrítica y aparece el componente de Ca^{2+} en las espigas y la activación de las gK_{Ca} en las PHP. La existencia de un rebote de Ca^{2+} , tal vez producido por la activación de una gCa somática, podría participar en el incremento del disparo que sucede tras el periodo de activación de la gK transitoria. En la figura 53 se representa un esquema de la posible localización de las distintas conductancias iónicas presentes en las neuronas de la SGC.

6. Propiedades integrativas de las neuronas de la SGC.

Los resultados expuestos y discutidos en este trabajo constituyen una descripción fenomenológica de las propiedades electrotónicas, de los mecanismos que generan la oscilación y de los patrones de disparo de las neuronas de la región ventral de la SGC. Así mismo, dan una aproximación cualitativa de las conductancias iónicas que subyacen a las anteriores propiedades electrofisiológicas. A pesar de las limitaciones impuestas por las condiciones experimentales y la técnica empleada, es posible extraer una valiosa información acerca de las propiedades integrativas de estas neuronas.

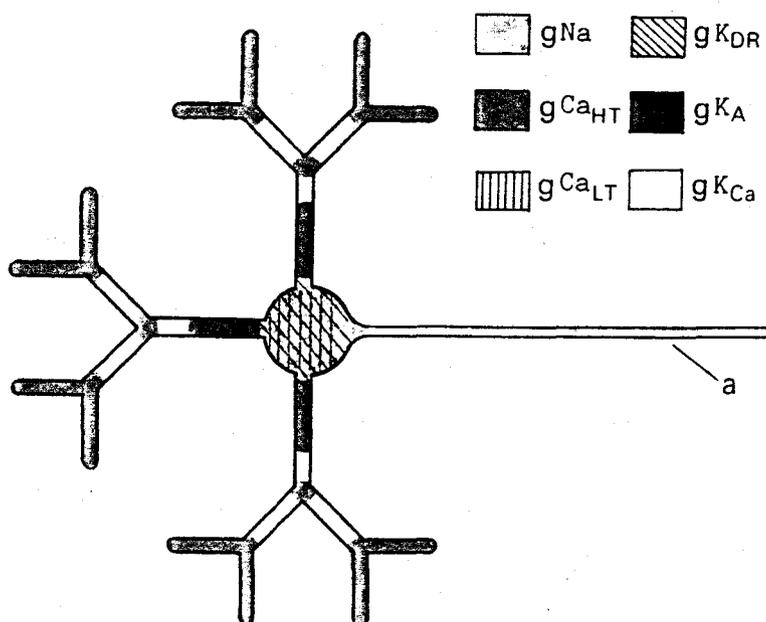


Figura 53. Sumario de las conductancias iónicas encontradas en las neuronas de la SGC y su probable distribución espacial en un dibujo esquemático de una de dichas neuronas. La g_{Na} se localiza en el axón (a) y en el soma de la neurona, aunque puede estar presente en la parte proximal del árbol dendrítico. $g_{Ca_{HT}}$ se halla en la zona distal de las dendritas pudiendo estar tanto en las espinas como en las bifurcaciones dendríticas. $g_{Ca_{LT}}$ parece situarse a nivel somático. $g_{K_{DR}}$ se sitúa en el soma y parte proximal del árbol dendrítico. g_{K_A} se encuentra situada entre la zona de generación de las espigas dendríticas y el soma. Las $g_{K_{Ca}}$ parecen situarse en las zonas medias y distales del árbol dendrítico.

Las células estudiadas parecen tener en común un conjunto definido de conductancias iónicas a pesar de las diferencias existentes entre ellas en cuanto a su morfología y a algunas características electrofisiológicas. Estas conductancias parecen estar distribuidas de forma no homogénea en la membrana de cada neurona.

Las propiedades pasivas analizadas indican que estas neuronas son sumamente compactas desde el punto de vista electrotónico. Este hecho, unido a la posibilidad de amplificación de las entradas sinápticas dada la existencia de conductancias activas en las dendritas, favorece la eficacia de la transmisión sináptica dendrítica y hace a estas neuronas exquisitamente sensibles incluso a pequeños cambios de la conductancia sináptica. A pesar del carácter compacto de estas neuronas, que pudiera implicar un cierto determinismo en el procesamiento de la información, la naturaleza excitable de las dendritas y la distribución heterogénea de las conductancias activas presentes en dichas células permiten la

producción de complejas interacciones dinámicas espacio-temporales.

Una de las propiedades intrínsecas más importantes halladas en las neuronas de la SGC es la capacidad de estas células de generar un disparo espontáneo de potenciales de acción. Esta actividad tónica convierte a la SGC ventral, y a los circuitos neurales en los que participa, en un sistema de elevada ganancia con amplias posibilidades de modulación sináptica. Es interesante resaltar que, en estas neuronas, la presencia de potenciales de acción de Ca^{2+} probablemente generados en las dendritas juega un papel crucial en esta oscilación. Otro fenómeno importante apuntado en este trabajo es el de la resonancia, es decir, la posibilidad de que estas neuronas respondan preferencialmente a señales de entrada de determinadas frecuencias. La oscilación y la resonancia condicionan el estado funcional de las neuronas que poseen estas propiedades. Debido a esto, se han propuesto diversos papeles funcionales, los cuales dependen de la estructura nerviosa considerada (Llinás, 1988).

La existencia del fenómeno del doble patrón de disparo dependiendo del potencial de membrana es una muestra de la compleja interacción espacio-temporal a la que antes nos referíamos, ya que la amplitud, duración y pendiente de ascenso del cambio de potencial originado en la neurona por la entrada sináptica, además del potencial de membrana, condicionan la salida final.

Otro curioso hallazgo es la aparente distribución regional a lo largo del eje longitudinal mesencefálico de varias propiedades eléctricas de estas neuronas. Asumiendo los errores que podemos cometer al generalizar, las neuronas de la zona caudal de la SGC pueden presentar una mayor heterogeneidad en el tamaño de sus somas y de sus campos dendríticos, en ciertas propiedades electrotónicas y en la sensibilidad del disparo a la corriente inyectada y a los cambios del potencial de membrana. Es posible, por tanto, que dicha región caudal organice en conjunto una salida más compleja y diversa.

7. Implicaciones funcionales.

Debido a la ausencia de una correlación clara entre las regiones en las que se ha dividido la SGC y las variadas funciones en las que esta estructura participa, resulta difícil deducir implicaciones funcionales de los resultados de este trabajo. No obstante, la región ventral parece participar fundamentalmente en los mecanismos endógenos de control del dolor (ver Introducción). Por otra

parte, el hecho de que sea la zona caudal de la región ventral la más estrechamente relacionada por algunos autores con los mecanismos de analgesia hace interesante el considerar nuestro hallazgo acerca de la distribución longitudinal de ciertos parámetros morfológicos y eléctricos como punto de partida para investigación en otros campos de la neurociencia. La capacidad de oscilar de las neuronas de la región ventral podría explicar la supuesta actividad tónica inhibitoria, en último extremo, sobre las neuronas del asta dorsal medular. Así mismo la existencia del doble patrón de disparo puede dar cuenta de los dos tipos de respuesta ("on" y "off") halladas en las neuronas de la SGC ante la estimulación dolorosa (Heinricher y col., 1987).

