

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARIA GENERAL

T-D.
C/74



Queda registrada esta Tesis Doctoral
al folio 32 número 51 del libro
correspondiente.

4 SET. 1989

Sevilla,

El Jefe del Negociado de Tesis,

Alma Raffite

CANALES IÓNICOS DE NEURONAS SEPTALES AISLADAS:
CARACTERIZACION ELECTROFISIOLÓGICA Y MODULACION
POR TRH Y LHRH



Antonio G. Castellano Orozco

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

Sevilla, 1989

15539



AVDA. SANCHEZ PIZJUAN, 4

41009 - SEVILLA

TELÉFONO (954) 87 15 46

DEPARTAMENTO DE FISILOGIA MEDICA
Y BIOFISICA
FACULTAD DE MEDICINA

D. José López Barneo, Catedrático de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla

CERTIFICA:

Que D. Antonio G. Castellano Orozco ha realizado bajo su dirección el trabajo "Canales iónicos en neuronas septales aisladas: Caracterización electrofisiológica y modulación por TRH y LHRH" que presenta para optar al grado de Doctor en Biología por la Universidad de Sevilla.

Sevilla, 4 de septiembre de 1989



DPTO. DE FISILOGIA MEDICA
Y BIOFISICA
FACULTAD DE MEDICINA

Fdo: José López Barneo

CONTENIDO

INTRODUCCION.....	1
1. Diversidad en la actividad eléctrica de neuronas del sistema nervioso central de mamíferos.....	1
2. La diversidad electrofisiológica de neuronas centrales depende del tipo y distribución de canales iónicos en la membrana.....	3
3. Los canales iónicos dependientes de voltaje de neuronas centrales pueden modularse por ligandos extracelulares.....	10
4. En el área septal existen al menos tres tipos neuronales con diferentes propiedades electrofisiológicas.....	11
OBJETIVO GENERAL DEL TRABAJO.....	16
MATERIAL Y METODOS.....	18
1. Dispersión y cultivo de las células.....	18
1.1. Obtención de secciones de encéfalo.....	18
1.2. Tratamiento y dispersión enzimática.....	19
1.3. Cultivo y mantenimiento.....	20
1.3.1. Tratamiento de los trozos de vidrio con poli-L-lisina.....	20
1.3.2. Siliconización del material de vidrio.....	21
2. Soluciones.....	21
2.1. Soluciones utilizadas en la preparación del cultivo.....	21
2.2. Soluciones de registro.....	22

3. Técnicas de registro.....	24
3.1. Descripción general.....	24
3.2. Micropipetas.....	25
3.3 Diseño del sistema.....	26
3.3.1. Descripción general.....	26
3.3.2. Amplificador de "patch-clamp".....	27
3.3.3. Generador de pulsos programable.....	29
3.3.4. Sistema de adquisición.....	31
3.3.5. Sistema de Representación en Pantalla.....	32
4. Proceder experimental.....	32
5. Análisis de los resultados.....	34
5.1. Tratamiento de la señal.....	34
5.2. Presentación de parámetros.....	35
RESULTADOS.....	36
1. Aspecto general de las células y propiedades eléctricas pasivas.....	36
1.1. Capacidad de la membrana y estimación de la superficie de las células.....	36
1.2. Resistencia de la membrana de las células en reposo.....	37
1.3. Diálisis y sustitución del medio intracelular.....	37
2. Excitabilidad de neuronas septales en cultivo.....	38
3. Corrientes iónicas de neuronas septales.....	40
4. Corriente de sodio.....	42
4.1. Identificación y aislamiento.....	42
4.2. Relación corriente-voltaje.....	43
4.3. Activación y desactivación.....	47
4.4. Inactivación.....	52
4.5. Cambios producidos en la corriente de sodio durante el proceso de diálisis.....	58
5. Corrientes de calcio.....	61
5.1. Aislamiento e identificación.....	61
5.2. Permeabilidad a Ba^{2+} y bloqueo por Co^{2+} y Mg^{2+}	61
5.3. Relación corriente-voltaje.....	64
5.4. Separación de dos tipos de canales de calcio.....	64
5.4.1. Activación y desactivación.....	67
5.4.2. Inactivación.....	69
Curso temporal de la inactivación.....	70
5.4.3. Lavado de los canales de calcio.....	70
5.4.4. Variabilidad en la distribución de canales de calcio en diferentes células.....	72

6. Corrientes de potasio.....	74
6.1. Identificación y aislamiento.....	74
6.2. Tipos de corrientes de potasio.....	76
6.2.1. Corriente transitoria.....	76
6.2.2. Corriente de potasio con cinética de activación lenta.....	84
7. Modulación de las conductancias iónicas de neuronas septales por neuropéptidos.....	89
7.1. Efecto de TRH y sus derivados sobre las corrientes iónicas totales.....	89
7.1.1. Efecto de TRH sobre la corriente de sodio.....	91
7.1.2. Efecto de TRH sobre la corriente de potasio.....	95
7.2. Efecto de LHRH sobre las corrientes iónicas de neuronas septales.....	97
DISCUSION.....	99
1. Las neuronas septales en cultivo mantienen intactas sus propiedades electrofisiológicas.....	99
2. La excitabilidad de neuronas septales depende de varios tipos y subtipos de canales iónicos.....	100
3. Características cinéticas y comparación de las corrientes iónicas de neuronas septales con las de otras preparaciones.....	103
4. Posible participación de los diferentes canales iónicos en la electrofisiología de neuronas septales.....	110
5. Modulación de las corrientes iónicas por los neuropéptidos TRH y LHRH.....	112
CONCLUSIONES.....	116
BIBLIOGRAFIA.....	119

INTRODUCCION

1. DIVERSIDAD EN LA ACTIVIDAD ELECTRICA DE NEURONAS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE MAMIFEROS.

Hasta los primeros años de la presente década las funciones integrativas que a nivel celular se llevan a cabo en el sistema nervioso se pensaba que eran debidas fundamentalmente a la intrincada red de interacciones sinápticas que se producen en cada neurona. Este punto de vista asumía que las neuronas actúan como elementos en donde se suman los potenciales postsinápticos aferentes y que este hecho determina, en cada célula, la frecuencia con la que se generan potenciales de acción. Se postulaba por lo tanto que el grado de integración en una neurona depende de la complejidad de su geometría y del número y distribución de las sinapsis aferentes a lo largo de la membrana somato-dendrítica.

En los últimos años el estudio de las características biofísicas de neuronas centrales *in vitro* ha mostrado que además de la complejidad de la morfología y conexiones sinápticas, los elementos neuronales individuales presentan una enorme variabilidad funcional. Esta diversidad se debe a que en ausencia de conexiones sinápticas la forma en la que cada neurona genera su actividad eléctrica eferente puede ser muy distinta y depende de las características biofísicas de la membrana.

Un ejemplo ilustrativo de lo expuesto en el párrafo anterior se muestra en la Figura 1. Los registros pertenecen a tres células distintas localizadas en la corteza visual de cobaya, que es un área del neocortex previamente estudiada en nuestro laboratorio (Montoro y col., 1988). En todos los casos los cambios en el potencial de membrana se generaron por la aplicación de un pulso de corriente positiva a través del microelectrodo de registro. La célula del panel A tiene una respuesta de

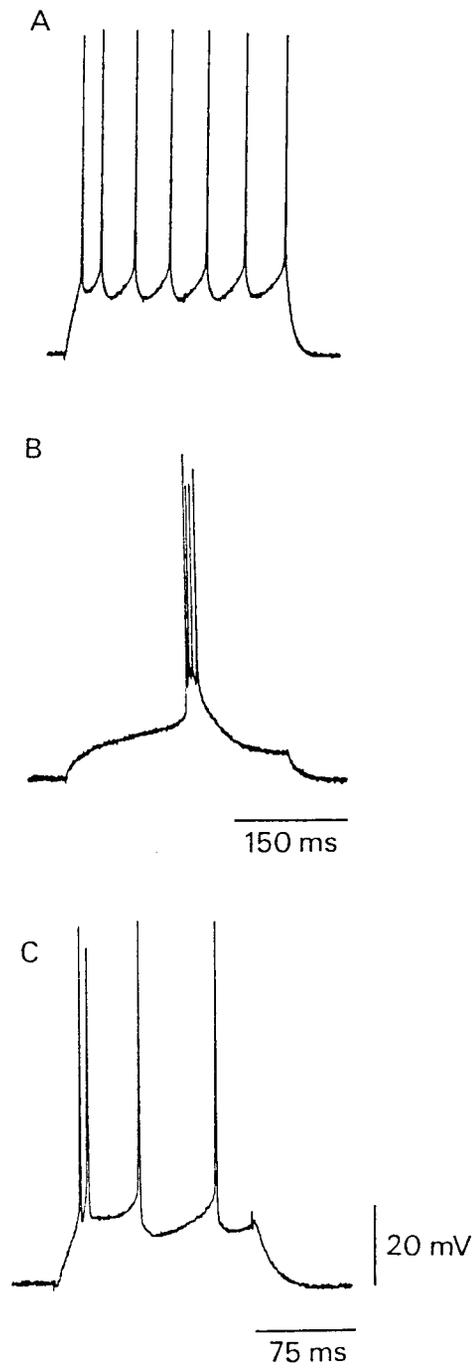


Figura 1. Diversidad de patrones electrofisiológicos en neuronas del SNC. Respuesta a pulsos despolarizantes de tres células de corteza visual de cobaya. (A) respuesta de una neurona con patrón de disparo "tónico". (B) respuesta de una célula con patrón "fásico". (C) respuesta de tipo intermedio entre las dos anteriores ("fásico-tónica"). Cedida por R. J. Montoro.

tipo "tónico", y genera potenciales de acción de forma repetitiva. La respuesta que se muestra en B, perteneciente a otra célula, es de tipo "fásico" y consiste en la génesis de un único brote de cuatro potenciales de acción. La respuesta de la célula que se muestra en C es de tipo intermedio entre las dos anteriores ("fásico-tónica") y se caracteriza por la génesis de un brote inicial de dos potenciales de acción seguido de un disparo repetitivo. Si la frecuencia e intervalo entre potenciales de acción determina la forma en la que la neurona influirá a aquellas con las que establece contactos sinápticos, es obvio que en cada uno de los casos que se muestran en la figura la "información" eferente es completamente distinta.