En la actualidad estamos estudiando el efecto de algunos agonistas opiáceos sobre las propiedades eléctricas de las neuronas de la región ventral de la SGC y, de forma preliminar, hemos hallado que dichos compuestos hiperpolarizan estas células de forma significativa. Esto apunta a que las neuronas que hemos estudiado en el presente trabajo pueden estar relacionadas con la función analgésica de la SGC.

Mucho queda por hacer para llegar a comprender el procesamiento de la información en los circuitos neuronales de los que forma parte la SGC. Nuestros próximos objetivos son el estudio de los procesos de transmisión sináptica mediante la estimulación eléctrica y la aplicación de neurotransmisores relacionados con la función analgésica, así como la aproximación cuantitativa, mediante técnicas de fijación de voltaje, a las corrientes iónicas que en último extremo originan las propiedades electrofisiológicas que hemos tratado en este estudio.

Finalmente, retomamos la proposición que hacíamos al comienzo de este trabajo sobre la organización y función globales de la SGC. El carácter reduccionista del trabajo realizado impide, en cierto modo, la adecuada contrastación de la hipótesis formulada sobre la consideración de la SGC como un único sistema distribuido. Los resultados obtenidos no responden a esta cuestión pero nos animan a seguir proponiendo dicha hipótesis como guía de nuestro trabajo futuro.

V. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1) En el presente trabajo se han estudiado las propiedades electrofisiológicas de las neuronas de la región ventral de la SGC mediante el registro intracelular en rodajas de mesencéfalo de cobaya mantenidas *in vitro*.

2) Estas células presentan un potencial de membrana de reposo (PMR) de -53.3 ± 8.7 mV (media \pm desviación estándar, $n = 42$), una τ_0 de 12.6 ± 4.5 ms y una R_N de 195.4 ± 104.9 M Ω . Los dos últimos parámetros pasivos parecen distribuirse a lo largo del eje longitudinal mesencefálico existiendo un incremento gradual en sentido caudo-rostral. Los valores obtenidos, mediante el análisis del estado transitorio, del resto de los parámetros pasivos (τ_1 , R_m , L , ρ y H) indican que las neuronas estudiadas son muy compactas desde el punto de vista electrotónico. Parece existir una tendencia a la agrupación espacial en el citado eje de las neuronas con una mayor R_N , R_m y τ_0 y con una menor L y H .

3) A pesar de la homogeneidad de las neuronas de la SGC en cuanto al conjunto de conductancias iónicas que poseen, estas células presentan una morfología muy variable al estudiarlas mediante la inyección microiontoforética de colorantes fluorescentes y la impregnación con el método de Golgi. En general estas neuronas presentan somas de moderado tamaño y de morfología fusiforme, triangular o multipolar, y árboles dendríticos muy extensos. Esto sugiere que la elevada R_N pueda deberse a una elevada R_m .

4) La aparente distribución según el eje caudo-rostral mesencefálico de algunos parámetros eléctricos pasivos y activos nos llevó a estudiar, de forma preliminar, la existencia de una distribución de las neuronas de la zona de la SGC explorada en este trabajo a lo largo del citado eje en función del tamaño de su soma. Hallamos que en la región caudal hay una mayor densidad de neuronas, predominando los somas grandes de más de 13 μ m de diámetro, mientras que la proporción de neuronas pequeñas (soma \leq 13 μ m) es mayor en la zona rostral. No obstante estos resultados no explican de forma definitiva la distribución de las propiedades electrofisiológicas antes citada, por lo que queda por determinar si son las diferencias morfológicas las que subyacen a dicha distribución o bien son diferencias intrínsecas de la membrana de las neuronas según la zona de la SGC.

5) Las neuronas de la región ventral de la SGC oscilan rítmicamente, generando potenciales de acción rápidos, a potenciales de membrana cercanos a -50 mV. Esta oscilación es de baja frecuencia (5.6 ± 2.9 Hz, $n = 21$). Los resultados obtenidos apuntan a la existencia de frecuencias resonantes en estas células.

6) Los potenciales de acción rápidos tienen una amplitud de 55.2 ± 4.8 mV y una duración de 2.8 ± 0.6 ms y presentan en la fase de descenso una pequeña meseta. Estas espigas presentan una acomodación de su disparo según la velocidad con que el potencial de membrana llega al umbral de disparo. La morfología de los potenciales de acción cambia al variar el potencial de membrana.

7) Las espigas rápidas se producen por una g_{Na} que se inactiva y es bloqueable por TTX. Una g_{Ca} de alto umbral ($g_{Ca_{HT}}$), probablemente de origen dendrítico, también participa en la generación de estas espigas y es la responsable de la meseta de la fase de descenso. En la repolarización de estos potenciales de acción parece que participan tres g_K , una es dependiente de voltaje y bloqueable por TEA ($g_{K_{DR}}$) y las dos restantes son dependientes de la $[Ca^{2+}]_i$, siendo una bloqueada por TEA ($g_{K_{Ca}}$ (BK)) y la otra por apamina ($g_{K_{Ca}}$ (SK)). La poshiperpolarización (PHP) que sigue a cada espiga muestra un diferente curso temporal dependiendo del potencial de membrana, correspondiendo una forma bifásica a un potencial de membrana de -50 mV. Al menos dos conductancias iónicas participan en esta PHP, una es la $g_{K_{Ca}}$ (SK), que pudiera estar activada todo el tiempo que dura dicha PHP, y la otra es una g_K transitoria (g_{K_A}) que necesita de una hiperpolarización previa a la despolarización que la activa. Hipotetizamos la existencia de una g_{Ca} , que se encuentra activa de forma permanente a PMR cercanos a -50 mV, y que generaría la fase rápida de la vuelta del potencial de membrana a la línea base en la PHP.

8) En presencia de TTX, las neuronas de la SGC generan unos potenciales de acción lentos, posiblemente dendríticos, de una amplitud de 29.4 ± 2 mV ($n = 7$) y de 5.7 ± 1.3 ms de duración. El umbral de disparo de estas espigas se encuentra a 25 ± 7.1 mV por encima del PMR. Estos potenciales de acción carecen de fluctuaciones que hagan pensar en un origen múltiple en el árbol dendrítico y son incapaces de disparar de forma repetitiva. A pesar de su origen

dendrítico, estas espigas condicionan de forma importante el disparo espontáneo de las neuronas de la SGC debido al carácter electrotónicamente compacto de estas células.

9) Las espigas lentas se generan por una gCa_{HT} , participando en su repolarización, y en la poshiperpolarización que se produce tras ella, las gK_{Ca} (BK) y (SK). La presencia de estas conductancias evita el disparo repetitivo dendrítico.

10) Las neuronas de la SGC muestran, ante la estimulación con pulsos rectangulares de corriente hiperpolarizante, una vuelta lenta a la línea base que parece estar producida por una gK_A , cuya activación es dependiente del potencial al que se llega con el pulso negativo y de la duración de dicho pulso. Esta gK_A no parece bloquearse por 4-AP, pero si parecen afectarle los cationes divalentes como el Co^{2+} y el Cd^{2+} , por lo que su activación podría ser dependiente de la entrada de Ca^{2+} a la célula.

11) Tras un pulso hiperpolarizante, y de forma variable según la intensidad del fenómeno de vuelta lenta a la línea base antes comentado, se genera en las neuronas de la SGC una despolarización de rebote generada por una gCa de bajo umbral (gCa_{LT}). Este rebote puede contribuir a la oscilación de estas células llevando al potencial de membrana al umbral de disparo tras la poshiperpolarización que sigue a cada espiga.

12) La estimulación a PMR de las neuronas de la SGC con pulsos rectangulares de larga duración genera un disparo repetitivo de espigas rápidas que no fracasa a lo largo del pulso. Hallamos dos formas de disparo repetitivo cuya diferencia es la presencia, en una de ellas, de una adaptación a la corriente inyectada. Las neuronas que presentan esta adaptación son, en general, de alta R_N , mientras que las de baja R_N presentan un disparo tónico sin adaptación. Las neuronas con adaptación tienen una mayor ganancia en la relación $f-I$ y presentan una cierta saturación de la frecuencia con pulsos de gran amplitud. La adaptación se basa en una importante caída de la pendiente de ascenso de la espiga y en un aumento de su duración, debido al incremento en la meseta de Ca^{2+} , a lo largo del pulso. También hemos observado que las neuronas que presentan adaptación responden tanto a la amplitud de la corriente como a

la velocidad de la inyección de dicha corriente, mientras que las que no presentan adaptación parecen no responder a la dI/dt .

13) La ausencia de Ca^{2+} en el medio de perfusión hace fracasar el disparo repetitivo. Parece que la entrada a la célula de dicho ión con la despolarización es fundamental para la generación de un disparo repetido tanto por su contribución a los potenciales de acción como el importante papel que juegan las gK_{Ca} en la repolarización de dichas espigas. La adaptación del disparo a la que antes nos referíamos puede estar debida a la paulatina entrada de Ca^{2+} , y a la consiguiente activación de las gK_{Ca} , que sucede a lo largo del pulso.

14) Tras el tren de espigas que se genera con un pulso aparece una poshiperpolarización de larga duración que genera un periodo refractario a la oscilación de estas células. El curso temporal de esta poshiperpolarización se compone, generalmente, de dos fases, originadas por distintas conductancias al K^+ . Participan fundamentalmente las gK_{Ca} . La fase lenta que se observa al final de esta poshiperpolarización parece ser debida a la activación de la gK_A .

15) En la mayoría de las neuronas de la SGC estudiadas en este trabajo aparece un doble patrón de disparo repetitivo dependiendo del potencial de membrana desde el que se estimula la neurona. Independientemente de la existencia de adaptación, a niveles hiperpolarizados del potencial de membrana (-60 a -90 mV), se produce con pulsos rectangulares de gran amplitud un brote de espigas rápidas seguido de un disparo tónico, o bien una aceleración del disparo en la parte inicial del pulso. Las espigas que se producen en este periodo son de menor amplitud y duración y falta en ellas el componente de Ca^{2+} . Este fenómeno ocurre en la zona en que se activa la gK_A , y hemos observado que puede existir un aumento en la excitabilidad en este periodo.

16) Proponemos como hipótesis que la gK_A se distribuye fundamentalmente en el árbol dendrítico entre el lugar de origen de los potenciales de acción rápidos somáticos y las espigas lentas de Ca^{2+} dendríticas. En esta situación esta conductancia desacopla, cuando se activa, el soma de las dendritas y puede favorecer, si la estimulación es de una amplitud adecuada, el disparo somático de alta frecuencia. Cuando se encuentra inactivada, a potenciales de membrana de

CONCLUSIONES

-40 a -60 mV, la participación del Ca^{2+} dendrítico impide un disparo de alta frecuencia.

VI. BIBLIOGRAFIA



Abercrombie, M.: Estimation of nuclear population from microtome sections. *Anat. Rec.*, 94: 239-247, 1946.

Adams, F.R., Brown, D.A. y Constanti, A.: M-currents and other currents in bullfrog sympathetic neurons. *J. Physiol.*, 330: 537-572, 1982.

Aghajanian, G.K.: Modulation of a transient outward current in the serotonergic neurons by α -1 adrenoceptors. *Nature*, 315: 501-503, 1985.

Akil, H. y Liebeskind, J.C.: Monoaminergic mechanisms of stimulation produced analgesia. *Brain Res.*, 94: 279-296, 1975.

Alger, B.E., Dhanjal, S.S., Dingledine, R., Garthwait, J., Henderson, G., King, J.L., Lipton, P., North, A., Schwartzkroin, P.A., Sears, T.A., Segal, M., Whittingham, T.S. y Williams, J.: Brain slice methods. Págs. 381-437 en *Brain slices*. Dingledine, R. (ed). Plenum Press. Nueva York. 1984.

Alger, B.E. y Nicoll, R.A.: GABA-mediated biphasic inhibitory responses in hippocampus. *Nature*, 281: 315-317, 1979.

Altman, J. y Bayer, S.A.: Development of the brain stem: V. Thymidine-radiography study of the time of origin of neurons in the midbrain tegmentum. *J. Comp. Neurol.*, 198: 677-716, 1981.

Alvarez de Toledo, G. y López Barneo, J.: Intracellular recordings from guinea-pig septal neurons *in vitro*. *Neurosci. Lett. Suppl.* 22: S539, 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.

Armstrong, C.M. y Binstock, L.: Anomalous rectification in the squid giant axon injected with tetraethylammonium chloride. *J. Gen. Physiol.*, 48: 859-872, 1965.

Armstrong, C.M. y López Barneo, J.: External calcium ions are required for potassium channel gating in squid neurons. *Science*, 236: 712-714, 1987.

Armstrong, C.M., Swenson, R.P. y Taylor, S.R.: Block of squid axon K^+ channels by internally and externally applied barium ions. *J. Gen. Physiol.*, 80: 663-682, 1982

Baker, P.F., Hodgkin, A.L. y Ridgway, E.G.: Depolarization and calcium entry in squid giant axons. *J. Physiol.*, 218: 709-755, 1971.

Baldissera, F., Campadelli, P. y Piccinelli, L.: Neural encoding of input transients investigated by intracellular injection of ramp currents in cat α -motoneurons. *J. Physiol.*, 328: 73-86, 1982.

Bandler, R., McCulloch, T. y Dreher, B.: Afferents to a midbrain periaqueductal grey region involved in the "defence reaction" in the cat as revealed by Horseradish Peroxidase. I. The telencephalon. *Brain Res.*, 330: 109-119, 1985a.

Bandler, R., Prineas, S. y McCulloch, T.: Further localization of midbrain neurones mediating the defence reaction in the cat by microinjections of excitatory amino acids. *Neuroscience Letters*, 56: 311-316, 1985b.