Dentro de las diferentes neuronas centrales en las que se han estudiado sus características biofísicas con cierto detalle parece existir una tendencia a que células localizadas en una misma estructura y que proyectan colectivamente a las mismas áreas tengan propiedades electrofisiológicas similares. Por ejemplo, todas las células de la oliva inferior tienen *in vitro* idénticas propiedades electrofisiológicas (Llinás y Yarom, 1981); igual ocurre con las células de los núcleos talámicos (Llinás y Jahnsen, 1982) y las del stratum griseum medium del tubérculo cuadrigémino superior (López-Barneo y Llinás, 1988). En otras estructuras con una organización citoarquitectónica más compleja, como por ejemplo en la corteza cerebral y el área septal, existen diferentes tipos neuronales, cada uno de ellos con propiedades electrofisiológicas específicas (Montoro y col., 1988; Connors y col., 1982; Alvarez de Toledo y López-Barneo, 1988).

Los fenómenos integrativos neuronales se deben por lo tanto no sólo a la complejidad en la morfología y conectividad sináptica sino que, además, existe en cada tipo neuronal una alta especificidad a nivel biofísico de la que depende en gran parte la forma en que se procesa la información aferente.

2. LA DIVERSIDAD ELECTROFISIOLOGICA DE NEURONAS CENTRALES DEPENDE DEL TIPO Y DISTRIBUCION DE CANALES IONICOS EN LA MEMBRANA.

La diversidad electrofisiológica de las neuronas centrales descrita en la sección anterior depende de la distinta dotación y distribución de canales iónicos en su membrana. Es por lo tanto importante la caracterización de las conductancias iónicas en los distintos tipos celulares

para poder comprender la forma en la que se procesa la información en los circuitos neuronales.

La mayoría de los trabajos sobre electrofisiología celular en el sistema nervioso central (SNC) de mamíferos se han realizado mediante la técnica de registro intracelular. Con esta técnica se ha estudiado la forma en que diferentes neuronas generan potenciales de acción y, de forma indirecta (utilizando métodos de sustitución iónica y bloqueantes específicos), se han determinado las conductancias iónicas responsables de su electrofisiología. En cambio, son pocos los trabajos con fijación de voltaje ("voltage-clamp") en neuronas del SNC encaminados a caracterizar las corrientes iónicas.

La aplicación de la técnica de "voltage-clamp" en neuronas centrales lleva implícita problemas de difícil solución. Debido al pequeño tamaño de las células se necesita la utilización de al menos dos microelectrodos que, al aplicarlos intracelularmente, producen un daño considerable. Además, la complicada geometría de las neuronas determina que el control del potencial no sea uniforme a lo largo de toda la membrana, por lo que no se pueden registrar corrientes iónicas rápidas, y que los datos obtenidos no sean del todo válidos desde el punto de vista cuantitativo. No obstante, se han realizado algunos experimentos, especialmente en motoneuronas espinales (Barret y Crill, 1980) y neuronas de hipocampo (Halliwell y Adams, 1982; Brown y Griffith, 1983; Segal y Barker, 1984; Segal y Barker, 1986). La aparición de la técnica de fijación de voltaje con un microelectrodo (Wilson y Goldner, 1975) permitió el estudio de células de menor tamaño, aunque esta técnica presenta también los mismos inconvenientes señalados anteriormente.

La técnica de "patch-clamp" (Neher y col., 1978; Hamill y col., 1981) permite la realización de estudios electrofisiológicos detallados en células de pequeño tamaño. Mediante esta técnica se puede medir la corriente iónica que pasa a través de un solo canal iónico (registro de "single-channel") y, también, registrar la corriente generada en la totalidad de la membrana (registro en la configuración de "whole-cell"). Sin embargo, los trabajos realizados con esta técnica en neuronas del SNC son todavía escasos.

A continuación se exponen de forma resumida las características más importantes de las corrientes iónicas dependientes de voltaje identificadas en neuronas del SNC. Estos datos, aunque en muchos casos parciales y sin valor cuantitativo, se analizan con más detalle y comparan con nuestros resultados en el apartado "Discusión".

Todas las estructuras del sistema nervioso central estudiadas hasta ahora poseen una corriente rápida de sodio (I_{Na}), una de potasio (I_K), una de potasio dependiente de calcio ($I_{K(Ca)}$) y una de calcio (I_{Ca}). Existen además otras corrientes iónicas que se encuentran distribuidas de manera no uniforme y son las responsables de las propiedades específicas de las neuronas de cada estructura cerebral. Es importante mencionar que existen canales iónicos activados por neurotransmisores u otros ligandos que también participan de forma crítica en los procesos integrativos neuronales; estas conductancias no se estudian en el presente trabajo ya que éste se centra en el análisis de las conductancias reguladas por cambios en el potencial de membrana.

En Neuronas Centrales Existe Más de un Tipo de Corriente de sodio.

La corriente de sodio (I_{Na}) que se registra en neuronas del SNC de mamíferos tiene propiedades electrofisiológicas y farmacológicas similares a las de la conductancia descrita por Hodgkin y Huxley (1952) en el axón gigante de calamar. Esta corriente se activa con despolarizaciones de 25-40 mV sobre el potencial de membrana en reposo, alcanza el valor máximo de amplitud en menos de 1 ms y se inactiva de forma rápida (Barret y Crill, 1980; Huguenard y col., 1988; Sah y col., 1988a). Las características farmacológicas de I_{Na} son similares a las descritas en preparaciones de invertebrados; la aplicación extracelular de tetrodotoxina (TTX) bloquea selectivamente esta conductancia en todas las estructuras del SNC de mamíferos estudiadas (Llinás y Sugimori, 1980a y b; López-Barneo y Llinás, 1988).

Además de la corriente de sodio clásica se ha descrito en células de Purkinje del cerebelo (Llinás y Sugimori, 1980a), en células del cortex sensoriomotor (Stafstrom y col., 1982; Huguenard y col., 1988) y en neuronas piramidales de hipocampo (French y Gage, 1985) otra conductancia al sodio ($I_{Na(s)}$) que difiere de la anterior en que presenta una cinética de activación lenta y no se inactiva. El umbral para esta conductancia se encuentra muy cercano al potencial de membrana, por lo que parece estar implicada en la génesis de respuestas subumbrales que determinan las características del disparo repetitivo, especialmente en células de Purkinje (Llinás y Sugimori, 1980a). Esta corriente de sodio, aunque todavía no bien estudiada, se bloquea también por TTX.

Las Neuronas del SNC Tienen Varios Tipos de Corrientes de Potasio.

Hasta la fecha se han descrito varios tipos de corrientes de potasio en el SNC de mamíferos, aunque en la



mayoría de los casos los datos experimentales son todavía fragmentarios y es posible que el número de canales de potasio con propiedades específicas aumente considerablemente en los próximos años. Algunos autores establecen una clasificación de las corrientes de potasio en tres grandes grupos (Hille, 1984; Rudy, 1988): a) corrientes de potasio dependientes de voltaje, b) corrientes de potasio activadas por Ca^{2+} , y c) rectificadores anómalos. Dentro de cada grupo existen a su vez varios tipos de corrientes con características electrofisiológicas y farmacológicas particulares.

En todas las estructuras del SNC estudiadas se ha identificado una conductancia de potasio dependiente de voltaje (I_K) y otra dependiente de calcio ($I_{K(\text{Ca})}$). La I_K o "rectificador tardío" se encuentra ampliamente distribuida en células no excitables, células musculares y neuronas. Bajo esta denominación se incluyen varios tipos de corrientes de potasio cuyas características generales son semejantes a la corriente descrita por Hodgkin y Huxley en el axón gigante de calamar (Hodgkin y Huxley, 1952). En cada preparación I_K puede tener características particulares, e incluso coexisten más de un tipo distinto en una misma neurona. Esta corriente se ha estudiado con "voltage-clamp" en neuronas de hipocampo (Segal y Barker, 1984; Sah y col., 1988b) y en motoneuronas espinales (Barret y Crill, 1980). La I_K se activa con despolarizaciones mayores de 25 mV sobre el potencial de reposo (V_M más positivo de -40 mV) y no se inactiva con pulsos de corta duración. El tetraetilamonio (TEA) bloquea esta corriente, con diferente efectividad según se aplique interna o externamente, al igual que la 4-aminopiridina (4-AP), aunque esta última a concentraciones más elevadas. En células donde la I_K tiene una cinética de activación rápida, ésta participa en la repolarización del potencial de acción.

Entre las corrientes de potasio dependientes del potencial de membrana en neuronas del SNC se encuentra la denominada genéricamente I_A . Esta conductancia, identificada inicialmente en neuronas de moluscos (Connors y Stevens, 1971), se ha observado, entre otras preparaciones, en neuronas de hipocampo (Segal y Barker, 1984; Zbicz y Weight, 1985; Halliwell y col., 1986) y en neuronas del tálamo (Jahnsen y Llinás, 1984). La I_A se activa a potenciales de membrana entre -70 y -40 mV (más negativo que I_K) con un curso temporal rápido, y tiene la característica de que se inactiva también de forma rápida. Al potencial de membrana en reposo la corriente se encuentra parcialmente inactivada, necesitando una hiperpolarización previa para su total deinactivación. La I_A se bloquea por la aplicación extracelular de 4-AP (Gustafsson y col., 1982; Segal y Barker, 1984) y es

poco sensible a la aplicación de TEA a la solución externa.

El papel funcional de I_A se relaciona con la regulación de la frecuencia de disparo repetitivo cuando una neurona está espontáneamente activa o responde a una despolarización mantenida. La hiperpolarización que sigue a un potencial de acción deactiva esta corriente que, posteriormente, se activa de forma transitoria enlenteciendo la vuelta del potencial de membrana hacia el umbral de disparo, lo cual se traduce en una prolongación del intervalo interespiga. Un aspecto importante a tener en cuenta es que la I_A puede modularse por mediadores intracelulares. Aunque todas las corrientes transitorias denominadas genéricamente I_A tienen características comunes, en las diferentes preparaciones estudiadas se observan propiedades particulares, e incluso se han registrado dos tipos distintos de corriente transitoria de potasio, una de las cuales es dependiente de los niveles de calcio en el citosol y poco sensible a 4-AP (Zbicz y Weight, 1985; Storm, 1986; véase Castellano y col., 1989).

Otra corriente de potasio dependiente del potencial de membrana es la I_M , la cual se identificó inicialmente en neuronas de hipocampo (Halliwell y Adams, 1982). Esta corriente se caracteriza porque se bloquea selectivamente por agonistas muscarínicos (Constanti y Brown, 1981) y no se inactiva. La I_M es una corriente de pequeña amplitud cuyo umbral de activación se encuentra a niveles más negativos que el potencial de reposo. Al no inactivarse, contribuye a la conductancia de potasio en reposo de la célula. También puede desempeñar un papel importante en la regulación de la frecuencia de disparo repetitivo.

La actividad de los **canales de potasio dependientes de Ca^{2+}** se relaciona con la concentración de calcio libre en el citoplasma; un incremento en los niveles de calcio intracelular produce la apertura del canal. Dentro de este grupo la corriente más estudiada es la denominada $I_{K(Ca)}$, la cual, además de estar regulada por los niveles de calcio, tiene cierta dependencia del potencial de membrana. Debido a esta dependencia del voltaje la corriente se deactiva a potenciales de membrana próximos al potencial de reposo a concentraciones fisiológicas de calcio, por lo que posiblemente está asociada con una posthiperpolarización rápida. En algunas neuronas $I_{K(Ca)}$ contribuye a la repolarización del potencial de acción. La $I_{K(Ca)}$ se bloquea por caribdotoxina (Miller y col., 1985) y TEA. La $I_{K(Ca)}$ se ha identificado en neuronas del SNC utilizando la técnica de registro intracelular (Madison y Nicoll, 1982; Madison y Nicoll, 1984; Lancaster y Adams, 1986), y con "voltage-clamp" en neuronas de hipocampo (Brown y Griffith, 1983; Segal y Barker, 1986).

Otro tipo de corriente de potasio dependiente de los niveles de calcio intracelular es la denominada I_{AHP} . Esta corriente se supone tiene menor amplitud, menor dependencia del potencial de membrana y mayor sensibilidad al calcio que la $I_{K(Ca)}$. Además, es menos sensible al bloqueo por TEA y se bloquea por apamina (Hugues y col., 1982). Al tener poca dependencia del potencial de membrana, su deactivación está posiblemente más relacionada con la difusión del calcio en el citoplasma. Debido a estas características la activación de I_{AHP} produce posthiperpolarizaciones lentas y de larga duración. Los únicos datos hasta la fecha sobre esta conductancia en SNC han sido los obtenidos en motoneuronas espinales con registro intracelular (Zhang y Krnjevic, 1987), donde se ha comprobado que la posthiperpolarización se bloquea por apamina.

Algunas corrientes de potasio tienen la característica común de activarse con la hiperpolarización, por lo que se han denominado genéricamente "rectificadores anómalos" ($I_{K(ra)}$). Dentro de este grupo se encuentran varios tipos de corrientes con diferente curso temporal y sensibilidad a TEA y otros bloqueantes. En neuronas del cortex olfatorio (Constanti y Galvan, 1983) y motoneuronas espinales (Nelson y Frank, 1967) se ha observado una corriente que se activa de forma rápida con la hiperpolarización, mientras que en células piramidales de hipocampo (Adams y Halliwell, 1982; Halliwell y Adams, 1982) se ha identificado una corriente de potasio que al hiperpolarizar la célula se activa lentamente y que es denominada I_Q .

Existen al Menos dos Tipos de Canales de Calcio en el SNC de Mamíferos.

La primera sugerencia sobre la existencia de más de un tipo de canales de calcio en neuronas centrales se obtuvo a partir de estudios con registro intracelular en neuronas de la oliva inferior (Llinás y Yarom, 1981). En estos trabajos se identificaron dos conductancias para calcio con diferente umbral de activación, por lo que se denominaron de "bajo umbral" y de "alto umbral". Sólo en fecha reciente se han obtenido registros con fijación de voltaje y "patch-clamp" que confirman la existencia de distintos tipos de corrientes de calcio en SNC. Los canales de calcio de bajo umbral también se denominan canales SD (deactivación lenta) o tipo T (transitorio), mientras que los de alto umbral se conocen también como canales FD (deactivación rápida) o tipo L (larga duración).

Los canales de calcio SD se activan a potenciales de membrana negativos (V_m entre -60 mV y -40 mV), mientras que los FD se activan con despolarizaciones mayores de

30 mV (V_m alrededor de -20 mV). La $I_{Ca(SD)}$ se encuentra generalmente inactivada al potencial de reposo pudiendo deinactivarse mediante una pequeña hiperpolarización previa, mientras que los canales FD apenas se inactivan. Ambas conductancias se bloquean selectivamente con la aplicación extracelular de Co^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} y Cd^{2+} .

En neuronas de hipocampo (Halliwell, 1983; Kay y Wong, 1987; Yaari y col., 1987; Meyers y Barker, 1989), neuronas neocorticales (Sutor y Zieglgansberger, 1987) y células de Purkinje del cerebelo (Regan, 1987) se han identificado, juntos o aislados, canales de calcio SD y FD. Por otro lado, en neuronas del ganglio de la raíz dorsal (Nowycky y col., 1985; Fox y col., 1987a y b) se describieron tres tipos distintos de corrientes de calcio dependientes de voltaje, aunque algunos autores (Swandulla y Armstrong, 1988) cuestionan esta interpretación. Además de los anteriormente citados T y L, se postula la existencia de otro tipo de canal de calcio denominado tipo N, cuyas características son intermedias entre los dos anteriores (Nowycky y col., 1985; Tsien y col., 1988). Apoyando esta idea, en neuronas de la capa granular (Gray y Johnston, 1986) y del área CA3 de hipocampo (Madison y col., 1987) se han observado tres tipos de corrientes de calcio, y en neuronas del área CA1 de hipocampo se describen dos tipos distintos de canales de calcio de alto umbral y no se encuentran canales de calcio de bajo umbral (French-Mullen y col., 1989). Aunque recientemente están apareciendo numerosos trabajos sobre canales de calcio, son muy pocos los estudios en neuronas centrales donde los registros puedan ser utilizados para efectuar un análisis cuantitativo, por lo que el número de canales de calcio distintos está aún por determinar.

La Distribución de los Canales Iónicos Puede Variar a lo Largo de la Membrana Somato-Dendrítica.

Como se indicó al inicio de este apartado, otro aspecto importante que determina la actividad electrofisiológica de cada neurona es la distribución diferencial de los canales iónicos en su membrana. Se ha sugerido que cada tipo de canal puede tener una distribución espacial diferente en cada célula. Algunos canales se concentran principalmente en las dendritas distales, mientras que otros pueden localizarse en el axón o el soma. Se ha postulado que los canales de calcio de alto umbral se encuentran preferentemente localizados en las dendritas y los de bajo umbral en el soma de las neuronas (Llinás y Sugimori, 1980a y b; Llinás y Yarom, 1981; Yaari y col., 1988). Experimentos recientes aportan datos en contra de esta última idea, ya que se han registrado corrientes de calcio de alto umbral en células disociadas y desprovistas de prolongaciones (Regan, 1987; ver "Discusión"), y además se han identificado corrientes

de calcio a través de canales de alto y bajo umbral en soma y conos de crecimiento de neuronas simpáticas (Lipscombe y col., 1988).

3. LOS CANALES IONICOS DEPENDIENTES DE VOLTAJE DE NEURONAS CENTRALES PUEDEN MODULARSE POR LIGANDOS EXTRACELULARES.

Los canales iónicos dependientes de voltaje pueden estar sujetos a modulación. Este hecho en el caso de neuronas del SNC se refleja en un cambio en la actividad electrofisiológica de las mismas. Generalmente, los neuromoduladores no actúan directamente sobre los canales iónicos, sino que ejercen su efecto a través de segundos mensajeros. En la membrana de las células existen receptores para determinadas moléculas que al interactuar con ligandos específicos inducen la activación o liberación de un segundo mensajero, el cual, directa o indirectamente, modifica la actividad de canales iónicos. Los efectos producidos por los neuromoduladores aparecen con un cierto retraso y pueden permanecer incluso después de que el estímulo inicial haya cesado.

Los mecanismos mediante los cuales pueden modularse los canales iónicos son diversos. En determinados casos se produce una interacción directa entre una proteína y la molécula que forma el canal, tal es el caso de la modulación mediada por proteína G. Otro mecanismo de modulación es la modificación de la estructura de la molécula, como ocurre con aquellos canales que son fosforilados por proteína-quinasas.

Las moléculas que actúan como moduladores de canales iónicos tienen naturaleza muy variada, y a medida que se avanza en el estudio de la fisiología celular es posible que se identifiquen nuevos neuromoduladores. En el sistema nervioso central se han identificado, entre otros, los siguientes neuromoduladores: hormonas (norepinefrina, epinefrina, serotonina, etc), péptidos (sustancia P, TRH, LHRH, vasopresina) y aminoácidos (GABA, glicina). Debido a que la mayoría de los trabajos sobre modulación de corrientes iónicas se han realizado con registro intracelular, y sólo recientemente se están obteniendo datos a partir de experimentos realizados con "voltage-clamp", en muchos casos no se conoce el efecto directo que el neuromodulador produce sobre las corrientes iónicas.

Entre los canales iónicos dependientes de voltaje susceptibles de ser modulados, los más estudiados han sido los canales de calcio y potasio, mientras que no existen datos en la literatura sobre la regulación de canales de sodio por neuromoduladores. Ejemplos de modulación son la

disminución de la corriente a través de canales de calcio FD por análogos de la glicina en neuronas de hipocampo (Madison y col., 1987), el aumento de la corriente de calcio en células de la capa granular de hipocampo por la acción de agonistas β -adrenérgicos (Gray y Johnston, 1987), y la disminución de la corriente de potasio dependiente de calcio en células piramidales de hipocampo por la acción de la noradrenalina (Madison y Nicoll, 1982).

En el septum se han identificado receptores para algunos neuropéptidos, entre ellos la TRH (Simasko y Horita, 1984), cuyos efectos sobre las neuronas septales no son conocidos. Por otro lado, la LHRH es un decapeptido relacionado estructuralmente con la TRH, que se ha detectado en gran cantidad en el área septo-hipocámpica (Reubi y col., 1987; Schwanzel-Fukuda y Pfaff, 1989). Debido a lo expuesto anteriormente, uno de los objetivos del presente trabajo ha sido estudiar el posible efecto de la TRH y LHRH sobre las corrientes iónicas de neuronas septales.