- Bargas, J., Galarraga, E., y Aceves, J.: An early outward conductance modulate the firing latency and frequency of neostriatal neurons of the rat brain. *Exp. Brain Res.*, 75: 146-156, 1989.
- Barrett, E.F. y Barrett, J.N.: Separation of two voltage-sensitive potassium currents and demonstration of a tetrodotoxin-resistant calcium current in frog motoneurons. *J. Physiol.*, 255: 737-774, 1976.
- Barrett, E.F., Barrett, J.N. y Crill, W.E.: Voltage-sensitive outward currents in cat motoneurons. *J. Physiol.*, 304:251-276, 1980.
- Barrett, J.N. y Crill, W.E.: Specific membrane properties of motoneurons. *J. Physiol.*, 239: 301-324, 1974.
- Basbaum, A.I. y Fields, H.L.: Endogenous pain control systems: Brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. *Ann. Rev. Neurosci.* 7: 309-338, 1984.
- Beitz, A.J.: The organization of afferent projections to the midbrain periaqueductal gray of the rat. *Neuroscience*, 7: 133-159, 1982.
- Beitz, A.J.: The midbrain periaqueductal gray in the rat. I. Nuclear volume, cell number, density, orientation, and regional subdivisions. *J. Comp. Neurol.*, 237: 445-459, 1985.
- Beitz, A.J., Buggy, J., Terracio, L. y Wells, W.E.: Autoradiographic localization of opiate, beta-adrenergic, cholinergic and GABA receptors in the midbrain periaqueductal gray. *Soc. Neurosci. Abst.* 8: 265, 1982.
- Beitz, A.J., Shepard, R.D.: The midbrain periaqueductal gray in the rat. II. A Golgi analysis. *J. Comp. Neurol.*, 237: 460-475, 1985.
- Beitz, A.J., Shepard, R.D. y Wells, W.E.: The periaqueductal gray-raphe magnus projection contains somatostatin, neurotensin and serotonin but not cholecystokinin. *Brain Res.* 261: 132-137, 1983.
- Belin, M.F., Aguera, M., Tappaz, M., McRae-Degueurce, A., Bobillier, P. y Pujol, J.F.: GABA-accumulating neurons in the nucleus raphe dorsalis and periaqueductal grey in the rat: a biochemical and radioautographic study. *Brain Res.*, 170: 279-298, 1979.
- Belluzzi, O. Sacchi, O. y Wanke, E.: A fast transient outward current in the rat sympathetic neurone studied under voltage-clamp conditions. *J. Physiol.*, 358: 91-108, 1985.
- Berman, A.L.: The brainstem of the cat. A cytoarchitectonic atlas with stereotaxic coordinates. The University of Wisconsin Press, Madison. 1968.
- Besson, J.M. y Chaouch, A.: Peripheral and spinal mechanisms of nociception. *Physiol. Rev.*, 67: 67-186, 1987.
- Bezanilla, F.: A high capacity data recording device based on a digital audio processor and a video cassette recorder. *Biophys. J.*, 47: 437-441, 1985.
- Blankenship, J.E.: Tetrodotoxin: from poison to powerful tool. *Perspectives in biology and medicine*, 19: 509-526, 1976.

- 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.
- Bourque, C.W., Randle, J.C.R. y Renaud, L.P.: Calcium-dependent potassium conductance in rat supraoptic nucleus neurosecretory neurons. *J. Neurophysiol.*, 54: 1375-1382, 1985.
- Bradley, K. y Somjen, G.G.: Accommodation in motoneurons of the rat and the cat. *J. Physiol.*, 156: 75-92, 1961.
- Brown, D.A., Constanti, A. y Adams, P.R.: Calcium-dependence of component transient outward current in bullfrog ganglion cells. *Neurosci. Abstr.*, 8: 252, 1982.
- Brown, T.H., Fricke, R.A. y Perkel, D.H.: Passive electrical constants in three classes of hippocampal neurons. *J. Neurophysiol.*, 46: 812-827, 1981.
- Byrne, J.H.: Analysis of ionic conductance mechanisms in motor cells mediating inking behavior in *Aplysia californica*. *J. Neurophysiol.*, 43: 630-650, 1980.
- Carrive, P., Dampney, R. y Bandler, R.: Excitation of neurones in a restricted portion of the midbrain periaqueductal gray elicits both behavioural and cardiovascular components of the defence reaction in the unanaesthetised decerebrate cat. *Neurosci. Lett.*, 81: 273-278, 1987.
- Carstens, E.: Inhibition of spinal dorsal horn neuronal responses to noxious skin heating by medial hypothalamic stimulation in the cat. *J. Neurophysiol.*, 48: 808-822, 1982.
- Carstens, E., MacKinnon, J.D. y Guinan M.J.: Inhibition of spinal dorsal horn neuronal responses to noxious skin heating by medial preoptic and septal stimulation in the cat. *J. Neurophysiol.*, 48: 981-991, 1982.
- Castaldi, L.: Studi sulca struttrae sullo sviluppo del mesencefalo. *Arch. Ital. Anat. e Embriol.*, Firenze, 20: 23-226, 1923.
- Cazala, P. y Schmitt, P.: Dorso-ventral variation in the attenuating effect of lateral hypothalamic stimulation on the switch-off response elicited from the mesencephalic central gray area. *Physiol. Behav.*, 40: 625-629, 1987.
- Champagnat, J., Jacquin, T. y Richter, D.W.: Voltage-dependent currents in neurones of the nuclei of the solitary tract of rat brainstem slices. *Pflügers Arch.*, 406: 372-379, 1986.
- Chan, C.Y., Hounsgaard, J. y Nicholson, C.: Effects of electric fields on transmembrane potential and excitability of turtle cerebellar Purkinje cells *in vitro*. *J. Physiol.*, 402: 751-771, 1988.
- Clements, J.R., Beitz, A.J., Fletcher, T.F. y Mullett, M.A.: Immunocytochemical localization of serotonin in the rat periaqueductal gray: A quantitative light and electron microscopic study. *J. Comp. Neurol.*, 236: 60-70, 1985.
- Clements, J.R., Madl, J.E., Johnson, R.L., Larson, A.A. y Beitz, A.J.: Localization of glutamate, glutaminase, aspartate and aspartate aminotransferase in the rat midbrain periaqueductal gray. *Exp. Brain Res.*, 67: 594-602, 1987.

- Connor, J.A.: Mechanisms of pacemaker discharge in invertebrate neurons. En Cellular pacemakers. Carpenter, D.O. (ed). J. Wiley & Sons. Nueva York. 1982.
- Connor, J.A.: Neural pacemakers and rhythmicity. Ann. Rev. Physiol., 47: 17-28, 1985.
- Connor, J.A. y Stevens, C.F.: Voltage clamp studies of a transient outward membrane current in gastropod neural somata. J. Physiol., 213: 21-30, 1971.
- Constanti, A. y Galvan, M.: Fast inward-rectifying current accounts for anomalous rectification in olfactory cortex neurones. J. Physiol., 335: 153-178, 1983.
- Conti, F., Barbaresi, P. y Fabri, M.: Cytochrome oxidase histochemistry reveals regional subdivisions in the rat periaqueductal gray matter. Neuroscience 24: 629-633, 1987.
- Cottingham, S.L. y Pfaff, D.W.: Electrical stimulation of the midbrain central gray facilitates lateral vestibulospinal activation of back muscle EMG in the rat. Brain Res., 421: 397-400, 1987.
- Crill, W.E. y Schwindt, P.C.: Active currents in mammalian central neurons. Trends in Neurosci., 6: 236-240, 1983.
- Crosby, E.C. y Woodburne: General summary. J. Comp. Neurol., 78: 505-520, 1943.
- Crunelli, V., Kelly, J.S., Leresche, N. y Pirchio, M.: The ventral and dorsal lateral geniculate nucleus of the rat: intracellular recordings *in vitro*. J. Physiol., 384: 587-601, 1987.
- 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.
- Dekin, M.S., Getting, P.A. y Johnson, S.M.: *In vitro* characterization of neurons in the ventral part of the nucleus tractus solitarius. I. Identification of neuronal types and repetitive firing properties. J. Neurophysiol., 58: 195-214, 1987.
- Desmond, N.L. y Levy, W.B.: Dendritic caliber and the 3/2 power relationship of dentate granule cells. J. Comp. Neurol., 227: 589-596, 1984.
- Dickenson, A.H.: The inhibitory effects of thalamic stimulation on the spinal transmission of nociceptive information, in the rat. Pain, 17: 213-224, 1983.
- Durand, D., Carlen, P.L., Gurevich, N., Ho, A. y Kunov, H.: Electrotonic parameters of rat dendritic granule cells measured using short current pulses and HRP staining. J. Neurophysiol., 50: 1080-1097, 1983.
- Eberhart, J.A., Morrell, J.I., Krieger, M.S. y Pfaff, D.W.: An autoradiographic study of projections ascending from the midbrain central gray, and from the region lateral to it, in the rat. J. Comp. Neurol., 241: 285-310, 1985.
- Eckert, R. y Lux, H.D.: A voltage-sensitive persistent calcium conductance in neuronal somata of *Helix*. J. Physiol., 254: 129-151, 1976.