4. EN EL AREA SEPTAL EXISTEN AL MENOS TRES TIPOS NEURONALES CON DIFERENTES PROPIEDADES ELECTROFISIOLÓGICAS.

Las neuronas comprendidas en la región septal fueron clasificadas, desde un punto de vista citoarquitectónico, por Ramón y Cajal en tres núcleos (Ramón y Cajal, 1911): principal o externo, medio y triangular o dorsal. Estudios posteriores confirmaron que esta división se corresponde con un comportamiento fisiológico distinto de las neuronas incluidas en cada área (Lebrum y Poulain, 1983; Lamour y col., 1984).

En trabajos previos realizados en nuestro laboratorio (López-Barneo y col., 1985; Alvarez de Toledo y López-Barneo, 1988) se ha puesto de manifiesto que las neuronas localizadas en cada zona del septum *in vitro* tienen diferentes propiedades electrofisiológicas. Cada tipo celular muestra un patrón de disparo característico y posee conductancias iónicas distintas (Fig. 2). Al objeto de poder comparar estos datos con nuestros resultados se detallan a continuación las características electrofisiológicas en neuronas septales estudiadas con registro intracelular.

Neuronas del Septum Dorsolateral.

La estimulación de neuronas del septum dorsolateral mediante la inyección de corriente con pulsos despolarizantes de amplitud menor de 0,2 nA produce un

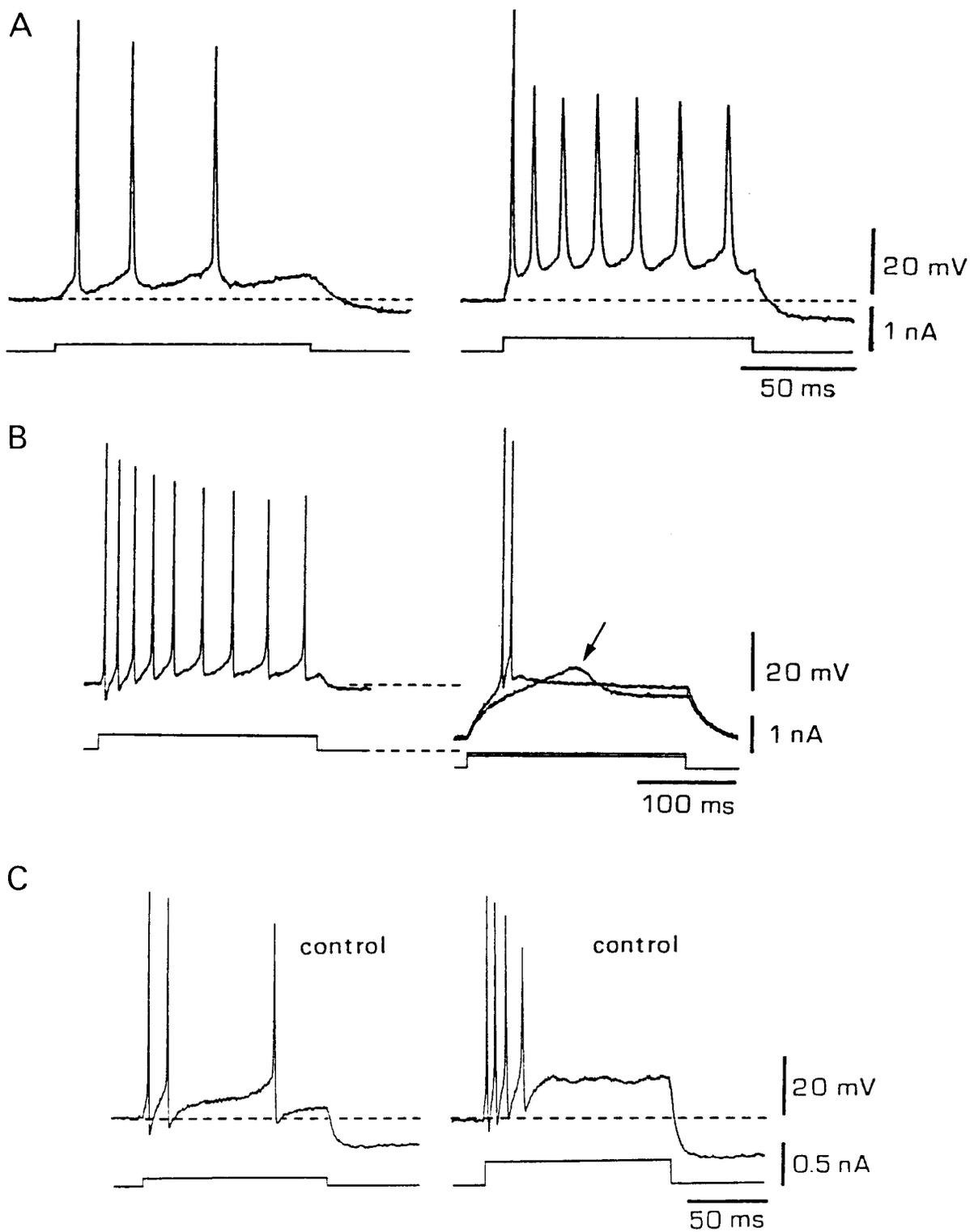


Figura 2. Electrofisiología de neuronas del septum. Respuestas características de células de septum dorsolateral (A), septum intermedio (B), y septum medial (C) producidas por la inyección de pulsos de corriente a través del microelectrodo de registro. (Tomada de Alvarez de Toledo y López-Barneo, 1988).

tren de potenciales de acción rápidos. Al aumentar la amplitud de la despolarización las células tienen un patrón de disparo característico que consiste en un potencial de acción rápido inicial seguido de un tren de espigas más lentas y de menor amplitud (Fig. 2A). Al final del pulso se produce una posthiperpolarización cuya amplitud y duración aumenta al incrementar la amplitud del estímulo. Al aplicar pulsos hiperpolarizantes se observa la existencia de rectificación anómala en el 90% de las neuronas del septum dorsolateral.

Tras la adición de TTX al baño la estimulación directa de las células produce espigas lentas y de menor amplitud con un umbral de disparo más alto, debidas a la activación de canales de calcio, ya que estas espigas desaparecen al añadir Co^{2+} o al eliminar el Ca^{2+} de la solución externa. La posthiperpolarización que se produce al final del pulso se debe a la actividad de una conductancia de potasio dependiente de calcio, ya que es resistente a TTX y desaparece en ausencia de Ca^{2+} .

La característica más notable de las neuronas del septum dorsolateral es una transición de un patrón de disparo rápido a otro lento, y la restricción de la frecuencia de disparo. Esta excitabilidad limitada se debe a la activación de conductancias para el calcio, inactivación de la conductancia de sodio y activación de la corriente de potasio activada por Ca^{2+} . Estos datos sugieren que en neuronas del septum dorsolateral existen, además de las conductancias al Na^+ (I_{Na}) y K^+ (I_{K}), una conductancia para calcio ($G_{\text{Ca(HTS)}}$), una para potasio dependiente de calcio ($G_{\text{K(Ca)}}$) y un rectificador anómalo ($G_{\text{K(ra)}}$).

Neuronas del Septum Intermedio.

El patrón de disparo de las neuronas del septum intermedio mantenidas al potencial de reposo es similar al de las neuronas del septum dorsolateral. El 65% de las células al aplicar pulsos hiperpolarizantes poseen rectificación anómala. La característica particular de estas células es que la aplicación de pulsos despolarizantes desde un potencial de membrana mantenido mediante la inyección de corriente a un nivel más negativo que en reposo genera una onda lenta con un umbral bajo sobre la cual se produce un brote de espigas rápidas (Fig. 2B).

Los potenciales de acción rápidos son debidos a la activación de una conductancia para el sodio ya que desaparecen al añadir TTX, mientras que la onda lenta de bajo umbral desaparece al añadir Co^{2+} por lo que se debe a una conductancia de calcio. Al potencial de reposo la conductancia responsable de esta despolarización se

encuentra inactivada, y necesita una hiperpolarización de 10-15 mV para deactivarse.

La característica más sobresaliente de las neuronas del septum intermedio es el cambio de un patrón de disparo tónico a disparo en brotes al hiperpolarizar la célula, debido a la existencia de una conductancia para el calcio de bajo umbral. Por tanto, las neuronas del septum intermedio tienen posiblemente las mismas conductancias que se encuentran en neuronas del septum dorsolateral y, además, una conductancia para calcio de bajo umbral ($G_{Ca(LTS)}$).

Neuronas del Septum Medial.

Las células del septum medial generan brotes de potenciales de acción cuando se activan con pulsos despolarizantes de amplitud mayor de 0,2 nA. Los brotes tienen una duración de 20-25 ms y constan de varias espigas (2-6) que progresivamente disminuyen de amplitud y aumentan de duración. Después de estos brotes las células permanecen silentes aunque se mantenga el estímulo (Fig. 2C). Al final del pulso se produce una posthiperpolarización cuya amplitud y duración incrementan al aumentar el grado de despolarización del pulso, y que no se bloquea por 4-AP. La TTX bloquea los potenciales de acción rápidos aunque no afecta a las espigas lentas y de menor tamaño, las cuales aumentan de amplitud al añadir 4-AP a la solución externa. Estas espigas son probablemente resultado de la activación de canales de calcio ya que al añadir Ba^{2+} aumentan de amplitud, y al añadir Co^{2+} desaparecen.

En todas las neuronas del septum medial, después de aplicar pulsos hiperpolarizantes, el potencial de membrana vuelve lentamente a su valor de reposo debido a la activación de una corriente de potasio transitoria. Este retorno al potencial de reposo es resistente a TTX y 4-AP, pero desaparece al añadir Co^{2+} a la solución externa.

Las células del septum medial tienen, por lo tanto, un patrón típico de disparo que no se ha observado en otras estructuras del SNC de mamíferos. Estas neuronas producen brotes de espigas de calcio tras añadir TTX, en contraposición a las neuronas del septum dorsolateral, las cuales en las mismas condiciones experimentales generan también espigas de calcio, pero de forma repetitiva. Esta propiedad puede ser consecuencia de la activación de una conductancia de potasio activada por Ca^{2+} que limita la excitabilidad y produce una posthiperpolarización. Estos resultados sugieren que en neuronas del septum medial existen una conductancia para sodio (G_{Na}), una para calcio de alto umbral ($G_{Ca(FD)}$), dos para potasio dependientes de

voltaje (G_K y G_A) y una para potasio dependiente de calcio ($G_{K(Ca)}$).

En resumen, en el septum existen tres tipos de células, cada una de ellas con distintas propiedades eléctricas, debido a la existencia de diferentes canales iónicos en la membrana. El estudio detallado de la fisiología de las neuronas septales, no sólo en cuanto a sus características biofísicas sino también en relación a la forma en que las células responden a la acción de transmisores y neuromoduladores, requiere por tanto la caracterización previa, con metodología cuantitativa, de las corrientes iónicas responsables de cada tipo de respuesta electrofisiológica.

OBJETIVO GENERAL DEL TRABAJO

El presente trabajo continúa con una de las líneas de investigación de nuestro grupo que trata del estudio de las propiedades electrofisiológicas de neuronas del sistema nervioso central de mamíferos. Este estudio se inició en diferentes estructuras cerebrales, entre ellas el área septal, mediante la técnica de registro intracelular in vitro, lo que permitió una clasificación de los distintos tipos celulares y una caracterización preliminar de las conductancias iónicas responsables de las propiedades funcionales intrínsecas de los elementos neuronales.

Uno de los objetivos generales de este trabajo ha sido profundizar más en el conocimiento de la fisiología de neuronas individuales registrando las corrientes iónicas de forma directa y con una metodología ("patch-clamp") que permite cuantificar los parámetros característicos de las conductancias iónicas de la membrana. Este estudio es de interés no solo porque complementa experimentos previos de nuestro grupo, sino porque existe muy poca electrofisiología cuantitativa realizada en neuronas centrales.

Para llevar a cabo el trabajo se ha puesto a punto una preparación de neuronas septales en cultivo primario que por su estabilidad, geometría y alta densidad de canales iónicos permite obtener registros de corrientes iónicas con la calidad necesaria para el estudio cuantitativo indicado anteriormente.

El otro objetivo general del trabajo ha sido el estudio de la modulación de los canales dependientes del voltaje por neuropéptidos. El mecanismo de acción de los péptidos cerebrales, de gran trascendencia fisiológica y farmacológica, está siendo muy estudiado en los últimos años pero existen muy pocos datos sobre su posible efecto a nivel de las conductancias iónicas de la membrana.

Objetivos

Este trabajo se centra en dos péptidos, TRH y LHRH, que se encuentran en alta concentración en el septum, pero cuyo papel fisiológico y mecanismo de acción se desconocen.

MATERIAL Y METODOS

1. DISPERSION Y CULTIVO DE LAS CELULAS

En la realización del presente trabajo se han utilizado cobayas albinos (cepa Dunkin-Hartley) con un peso comprendido entre 150 y 250 g. El aislamiento de neuronas de los núcleos del septum se realizó a partir de secciones de encéfalo. Una vez obtenidas las secciones, las células se disociaron mediante tratamiento enzimático. A continuación se expone el método utilizado para el aislamiento y cultivo de neuronas septales.

1.1. Obtención de Secciones de Encéfalo

El proceder que se ha seguido en la obtención de secciones de cerebro es similar al utilizado en otros trabajos de este laboratorio (Alvarez de Toledo y López-Barneo, 1988; López-Barneo y Llinás, 1988). Por esta razón se expone, en los párrafos que siguen, sólo un resumen de los detalles más importantes de esta técnica.

Los animales se decapitan, previa anestesia con Tiopental sódico (Pentothal sódico, Laboratorios Abbott, Madrid, España) a la dosis de 25 mg/kg de peso, vía intraperitoneal, con la ayuda de una guillotina (Lética, Barcelona). La calota craneana se expone mediante un corte sagital del cuero cabelludo y, después de rechazar a ambos lados la piel y tejido subcutáneo, se realiza la fractura del hueso frontal a nivel del reborde supraorbitario, lo que permite el levantamiento de los parietales y temporales por sus suturas de unión. Por último, parte del occipital se rechaza caudalmente, quedando la totalidad del encéfalo y cerebelo a la vista del experimentador.

Una vez expuesto el encéfalo en su totalidad se practica la disección de la duramadre y se realizan dos

cortes coronales, uno entre cerebelo y lóbulos occipitales, y otro a nivel medio de los lóbulos frontales. El bloque de encéfalo se extrae con la ayuda de una pequeña espátula, la cual se utiliza también para seccionar los pares craneales que quedan unidos a él, y se deposita suavemente en un baño conteniendo líquido cefalorraquídeo artificial (LCRA, ver Apartado 2. "Soluciones") oxigenado y mantenido a una temperatura entre 4-5 °C. La pieza se deposita sobre un pequeño soporte cubierto con papel de filtro humedecido con LCRA, donde posteriormente se le practican varios cortes coronales a fin de dejarla reducida a un bloque con un grosor de 1 cm aproximadamente. En este bloque la región septal queda comprendida entre los tercios medio y anterior.

Tras la obtención del bloque, éste se fija por su parte más caudal a una cubeta con cianoacrilato y se encasilla mediante bloques de agar para evitar la posible deformación que pueda sufrir el tejido durante el proceso de corte. Antes de proceder al corte del tejido la cubeta se llena con LCRA a fin de mantener sumergido el bloque de cerebro en la solución fría y oxigenada. Las secciones se realizan con un vibratomo (Vibratome 1000, Lancer, San Luis, EEUU) usando hojas de afeitar convencionales, las cuales se han desinfectado previamente con alcohol y lavado con agua destilada. La cubeta conteniendo el bloque de cerebro se fija al recipiente que lleva incorporado el vibratomo, el cual se llena con agua y hielo picado para mantener la preparación a 4-5°C durante todo el proceso de corte.

El grosor de las secciones de cerebro utilizadas fue de 500 μ m. Las distintas secciones de cerebro obtenidas se colocan en una placa de cultivo llena de LCRA frío y oxigenado. De cada una de éstas secciones, utilizando instrumental de microcirugía, se disecciona la zona correspondiente a la región septal, con la cual se lleva a cabo el tratamiento enzimático. La viabilidad de las secciones de cerebro depende, en gran medida, del tiempo empleado en la obtención de las mismas y de una manipulación correcta del tejido.

1.2. Tratamiento y Dispersión Enzimática

Una vez obtenidas las secciones cerebrales correspondientes a los núcleos septales, se procede al tratamiento enzimático de las mismas. El tejido se coloca en un vial que contiene 3 ml de solución salina Earle (Flow Laboratories, Irvine, Escocia), al cual se añaden 0,4 mg/ml de tripsina tipo IX (Sigma, San Luis, EEUU) y 0,05 mg/ml de desoxirribonucleasa II (Sigma). Este vial se mantiene a 37 °C, gaseando sobre su superficie una

mezcla de 95% O₂ y 5% CO₂ en agitación suave y continua, durante aproximadamente 20 minutos.

El contenido del vial se recoge íntegramente en un tubo de centrifuga, el cual se deja reposar el tiempo necesario para que los trozos de tejido se depositen en el fondo. El sobrenadante se retira con la ayuda de una pipeta Pasteur. La dispersión mecánica del tejido se lleva a cabo en la solución de lavado (ver apartado 2. "Soluciones") que contiene 5 mg/ml de albúmina bovina (Sigma), para inhibir la acción de los enzimas, utilizando pipetas Pasteur cuya punta, pulida por calor, es de tamaño cada vez menor. Las células que se van disociando se recogen y se depositan en un segundo tubo.

Una vez que todo el tejido ha sido disociado se procede a una centrifugación a 1000 rpm durante 5 minutos. Se retira el sobrenadante, y se añade medio de cultivo (Medio Mínimo Esencial; Flow), suplementado con 10% de suero bovino fetal (Flow), 2% penicilina-estreptomicina (Flow) y 1% L-glutamina (Flow), en el cual se resuspenden las células. Posteriormente el medio con las células se deposita en la placa de cultivo, en la cual previamente se han colocado varios trozos de vidrio tratados con poli-L-lisina (ver Apartado 1.3. "Cultivo y Mantenimiento").

Las placas de cultivo se mantienen a 37°C en un incubador de CO₂ (Selecta, Barcelona), cuya atmosfera tiene un 92% de humedad relativa y el 5% de CO₂, hasta el momento de la realización de los experimentos.

1.3. Cultivo y Mantenimiento

1.3.1. Tratamiento de los Trozos de Vidrio con Poli-L-Lisina.

El sustrato sobre el cual se mantienen las células en cultivo está formado por pequeños trozos de vidrio delgado (cubreobjetos troceados en piezas rectangulares) tratados con poli-L-lisina. Este tipo de superficie aumenta la viabilidad del cultivo facilitando la unión activa de la célula al sustrato. A continuación se detalla el protocolo utilizado para el tratamiento de los cubreobjetos.

Se parte de una solución 0,15 M Trizma pH 7,4 (Sigma), a la que se añade 1 mg/ml de poli-L-lisina (P.M.=300.000-700.000) (Sigma). Dicha solución se pasa a través de un filtro de 0,22 µm de tamaño de poro (Millipore Corporation, EEUU). A partir de cubreobjetos, se cortan con la ayuda de un diamante trozos de aproximadamente 1,5 x 0,4 cm. Estos trozos se sumergen en alcohol etílico 96% (v/v) (Panreac, Montplet y Esteban,

Barcelona-Madrid) durante 20 minutos. Posteriormente, se recogen con pinzas, se flamean uno a uno para esterilizarlos y se introducen en la solución con poli-L-lisina, en la cual se mantienen durante 16 horas. Una vez transcurrido este tiempo, el lavado de los cubreobjetos se lleva a cabo introduciéndolos sucesivamente en tres reservorios conteniendo agua destilada, cloruro sódico al 0,9% (Panreac) y agua destilada, respectivamente. Estas soluciones son filtradas con un filtro de $0,22 \mu\text{m}$ (Millipore). Posteriormente los cubreobjetos se secan en condiciones de esterilidad (cabina de flujo laminar con luz ultravioleta; Gelaire VB 85, Gelman Instruments, Milán, Italia) y se almacenan hasta el momento de su utilización.

1.3.2. Siliconización del Material de Vidrio.

Tanto los frascos usados durante el tratamiento enzimático como las pipetas Pasteur utilizadas para la dispersión mecánica de las células fueron siliconizados con el fin de preparar la superficie que iba a entrar en contacto con el tejido. Este proceso incluye los siguientes pasos: limpieza del material, siliconización, secado y esterilización. Para la siliconización del material, se baña la superficie interna del mismo con Sigmacote (Sigma) durante unos segundos, y se deja secar. La esterilización se lleva a cabo en un autoclave (Microclave S-477, Selecta), durante 30 minutos a 125°C . Este material se mantiene en condiciones de esterilidad hasta su utilización.