- Fields, H.L., Bry, J., Hentall, I. y Zorman, G.: The activity of neurons in the rostral medulla of the rat during withdrawal from noxious heat. *J. Neurosci.*, 3: 545-552, 1983a.
- Fields, H.L., Vanegas, H., Hentall, I. y Zorman, G.: Evidence that disinhibition of brain stem neurones contributes to morphine analgesia. *Nature*, 306: 684-686, 1983b.
- Floody, O.R., Lisk, R. y Vomachka, A.J.: Facilitation of lordosis by stradiol in the mesencephalic central gray. *Physiol. Behav.*, 37: 587-595, 1986.
- Floody, O.R. y O'Donohue, T.L.: Lesions of the mesencephalic central gray depress ultrasound production and lordosis by female hamsters. *Physiol. Behav.*, 24: 79-85, 1980.
- Fox, A.P., Nowycky, M.C. y Tsien, R.W.: Kinetic and pharmacological properties distinguishing three types of calcium currents in chick sensory neurons. *J. Physiol.*, 394: 149-172, 1987a.
- Fox, A.P., Nowycky, M.C. y Tsien, R.W.: Single-channel recordings of three types of calcium channels in chick sensory neurons. *J. Physiol.*, 394: 173-200, 1987b.
- Frankenhaeuser, B. y Vallbo, A.B.: Accommodation in myelinated nerve fibers of *Xenopus laevis* as computed on the basis of voltage clamp data. *Acta Physiol. Scand.*, 63: 1-20, 1965.
- Freedman, J.E. y Aghajanian, G.K.: Role of phosphoinositide metabolites in the prolongation of afterhyperpolarization by α_1 -adrenoceptors in rat dorsal raphe neurons. *J. Neurosci.*, 7(2): 3897-3906, 1987.
- Fulton, B.P. y Walton, K.: Electrophysiological properties of neonatal rat motoneurons studied *in vitro*. *J. Physiol.*, 370: 651-678, 1986.
- Galarraga, E., Bargas, J., Sierra, A. y Aceves, J.: The role of calcium in the repetitive firing of neostriatal neurons. *Exp. Brain Res.*, 75: 157-168, 1989.
- Gallego, R.: The ionic basis of action potentials in petrosal ganglion cells of the cat. *J. Physiol.*, 342: 591-602, 1983.
- Getting, P.A.: Mechanisms of patterns generation underlying swimming in *Tritonia*. III. Intrinsic and synaptic mechanisms for delayed excitation. *J. Neurophysiol.*, 49: 1036-1050, 1983.
- Gioia, M., Bianchi, R. y Tredici, G.: Cytoarchitecture of the periaqueductal gray matter in the cat: A quantitative Nissl study. *Acta anat.* 119: 113-117, 1984.
- Godfraind, J.M.: Intracellular and intradendritic recordings of plateau potentials in slices of dentate gyrus maintained *in vitro*. *Exp. Brain Res.*, 57: 233-238, 1985.
- Goodman, R.R., Snyder, S.H., Kuhar, M.J. y Young, W.S.: Differentiation of δ and μ opiate receptor localizations by light microscopic autoradiography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 77: 6239-6243, 1980.

- Grace, A.A. y Bunney, B.S.: The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: single spike firing. *J. Neurosci.*, 4: 2866-2876, 1984a.
- Grace, A.A. y Bunney, B.S.: The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: burst firing. *J. Neurosci.*, 4: 2877-2890, 1984b.
- Granit, R., Kernell, D. y Lamarre, Y.: Synaptic stimulation superimposed on motoneurons firing in the "secondary" range to injected current. *J. Physiol.*, 187: 401-415, 1966.
- Grantyn, R., Grantyn, A. y Schierwagen, A.: Passive membrane properties, afterpotentials and repetitive firing of superior colliculus neurons studied in the anesthetized cat. *Exp. Brain Res.*, 50: 377-391, 1983.
- Grofová, I., Ottersen, O.P. y Rinvick, E.: Mesencephalic and diencephalic afferents to the superior colliculus and periaqueductal gray substance demonstrated by retrograde axonal transport of Horseradish Peroxidase in the cat. *Brain Res.*, 146: 205-220, 1978.
- Gueritaud, J.P.: Electrical activity of rat ocular motoneurons recorded *in vitro*. *Neurosci.*, 24(3): 837-852, 1988.
- Gustafsson, B., Galvan, M., Grafe, P. y Wigstrom, H.: A transient outward current in a mammalian central neurone blocked by 4-amino-pyridine. *Nature*, 299: 352-354, 1982.
- Hagiwara, S.: Calcium spikes. *Adv. Biophys.*, 4: 71-102, 1973.
- Hamilton, B.L.: Cytoarchitectural subdivisions of the periaqueductal gray matter in the cat. *J. Comp. Neurol.*, 149: 1-28, 1973.
- Harlan, R.E., Shivers, B.D. y Pfaff, D.W.: Midbrain microinfusions of prolactin increase the estrogen-dependent behavior, lordosis. *Science*, 219: 1451-1453, 1983.
- Hayes, R.L., Price, D.D., Bennett, G.J., Wilcox, G.L. y Mayer, D.J.: Differential effects of spinal cord lesions on narcotic and non narcotic suppression of nociceptive reflexes: further evidence for the physiologic multiplicity of pain modulation. *Brain Res.* 155: 91-101, 1978.
- Hayes, R.L., Price, D.D., Ruda, M. y Dubner, R.: Suppression of nociceptive responses in the primate by electrical stimulation of the brain or morphine administration: behavioral and electrophysiological comparisons. *Brain Res.*, 167: 417-421, 1984.
- Heinricher, M.M., Cheng, Z. y Fields, H.L.: Evidence for two classes of nociceptive modulating neurons in the periaqueductal gray. *J. Neurosci.*, 7: 271-278, 1987.
- Hille, B.: The selective inhibition of delayed potassium currents in nerve by tetraethylammonium ion. *J. Gen. Physiol.*, 50: 1287-1302, 1967.
- Hillman, D.E.: Neuronal shape parameters and substructures as a basis of neuronal form. Págs. 477-498 en *The neurosciences 4th study program*. Schmitt, F. y Worden, F.J. (eds). Mit Press. Cambridge Ma. 1979.