2. SOLUCIONES

2.1. Soluciones Utilizadas en la Preparación del Cultivo

Para el proceso de obtención de secciones de encéfalo se utilizó una solución cuya composición se asemeja a la del líquido cefalorraquídeo de cobaya, citada anteriormente como LCRA. Dicha solución tiene la siguiente composición iónica (en mM): ClNa 124; ClK 5; Cl_2Ca 2,4; CO_3HNa 25; $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 1,2; SO_4Mg 1,3; Glucosa 10. La solución se burbujea continuamente con una mezcla gaseosa de 95% O_2 y 5% CO_2 , con el fin de incrementar su contenido en O_2 y aportar CO_2 a la solución para que el tampón CO_2 -bicarbonato mantenga el pH a 7,4.

La solución Tyrode que se usó durante el proceso de aislamiento de las células, en el transcurso del lavado para diluir los restos de enzima tiene la siguiente composición (en mM): ClNa 140; ClK 4,7; Sacarosa 3;

Hepes 10; Glucosa 5 y Piruvato 5. A dicha solución se le añaden 5 mg/ml de albúmina bovina (Sigma). En esta solución se realiza también el proceso de dispersión mecánica de las células.

2.2. Soluciones de Registro

Las soluciones utilizadas para el registro se detallan en la tabla I. Todas éstas soluciones se pasaron a través de un filtro de 0,22 μm de diametro de poro (Millipore) antes de acceder a la cámara de registro o de ser utilizadas para llenar las micropipetas. A lo largo del texto y en los pies de figura las soluciones son citadas como externas//internas. Todas las soluciones tenían una osmolalidad comprendida entre 290 y 310 mOsm/l. Las soluciones externas fueron ajustadas a un pH de 7,35-7,40 utilizando NaOH o ClH, y las internas a un pH 7,25-7,30 utilizando KOH, CsOH, o ClH.

Las soluciones utilizadas para llenar la micropipeta se consideran soluciones internas, ya que se equilibran rápida y totalmente con el citoplasma celular cuando se usan en la configuración "whole-cell" (Fenwick y col., 1982; Tabares y col., 1989). Esto también se observó en nuestros experimentos, como se comprobará más adelante (ver "Resultados".)

En todos los experimentos se añadió a la solución interna EGTA a concentraciones variables para obtener la concentración de calcio intracelular deseada (Martel y Smith, 1974; Tabares y col., 1989). Para el estudio de las corrientes de sodio y calcio se añadió 5 mM EGTA y para las corrientes de potasio se añadió 10 mM EGTA. A la solución interna 130 Cs se añadió 3 mM ATP-Mg para retardar el lavado de los canales de calcio (Kostyuk, 1984; Cota, 1986; ver "Resultados").

El estudio de las características farmacológicas de las conductancias iónicas, se realizó añadiendo distintos agentes bloqueantes específicos para cada una de ellas. Para bloquear la corriente de sodio y poder estudiar de forma aislada las de calcio o potasio se utilizó Tetrodotoxina (TTX; Sigma) a una concentración entre 1 y 6 μM . En los experimentos en los que se estudió el efecto de neuropéptidos (TRH, LHRH) sobre las conductancias iónicas presentes en neuronas septales, éstos se prepararon disolviendo la hormona en agua destilada a una concentración 100-1000 veces superior a la utilizada. Esta solución "stock" se mantuvo congelada a -20°C y repartida en varias alícuotas de 500 μl con el fin de minimizar el posible efecto desnaturizador de la repetida congelación/descongelación. En el momento de

Tabla I. Soluciones Utilizadas en el Registro.

EXTERNAS

	<u>Estándar</u>	<u>Na·Tris</u>	<u>10Ca</u>	<u>10Ba</u>	<u>Mg·Co</u>
ClNa	130*	80	80	80	80
ClK	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7
Cl ₂ Mg	1	1	-	-	8,5
Cl ₂ Ca	2,5	2,5	10	1	1
Cl ₂ Ba	-	-	-	10	-
Cl ₂ Co	-	-	-	-	1,5
HEPES■	10	-	-	-	-
TRIZMA□	-	70	70	70	70

Los valores se dan en mmol/litro

* En algunos registros se ha utilizado 140 mM Na, manteniendo el resto de los componentes con la misma concentración.

■ HEPES: ácido N-(2-Hidroxietil)piperazina-N'-(2-etanosulfónico)

□ Trizma: Tris(Hidroximetil)aminometano (pH:7,4).

INTERNAS

	<u>Estándar</u>	<u>40Na</u>	<u>130Cs</u>
ClNa	-	40	-
ClK	80	-	-
FK	20	-	-
GluK	30	-	-
Cl ₂ Mg	2	2	2
ClCs	-	90	100
FCs	-	-	30
HEPES	10	10	10

comenzar los registros se añadió a la solución externa la cantidad de neuropéptido deseada.

3. TECNICAS DE REGISTRO

En el presente trabajo se han realizado experimentos en células sometidas a control del potencial de membrana ("voltage-clamp") y, en algunas ocasiones, en células sometidas a fijación de corriente ("current-clamp"). En todos los experimentos se utilizó la configuración de "registro en célula completa" de la técnica de "patch-clamp". El proceder seguido para la obtención de los registros se explica en el apartado 4 ("Proceder experimental"). La instrumentación electrónica se detalla en la sección 3.3. ("Diseño del sistema"). En esta sección nos centramos en el resto del material y equipamiento.

3.1. Descripción General

Además de la instrumentación electrónica que se estudia más adelante, para la realización de los registros se utilizó el material que se describe a continuación.

El movimiento del electrodo se controló mediante un micromanipulador mecánico (NRC, EEUU). Este micromanipulador permite el movimiento del electrodo en las tres direcciones del espacio, al poseer dos ejes dispuestos en horizontal accionados manualmente, y un tercer eje, vertical, que es accionado por un motor eléctrico, con control a distancia, cuya velocidad se ajusta mediante un potenciómetro.

La aproximación de la micropipeta a la célula se controló visualmente con la ayuda de un microscopio invertido (Diaphot-TMD, Nippon Kogaku K.K., Japón). Este microscopio se encuentra situado sobre una mesa antivibratoria (Micro-g, TMC, EEUU) para la absorción de las vibraciones de baja frecuencia. La mesa se apoya a su vez sobre cuatro contenedores con arena para la absorción de las vibraciones de alta frecuencia. Alrededor de la mesa se encuentra situada una jaula de Faraday formada por un armazón metálico recubierto por una malla también metálica, conectada a tierra para aislar la preparación de posibles interferencias eléctricas.

En la platina del microscopio se sitúa una cámara de registro diseñada en nuestro laboratorio y construida con metacrilato, que consta de un compartimento principal en el que se depositan las células, y de otro accesorio en el cual se encuentra el electrodo de referencia y en el que

se realiza la aspiración de la solución que baña las células. Dichas cámaras se encuentran conectadas mediante pequeños conductos que reducen las turbulencias producidas por el sistema de aspiración. El volumen de la cámara de registro es de 0,2-0,3 ml, lo que permite un cambio rápido de la solución externa.

Para realizar el cambio de la solución de registro, se utiliza un sistema que consta de hasta cuatro reservorios conectados a cuatro tubos, los cuales, ya cerca de la preparación, se unen en una entrada común que introduce la solución deseada en la cámara de registro. Los depósitos se encuentran situados a una altura superior a la de la preparación. La solución fluye por gravedad hacia la cámara de registro, y se recoge a través de un tubo de succión, situado en la cámara accesoria y conectado a una bomba de succión situada a un nivel inferior al de la preparación. El volumen de la cámara se controla ajustando la altura del tubo de succión. Este volumen se mantiene lo más bajo posible con el fin de reducir la capacidad entre el electrodo y la solución externa. El tiempo invertido normalmente en el cambio de solución es inferior a los 15 segundos.

La corriente producida al activar las células se visualiza en un osciloscopio (Tektronic 5111A, Tektronix, Inc, EEUU) y se almacena en forma digital en un ordenador IBM PC/AT (IBM Corporation, EEUU).

3.2. Micropipetas

Para la fabricación de las micropipetas se utiliza vidrio blando (bajo punto de fusión), similar al que se usa para la determinación del hematócrito (Hirschmann Laborgerate, RFA) de 1,5-1,6 mm de diametro externo y 1,1-1,2 mm de diametro interno. La técnica utilizada es similar a la descrita por Hamill y col. (1981), de la cual se detallan a continuación los aspectos más importantes.

La fabricación de las micropipetas se llevó a cabo en dos fases: a) estirado del vidrio, y b) pulido de la punta. El estirado del vidrio se realizó con un estirador vertical (Mod. 700D, David Kopf Instruments, Inc., Tujunga, CA, EEUU) en dos etapas sucesivas. En la primera se estira la parte central del electrodo 8 mm para conseguir un diametro interno de unas 200 μm , para ello se hace pasar por la resistencia que calienta el vidrio una corriente de 19 A. En la segunda fase se vuelve a centrar el capilar y se hace pasar por la resistencia una corriente de 13-14 A. En esta segunda etapa, debido a que pequeños cambios en la cantidad de calor dan lugar a grandes variaciones en el diámetro de la punta de la



pipeta, la intensidad de la corriente se controló midiendo la diferencia de potencial entre los extremos de la resistencia mediante un voltímetro digital, de mayor sensibilidad que el amperímetro del estirador.

La segunda fase en la fabricación de las micropipetas, el pulido de la punta, tiene como finalidad, además de reducir el diámetro de la misma, conseguir que la superficie de la micropipeta que va a hacer contacto con la célula sea lisa y regular, evitando con ello que el electrodo dañe la membrana y favoreciendo la formación de sellos de resistencia mayor de 10^9 ohm.

El pulido de las micropipetas se llevó a cabo con una microforja fabricada en nuestro laboratorio. Esta consta de un filamento de platino-10% iridio, de $25 \mu\text{m}$ de diámetro, dispuesto en V colocado en el centro de un anillo de plástico, el cual se adapta al objetivo de 40X de un microscopio invertido (Nikon Inverted microscope TMS). El filamento se calienta conectándolo a una fuente de voltaje constante. Para realizar el pulido de la punta, se coloca el extremo del electrodo frente al vértice del filamento, con la ayuda de un micromanipulador (Mo-103, Narishige Scientific Instruments Lab., Japón) y se hace pasar corriente por el filamento. El proceso de pulido se controla visualmente de forma continua. Al final del proceso de pulido la punta del electrodo tiene un diámetro de $0,5-1 \mu\text{m}$, y una vez lleno con la solución interna tiene una resistencia entre 2-2,5 Mohm.

3.3 Diseño del Sistema

3.3.1. Descripción General.

La unidad utilizada para la activación, adquisición, almacenamiento y análisis de las corrientes iónicas transmembrana está basada en un ordenador IBM PC/AT. Esta unidad consta básicamente de los siguientes elementos:

a) ordenador IBM PC/AT.

b) sistema de estimulación: generador de pulsos programable que proporciona la señal de comando al amplificador.

c) amplificador de "patch-clamp": se utiliza para el registro y acondicionamiento de las corrientes iónicas producidas al estimular eléctricamente las células.

d) sistema de adquisición: convierte la señal analógica registrada en el amplificador en digital para su posterior almacenamiento y análisis.

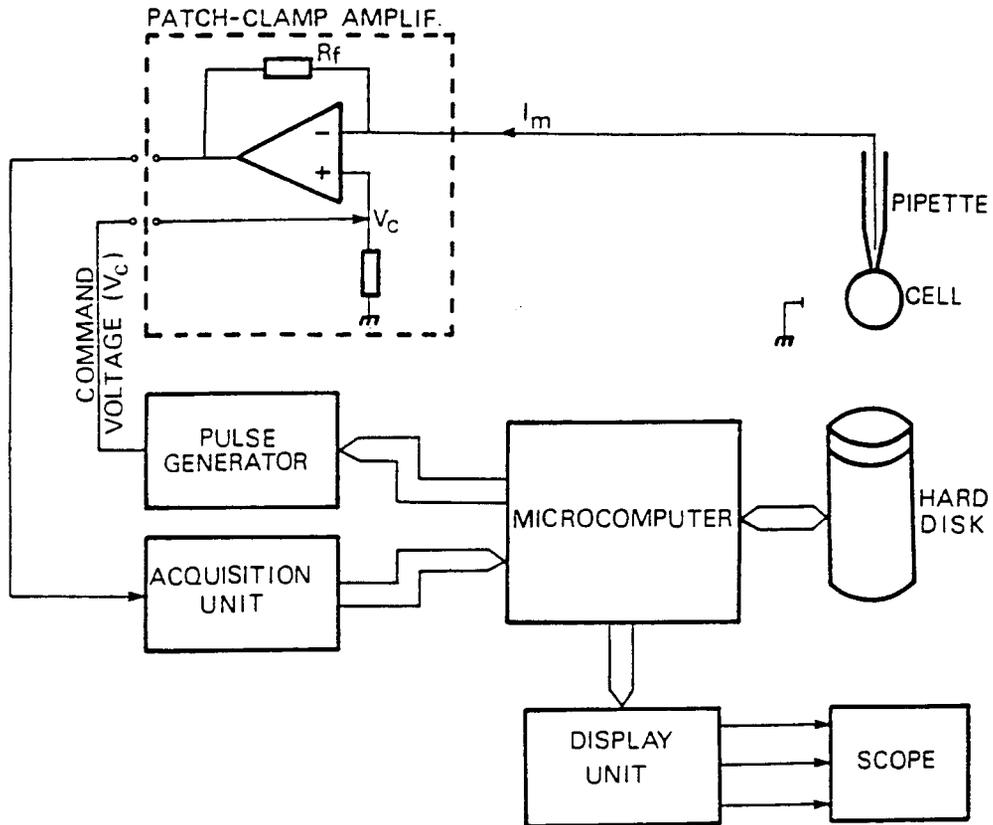


Figura 3. Diagrama de bloques del sistema utilizado para la activación, adquisición, almacenamiento y análisis de corrientes iónicas con la técnica de "patch-clamp". I_m : corriente iónica. R_f : resistencia de realimentación. V_c : voltaje de referencia. (Tomada de Ureña y col., 1989a).

e) sistema de representación en pantalla: convierte la señal digital en analógica y permite la visualización en la pantalla de un osciloscopio de las señales previamente adquiridas.

Un esquema general del sistema de activación, adquisición, almacenamiento y análisis se muestra en la figura 3.

3.3.2. Amplificador de "Patch-Clamp".

El amplificador de "patch-clamp" se utiliza para el registro y acondicionamiento de las corrientes iónicas generadas en la membrana de las células. El equipo usado en la mayoría de los experimentos, que ha sido diseñado y construido en nuestro laboratorio, consta esencialmente de un convertidor corriente/voltaje (I/V), compuesto de un amplificador operacional de muy bajo ruido intrínseco

(Burr Brown OP 111, EEUU) y una resistencia de realimentación (R_r) de 100 Mohm situados en el "head stage", cerca de la preparación (Fig. 4). El amplificador de "patch-clamp" también posee distintas etapas de ganancia, compensación de capacidad, compensación de resistencia en serie, y acondicionamiento del pulso aplicado a la célula. La corriente captada por el electrodo se registra por medio del convertidor corriente/voltaje y es posteriormente amplificada y acondicionada en las distintas unidades del amplificador.

El mismo amplificador utilizado como convertidor I/V se utiliza para controlar el potencial de membrana de las células. Para ello se aplica a la entrada positiva del amplificador una tensión (V_{ref}) constituida por pulsos rectangulares y/o un valor constante.

El amplificador de "patch-clamp" dispone de un sistema para la compensación de las capacidades de la pipeta y de entrada al convertidor I/V, las cuales producen transitorios en la corriente cuando comienza y acaba el pulso en V_{ref} . Un esquema básico del sistema de compensación de la capacidad se muestra en la figura 5B. Esta compensación se lleva a cabo suministrando corriente a través de un circuito en el que no interviene el convertidor para cargar la capacidad de la membrana. Este circuito está formado por un sistema de filtros activos que cambian la forma del pulso en V_{ref} con constantes de tiempo variables. La salida de este sistema de filtros múltiples se aplica a la entrada del convertidor I/V a través de un condensador de 0,1 pF. La compensación de la capacidad se lleva a cabo monitorizando el potencial a la salida del convertidor I/V y modificando la ganancia del amplificador hasta observar la desaparición del transiente capacitativo (Fig. 5A).

Una de las limitaciones del registro en célula completa ("whole-cell"), en relación al control del voltaje, son las resistencias en serie a la entrada del convertidor I/V. En el caso de que las células generen corrientes de gran amplitud se puede producir una caída de potencial entre el interior de la célula y el punto de entrada al amplificador, debido a la existencia de estas resistencias (resistencia del electrodo, resistencia del citosol, etc.; Hamill y col, 1981). El amplificador de "patch-clamp" utilizado en nuestros experimentos posee sistema de compensación de las resistencias en serie, el cual se utiliza para mejorar el control del potencial de membrana aplicado a la célula.

En algunos experimentos, entre ellos los realizados aplicando la técnica de fijación de corriente, se ha utilizado un amplificador de "patch-clamp" comercial (L/M EPC7, List Medical, Darmstadt, Alemania Federal) con una

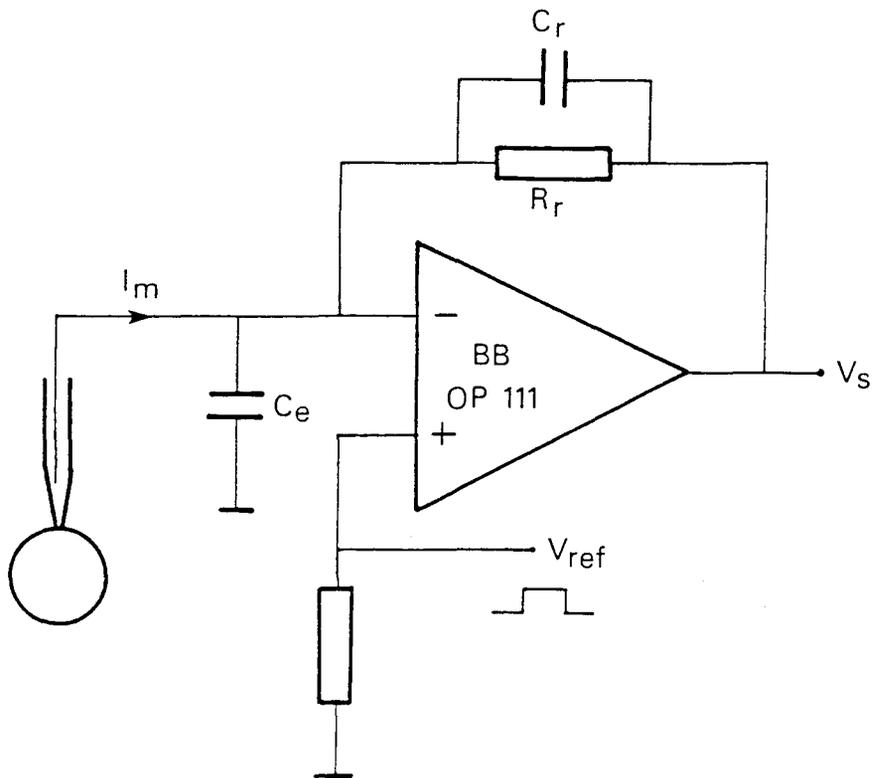


Figura 4. Convertidor corriente-voltaje. R_r : resistencia de realimentación. C_r : componente capacitativo de la resistencia de realimentación. C_e : capacidad de entrada al amplificador. V_{ref} : voltaje de referencia. I_m : corriente iónica. V_s : voltaje de salida.

resistencia de realimentación R_r de 500 Mohm. Tras establecer un sello y aplicar nueva succión (presión negativa) para acceder al interior celular, se procede al cambio de modo de registro de fijación de voltaje a fijación de corriente. En esta situación se inyecta corriente (continua y/o un pulso de corriente constante) a la micropipeta mientras se monitoriza el potencial de membrana.