- 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.
- Hotson, J.R. y Prince, D.A.: A Ca-activated hyperpolarization follows repetitive firing in hippocampal neurons. *J. Neurophysiol.*, 43: 409-419, 1980.
- Hounsgaard, J., Kiehn, O. y Mintz, I.: Response properties of motoneurons in a slice preparation of the turtle spinal cord. *J. Physiol.*, 398: 575-589, 1988.
- Hounsgaard, J. y Midtgaard, J.: Intrinsic determinants of firing pattern in Purkinje cells of the turtle cerebellum *in vitro*. *J. Physiol.*, 402: 731-749, 1988.
- Iansek, R. y Redman, S.J.: An analysis of the cable properties of spinal motoneurons using a brief intracellular current pulse. *J. Physiol.*, 234: 613-636, 1973.
- Jack, J.J.B. Noble, D. y Tsien, R.W. Electric current flow in excitable cells. Clarendon Press. Oxford. 1975.
- Jahnson, H. y Llinás, R.: Electrophysiological properties of guinea-pig thalamic neurones: An *in vitro* study. *J. Physiol.*, 349: 205-226, 1984a.
- Jahnson, H. y Llinás, R.: Ionic basis for the electroresponsiveness and oscillatory properties of guinea-pig thalamic neurones *in vitro*. *J. Physiol.*, 349: 227-247, 1984b.
- Jahnson, H.: Electrophysiological characteristics of neurones in the guinea-pig deep cerebellar nuclei *in vitro*. *J. Physiol.*, 372: 129-147, 1986a.
- Jahnson, H.: Extracellular activation and membrane conductances of neurones in the guinea-pig cerebellar nuclei *in vitro*. *J. Physiol.*, 372: 149-168, 1986b.
- Jodkowski, J.S., Viana, F., Dick, T.E. y Berger, A.J.: Repetitive firing properties of phrenic motoneurons in the cat. *J. Neurophysiol.*, 60: 687-702, 1988.
- Johnston, D.: Passive cable properties of hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Biophys. J.*, 25: 304, 1979.
- Johnston, D.: Passive cable properties of hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 1: 41-55, 1981.
- Junge, D.: Calcium dependence of A-currents in perfused *Aplysia* neurons. *Brain Res.*, 346: 294-300, 1985.
- Jürgens, U. y Pratt, R.: Role of the periaqueductal grey in vocal expression of emotion. *Brain Res.*, 167: 367-378, 1979.
- Kalivas, P.V., Jennes, L., Nemeroff, C.B. y Prange, A.J.: Neurotensin: Topographical distribution of brain sites involved in hypothermia and antinociception. *J. Comp. Neurol.*, 210: 255-268, 1982.
- Kawai, T. y Watanabe, M.: Blockade of Ca-activated K conductance by apamin in rat sympathetic neurons. *Br. J. Pharmacol.*, 87: 225-232, 1986.

- Kerkut, G.A. y Wheal, H.V. (eds). Electrophysiology of isolated mammalian CNS preparations. Academic Press. Londres. 1981.
- Kernell, D.: Input resistance, electrical excitability and size of ventral horn cells in cat spinal cord. *Science*, 152: 1637-1640, 1966.
- Kitabgi, P., Carraway, R., Van Rietschoven, J., Grania, C., Morgat, J., Menez, A., Leeman, S. y Freychet, P.: Neurotensin: Specific binding to synaptic membranes from rat brain. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 74: 1846-1850, 1977.
- Krieger, M.S., Conrad, L.C.A. y Pfaff, D.W.: An autoradiographic study of the efferent connections of the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *J. Comp. Neurol.*, 183: 785-816, 1979
- Kuhar, M.J., Pert, C.B. y Snider, S.H.: Regional distribution of opiate receptor binding in monkey and human brain. *Nature*, 245: 447-450, 1973.
- Laiwand, R., Werman R. y Yarom, Y.: Electrophysiology of degenerating neurones in the vagal motor nucleus of the guinea-pig following axotomy. *J. Physiol.*, 404: 749-766, 1988.
- Lancaster, B. y Pennefather, P.: Potassium currents evoked by brief depolarization in bull-frog sympathetic ganglion cells. *J. Physiol.*, 387: 519-548, 1987.
- Langmoen, T.A. y Andersen, P.: The hippocampal slice *in vitro*. A description of the technique and some examples of the opportunities it offers. Págs. 51-106 en *Electrophysiology of isolated mammalian CNS preparations*. Kerkut, G.A. y Wheal, H.V. (eds). Academic Press. Londres. 1981.
- Larson, C.R. y Kistler, M.K.: The relationship of periaqueductal gray neurons to vocalization and laryngeal EMG in the behaving monkey. *Exp. Brain Res.*, 63: 596-606, 1986.
- Latorre, R., Vergara, C. e Hidalgo, C.: Reconstitution in planar bilayers of Ca^{2+} -dependent potassium channel from transverse tubule membranes isolated from rabbit skeletal muscle. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 79: 805-809, 1982.
- Le Bars, D., Dickenson, A.H. y Besson, J.M.: Diffuse noxious inhibitory control (DNIC). I. Effects on dorsal horn convergent neurones in the rat. *Pain*, 6: 283-304, 1979a.
- Le Bars, D., Dickenson, A.H. y Besson, J.M.: Diffuse noxious inhibitory control (DNIC). II. Lack of effect on non convergent neurones, supraspinal involvement and theoretical implications. *Pain*, 6: 305-327, 1979b.
- Lindvall, O. y Björklund, A.: The organization of the ascending catecholamine neuron systems in the rat brain as revealed by the glioxilic acid fluorescence method. *Acta Physiol. Scand.*, 412: 1-48, 1974.
- Llinás, R.: Electroresponsive properties of dendrites in central neurons. Págs. 1-13 en *Advances in neurology*. Kreutzberg, G.W. (ed). Raven Press. Nueva York. 1975.
- Llinás, R.: Comparative electrobiology of mammalian central neurons. Págs. 7-24 en *Brain slices*. Dingledine, R. (ed). Plenum Press. Nueva York. 1984

- Llinás, R.: The intrinsic electrophysiological properties of mammalian neurons: Insights into central nervous system function. *Science*, 242: 1654-1664, 1988.
- Llinás, R., Greenfield, S.A. y Jahnsen, H.: Electrophysiology of pars compacta cells in the *in vitro* substantia nigra- a possible mechanism for dendritic release. *Brain Res.*, 294: 127-132, 1984.
- Llinás, R. and Sugimori, M.: Electrophysiological properties of *in vitro* Purkinje cell somata in mammalian cerebellar slices. *J. Physiol.*, 305: 171-195, 1980a.
- Llinás, R. and Sugimori, M.: Electrophysiological properties of *in vitro* Purkinje cell dendrites in mammalian cerebellar slices. *J. Physiol.*, 305: 197-213, 1980b.
- Llinás, R. y Yarom, Y.: Electrophysiological properties of mammalian inferior olivary cells *in vitro*: different types of voltage-dependent ionic conductances. *J. Physiol.*, 315: 549-567, 1981a.
- Llinás, R. y Yarom, Y.: Properties and distribution of ionic conductances generating electroresponsiveness of mammalian inferior olivary neurones *in vitro*. *J. Physiol.*, 315: 569-584, 1981b.
- Llinás, R. y López Barneo, J.: Electrophysiology of mammalian tectal neurons *in vitro*: II. Long-term adaptation. *J. Neurophysiol.*, 60: 869-878, 1988.
- López Barneo, J. y Llinás, R.: Electrophysiology of mammalian tectal neurons *in vitro*: I. Transient ionic conductances. *J. Neurophysiol.*, 60: 853-868, 1988.
- Madison, D.V. y Nicoll, R.A.: Control of the repetitive discharge of rat CA1 pyramidal neurones *in vitro*. *J. Physiol.*, 354: 319-331, 1984.
- Mantyh, P.: The midbrain periaqueductal gray in the rat, cat and monkey: A Nissl, Weil and Golgi analysis. *J. Comp. Neurol.*, 204: 349-363, 1982.
- Mantyh, P.: Connections of midbrain periaqueductal gray in the monkey. I.. Ascending efferent projections. *J. Neurophysiol.*, 49: 567-581, 1983a.
- Mantyh, P.: Connections of midbrain periaqueductal gray in the monkey. II. Descending efferent projections. *J. Neurophysiol.*, 49: 582-594, 1983b.
- Mantyh, P., Hunt, S.P. y Maggio, J.E.: Substance P receptors. Localization by light microscopic autoradiography in rat brain using [³H]SP as the ligand. *Brain Res.*, 307: 147-165, 1984.
- Marchand, J.E. y Hagino, N.: Afferents to the periaqueductal gray in the rat. A horseradish peroxidase study. *Neuroscience*, 9: 95-106, 1983.
- Mayer, D., Price, D.D., Rafii, A. y Barber, J.: Acupuncture hypoalgesia: Evidence for activation of a central control system as a mechanism of action. *Adv. Pain Res. Ther.*, 1: 751-754, 1976.
- McDermott, A.B. y Weight, F.F.: Action potential repolarization may involve a transient Ca²⁺-sensitive outward current in a vertebrate neurone. *Nature*, 300: 185-188, 1982.

- McEwen, B.S. y Pfaff, D.W.: Chemical and physiological approaches to neuroendocrine mechanisms: Attempt at integration. Págs. 267-335 en *Frontier in neuroendocrinology*. Ganong, W.F. y Martini, L. (eds). Oxford University Press. Nueva York. 1973.
- Miller, C., Moczydlowski, E., Latorre, R. y Phillips, M.: Charybdotoxin, a protein inhibitor of single Ca^{2+} -activated K^+ channels from mammalian skeletal muscle. *Nature*, 313: 316-318, 1985.
- Minami, T., Oomura, Y. y Sugimori, M.: Electrophysiological properties and glucose responsiveness of guinea-pig ventromedial hypothalamic neurones *in vitro*. *J. Physiol.*, 380: 127-143, 1986a.
- Minami, T., Oomura, Y. y Sugimori, M.: Ionic basis for the electroresponsiveness of guinea-pig ventromedial hypothalamic neurones *in vitro*. *J. Physiol.*, 380: 145-156, 1986b.
- Moriyama, M., Ichimaru, Y., Gomita, Y. y Fukuda, T.: Effects of cholinergic drugs on aversive behavior induced by dorsal central gray stimulation in rats. *Japan. J. Pharmacol.*, 39: 339-347, 1985.
- Moss, M.S. y Basbaum, A.I.: The fine structure of the caudal periaqueductal gray of the cat: morphology and synaptic organization of normal and immunoreactive enkephalin-labeled profiles. *Brain Res.*, 289: 27-43, 1983.
- Moss, M.S., Glazer, E.J. y Basbaum, A.I.: The peptidergic organization of the cat periaqueductal grey: I. The distribution of immunoreactive enkephalin-containing neurons and terminals. *J. Neurosci.*, 3: 603-616, 1983.
- Mountcastle, V.B.: An organizing principle for cerebral function: The unit module and the distributed system. Págs. 21-38 en *The Neurosciences*. 4th study program. Schmitt, F.O. y Worden, F.G. (eds.). Mit Press. Cambridge. 1979.
- Murase, K. y Randic, M.: Electrophysiological properties of rat spinal dorsal horn neurones *in vitro*: Calcium-dependent action potentials. *J. Physiol.*, 334: 141-153, 1983.
- Narahashi, T., Moore, J.W. y Scott, W.R.: Tetrodotoxin blockage of sodium conductance in lobster giant axon. *J. Gen. Physiol.*, 47: 965-974, 1964.
- Nowycky, M.C., Fox, A.P. y Tsien, R.W.: Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature*, 316: 440, 1985.
- Oliveras, J.L., Besson, J.M., Guilbaud, G. y Liebeskind, J.C.: Behavioral and electrophysiological evidence of pain inhibition from midbrain stimulation in the cat. *Exp. Brain Res.*, 20: 32-44, 1974.
- Paxinos, G. y Watson, C.: *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press. Sidney, 1982.
- Pennefather, P., Lancaster, B., Adams, P.R. y Nicoll, R.A.: Two distinct Ca-dependent K currents in bullfrog sympathetic ganglion cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 82: 3040-3044, 1985.

Pert, A., Moody, T.W., Pert, C.B., Dewald, L.A. y Rivier, J.: Bombesin: receptor distribution in brain and effects on nociception and locomotor activity. *Brain Res.*, 193: 209-220, 1980.

Pfaff, D.W. y Keiner, M.: Atlas of estradiol-concentrating cells in the central nervous system of the female rat. *J. Comp. Neurol.*, 151: 121-158, 1973.

Rall, W.: Core conductor theory and cable properties of neurons. Págs. 39-97 en *Handbook of Physiology. The Nervous System*. Bethesda, M.D. (ed.). Am. Physiol. Soc. 1977.

Ramón y Cajal, S.: Págs. 250-251 en *Histologie du Système Nerveux de l'Homme et des Vertèbres*, Vol. II. Paris. 1911.

Redman, S. y Walmsley, B.: The time course of synaptic potentials evoked in cat spinal motoneurons at identified group IA synapses. *J. Physiol.*, 343: 117-133, 1983.

Reynolds, D.V.: Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. *Science*, 164: 444-445, 1969.

Romey, G. y Lazdunski, M.: The coexistence in rat muscle cells of two distinct classes of Ca^{2+} -dependent K^+ channels with different pharmacological properties and different physiological functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 118: 669-674, 1984.

Rose, J.D.: Midbrain and pontine unit responses to lordosis-controlling forms of somatosensory stimuli in the female golden hamster. *Exp. Neurol.*, 60: 499-508, 1978.

Rose, P.K. y Dagum, A.: Nonequivalent cylinder models of neurons: interpretation of voltage transients generated by somatic current injection. *J. Neurophysiol.*, 60: 125-148, 1988.

Rose, P.K. y Vanner, S.J.: Differences in somatic and dendritic specific membrane resistivity of spinal motoneurons: an electrophysiological study of neck and shoulder motoneurons in the cat. *J. Neurophysiol.*, 60: 149-166, 1988.

Rudy, B.: Diversity and ubiquity of K channels. *Neuroscience*, 25: 729-749, 1988.

Sakuma, Y. y Pfaff, D.W.: LH-RH in the mesencephalic central grey can potentiate lordosis reflex of female rats. *Nature*, 283: 566-567, 1980.

Samson, W.K., McCann, S.M., Chud, L., Dudley, C.A. y Moss, R.L.: Intra- and extra-hypothalamic sites which contain both LHRH and single neurons responsive to LHRH. *Neuroendocrinology*, 31: 66-72, 1980.

Sandner, G., Schmitt, P. y Karli, P.: Effects of hypothalamic lesions on central gray stimulation induced escape behaviour and on withdrawal reactions in the rat. *Physiol. Behav.*, 34: 291-297, 1985.

Sandner, G., Schmitt, P. y Karli, P.: Unit activity alterations induced in the mesencephalic periaqueductal gray by local electrical stimulation. *Brain Res.*, 386: 53-63, 1986.

- Schiess, M.A., Dudley, C.A. y Moss, R.L.: Estrogen priming affects the sensitivity of midbrain central gray neurons to microiontophoretically applied LHRH but not β -endorphin. *Neuroendocrinology*, 46: 24-31, 1987.
- Schlue, W.R., Richter, D.W. Mauritz, K.H. y Nacimiento A.C.: Responses of cat spinal motoneurons somata and axons to linearly rising currents. *J. Neurophysiol.*, 37: 305-309, 1974.
- Schmitt, P., Carrive, P., Di Scala, G., Jenck, F., Brandao, M., Bagri, A., Moreau, J. y Sandner, G.: A neuropharmacological study of the periventricular neural substrate involved in flight. *Behav. Brain Res.*, 22: 181-190, 1986.
- Scholfield, C.N.: Electrical properties of neurones in the olfactory cortex slice *in vitro*. *J. Physiol.*, 275: 535-546, 1978.
- Schütz, M.T.B., de Aguiar, J.C. y Graeff, F.G.: Anti-aversive role of serotonin in the dorsal periaqueductal grey matter. *Psychopharmacology*, 85: 340-345, 1985.
- Segal, M., Rogawski, M.A. y Barker, J.L.: A transient potassium conductance regulates the excitability of cultured hippocampal and spinal neurons. *J. Neurosci.*, 4: 604-609, 1984.
- Shelton, D.P.: Membrane resistivity estimated for the Purkinje neuron by means of a passive computer model. *Neuroscience*, 14: 111-131, 1985.
- Shivers, B.D., Harlan, R.E., Morrell, J.L. y Pfaff, D.W.: Immunocytochemical localization of luteinizing hormone-releasing hormone in male and female rats brains. *Neuroendocrinology*, 36: 1-12, 1983.
- Silverman, A.J. y Krey, L.C.: The luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) neuronal networks of the guinea pig brain. *Brain Res.*, 157: 233-246, 1978.
- 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, 1984.
- Stanfield, P.R.: Tetraethylammonium ions and the potassium permeability of excitable cells. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmac.*, 97: 1-67, 1983.
- Storm, J.F.: A-current and Ca-dependent transient outward current control the initial repetitive firing in hippocampal neurons. *Biophys. J.*, 49: 369a, 1986.
- Storm, J.F.: Action potential repolarization and a fast after-hyperpolarization in rat hippocampal pyramidal cells. *J. Physiol.*, 385: 733-759, 1987.
- Taub, A.: Local, segmental and supraspinal interactions with a dorsolateral spinal cutaneous afferent system. *Exp. Neurol.*, 10: 357-374, 1964.
- Tempel, A. y Zukin, S.: Neuroanatomical patterns of the μ , δ y κ opioid receptors of rat brain as determined by quantitative *in vitro* autoradiography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 4308-4312, 1987.
- Thompson, S.H.: Aminopyridine block of transient potassium current. *J. Gen. Physiol.*, 80: 1-18, 1982.

- Traub, R.D. y Llinás, R.: The spatial distribution of ionic conductances in normal and axotomized motoneurons. *Neurosci.*, 2: 829-849, 1977.
- Wamsley, J.K., Lewis, M.S., Young, Scott III y Kuhar, M.: Autoradiographic localization of muscarinic cholinergic receptors in rat brain stem. *J. Neurosci.*, 1: 176-191, 1981.
- Watkins, L.R., Griffin, G., Leichnetz, G.R. y Mayer, D.J.: Identification and somatotopic organization of nuclei projecting via the dorsolateral funiculus in rats: A retrograde tracing study using HRP slow-release gels. *Brain Res.*, 223: 237-255, 1981.
- Watkins, L.R. y Mayer, D.J.: Organization of endogenous opiate and nonopiate pain control systems. *Science*, 216: 1185-1192, 1982.
- Williams, J.T., North, R.A., Shefner, S.A., Nishi, S. y Egan, T.M.: Membrane properties of rat locus coeruleus neurones. *Neurosci.*, 13: 137-156, 1984.
- Wong, B.S. y Adler, M.: Tetraethylammonium blockade of calcium-activated potassium channels in clonal anterior pituitary cells. *Pflügers Arch.*, 407: 279-289, 1986.
- Wong, R.K.S. y Prince, D.A.: Participation of calcium spikes during intrinsic burst firing in hippocampal neurons. *Brain Res.*, 159: 385-390, 1978.
- Yarom, Y. y Llinás, R.: Long-term modifiability of anomalous and delayed rectification in guinea pig inferior olivary neurones. *J. Neurosci.*, 7: 1166-1177, 1987.
- Yarom, Y., Sugimori, M. y Llinás, R.: Ionic currents and firing patterns of mammalian vagal motoneurons *in vitro*. *Neuroscience*, 16: 719-737, 1985.
- Yeziarski, R.P., Gerhart, K.D., Schrock, B.J. y Willis, W.D.: A further examination of effects of cortical stimulation on primate spinothalamic tract cells. *J. Neurophysiol.*, 49: 424-441, 1983.
- Yoshimura, M., Polosa, C. y Nishi, S.: Afterhyperpolarization mechanisms in cat sympathetic preganglionic neuron *in vitro*. *J. Neurophysiol.*, 55: 1234-1246, 1986.
- Zbicz, K.L. y Weight, F.F.: Transient voltage and calcium dependent outward currents hippocampal CA3 pyramidal neurons. *J. Neurophysiol.*, 53: 1038-1058, 1985.
- Zeki, S. y Shipp, S.: The functional logic of cortical connections. *Nature*, 335: 311-317, 1988.
- Zhang, L. y Krnjević, K.: Apamin depresses selectively the after-hyperpolarization of cat spinal motoneurons. *Neurosci. Lett.*, 74: 58-62, 1987.

Este trabajo ha sido realizado con la ayuda de la CAICYT (1103-84) y el FISSS (85/1289).

Han colaborado,

en el estudio electrofisiológico:

M^a Dolores Ganfornina Alvarez

Gabriel Gutierrez y Pozo

Jose Manuel Lora Calvo

y en el estudio morfológico:

Antonio López Román

M^a Victoria Prieto Ruiz-Canela.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes
en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de

Usted

acordó otorgarle la calificación de Apto cum laude

Sevilla, 2 de octubre

19 85

El Vocál,



El Presidente



El Vocál,



El Secretario,



El Vocál,



El Doctorado,