3.3.3. Generador de Pulsos Programable.

El generador de pulsos se utiliza para modificar el potencial de membrana celular y de esta forma activar las conductancias iónicas dependientes de voltaje. En los estudios de corrientes iónicas totales se estudian distintas características cinéticas de cada tipo de corriente presente en la preparación utilizada. Este generador de pulsos se basa en un convertidor

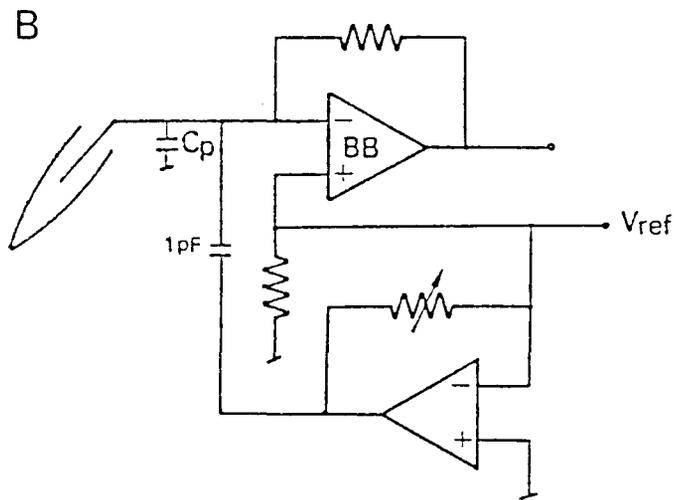
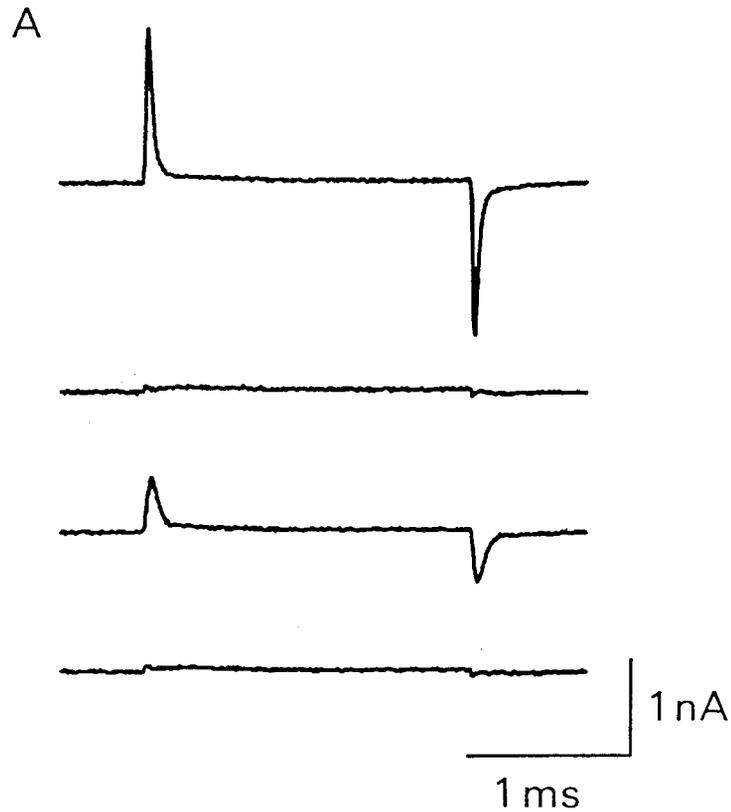


Figura 5. Monitorización del establecimiento de la configuración "whole-cell" (A). Los diferentes trazados muestran de arriba a abajo: corriente capacitiva después de la obtención de un gigasello entre el electrodo y la membrana celular; compensación de la capacidad del electrodo; aumento de capacidad producido al romper el trozo de membrana incluido en la punta del electrodo (formación de la configuración "whole-cell"); compensación de la capacidad debida a la totalidad de la membrana celular. (B) esquema básico del circuito utilizado para compensar la capacidad de la pipeta y la célula.

digital/analógico DAC 0808 (National Semiconductor, EEUU) de 8 bits y una interfase periférica programable IPP 8255A (NEC Microcomputers, Inc.). Tanto el generador de pulsos como el sistema de adquisición y representación en pantalla han sido diseñados y construidos en nuestro laboratorio (Ureña y col., 1989b).

En nuestro estudio se han utilizado 8 protocolos experimentales diferentes diseñados cada uno de ellos para estudiar distintas características de las conductancias iónicas presentes en neuronas del septum, incluyendo el estudio de la cinética de cierre de los canales al finalizar el pulso de estimulación. Estos protocolos son combinaciones distintas de prepulsos y pulsos de amplitud, duración e intervalo interpulsos variables. Los diferentes protocolos experimentales se detallan en "Resultados". Las amplitudes de pulso y prepulso pueden variar de -250 a +250 mV, y la duración de prepulso, pulso e intervalo entre 0,1-1000 ms.

Opcionalmente el pulso de estimulación puede ir seguido de una serie de pulsos de sustracción en número variable ($n=0,2,4$). La amplitud de dichos pulsos es la n -ésima parte de la amplitud del pulso aplicado, su duración igual a la de éste, y polaridad opuesta. Con este sistema de sustracción se eliminan los componentes lineales (corrientes de fuga y capacitativas) de las corrientes totales, con el fin de registrar las corrientes iónicas con la máxima fiabilidad, (Bezanilla y Armstrong, 1977; Ureña y col., 1989b).

3.3.4. Sistema de Adquisición.

Las señales eléctricas producidas en las células son corrientes debidas al flujo de iones (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , etc.) a través de la membrana celular. Las características temporales de estas señales eléctricas exigen disponer de varias frecuencias de muestreo en el sistema de adquisición con objeto de poder analizar los diversos tipos de corrientes con distintos cursos temporales.

El sistema de adquisición utilizado en nuestro trabajo permite operar con velocidades de muestreo seleccionadas desde teclado. Las velocidades de muestreo utilizadas son 10, 20, 50, 100, 200 y 500 μs por muestra. En todos los casos se adquieren 500 puntos para representar cada señal. De estos 500 puntos los 8 primeros se adquieren antes del inicio de la corriente o el proceso de interés, quedando los 492 restantes para definir la corriente.

El proceso de adquisición se encuentra sincronizado con el de estimulación y conlleva la conversión de una

señal analógica en digital, utilizando un convertidor A/D de 12 bits (AD578, Analog Devices, EEUU). Posteriormente la señal es almacenada en la memoria del ordenador utilizado como base del sistema.

3.3.5. Sistema de Representación en Pantalla

Para poder visualizar en un osciloscopio analógico la señal previamente adquirida se ha utilizado un sistema de representación que transmite desde la memoria RAM del ordenador los 500 puntos que constituyen la señal al osciloscopio, a una frecuencia tal que produzca la sensación de persistencia en la pantalla. Con objeto de poder comparar distintas señales, existe la posibilidad de representar simultáneamente dos registros a través de los dos canales del osciloscopio. La representación de la señal en la pantalla del osciloscopio requiere la conversión de la señal digital en analógica. Para ello se utilizan tres convertidores D/A de 12 bits (AD565AK, Analog Devices).

Una vez dispuesta la señal en la pantalla, se utiliza un sistema de tres cursores que permite seleccionar distintos puntos sobre ella, determinar parámetros correspondientes a dichos puntos, o bien el análisis de los intervalos entre cursores mediante una aproximación matemática.

4. PROCEDER EXPERIMENTAL

Las células se mantienen en el incubador de CO₂ a 37°C hasta el momento de comenzar los experimentos. En ese momento se toma uno de los cubres sobre los que se han sembrado las células y se introduce en la cámara de registro llena de solución externa. Esta solución se filtra previamente a través de un filtro de 0,22 μm (Millipore), al igual que todas las soluciones utilizadas a lo largo del experimento.

Las micropipetas una vez llenas con la solución adecuada, según el experimento a realizar, se colocan en el portaelectrodo, asegurándose de que exista contacto entre la solución y el alambre de plata-plata clorurada (Ag-AgCl) conectado a la entrada del "head stage", y se fija firmemente al portaelectrodo. A continuación se sitúa la micropipeta sobre la cámara de registro y con la ayuda del micromanipulador se introduce en la solución que baña las células. Al introducir la micropipeta en la solución se produce un cambio en el nivel de corriente debido a la existencia de un potencial de unión entre el electrodo de

referencia y el alambre de plata conectado al "head stage". Esta diferencia de potencial es resultado de la suma de potenciales de unión producidos en las interfases sólido-líquido (electrodo de referencia-solución externa y solución interna-electrodo) y en la líquido-líquido (solución externa-solución interna). Esta corriente se anula suministrando al punto V_{ref} corriente continua de signo contrario .

Durante el proceso de aproximación del microelectrodo a la célula se monitoriza continuamente la resistencia de la micropipeta, la cual aumenta en el momento de contactar con la superficie celular. La resistencia del electrodo se mide tras introducir éste en el baño. Para ello se aplica un pulso cuadrado de pequeña amplitud (10 mV) a la entrada positiva del amplificador situado en el "head stage", y se mide el valor del voltaje a la salida de este mismo amplificador. El cálculo de la resistencia del electrodo (R_e) se realiza mediante la fórmula:

$$R_e = \frac{V_c \times R_r}{V_s - V_c} \quad (1)$$

en la que V_c es el voltaje aplicado (10 mV), R_r es el valor de la resistencia de realimentación del convertidor corriente-voltaje (100 Mohm), y V_s es el voltaje a la salida del mismo.

La aproximación del electrodo a la célula se realiza con la ayuda del micromanipulador, accionando manualmente los ejes horizontales, y eléctricamente el eje vertical, todo ello realizado bajo control visual. Una vez el electrodo se encuentra en las proximidades de la célula elegida, el control de la operación es a través de la pantalla del osciloscopio, monitorizando el aumento de resistencia del electrodo al contactar con la superficie de la célula. Una vez que el electrodo contacta con la membrana, la aplicación de succión suave (presión negativa) en el interior del electrodo, conduce a la formación de un sello de alta resistencia entre la superficie del electrodo y la celular. La resistencia del sello se encuentra siempre por encima de 5-10 Gohm. La aplicación de nueva succión en el interior del electrodo produce la rotura del trozo de membrana encerrado dentro de la punta del electrodo, estableciéndose un acceso de baja resistencia al interior de la célula y permitiendo el estudio de las propiedades eléctricas de toda la membrana celular. El proceso de establecimiento de la configuración "whole-cell" se monitoriza como un incremento del transiente capacitativo al inicio y fin del pulso de medida de la resistencia del electrodo (Fig. 5A).



5. ANALISIS DE LOS RESULTADOS

5.1. Tratamiento de la Señal.

El sistema de representación en pantalla descrito previamente permite la visualización en la pantalla del osciloscopio de la señal deseada con el fin de proceder a su análisis. Este análisis incluye la determinación de la línea de base, determinación de parámetros que caracterizan la señal, cálculo del área encerrada por la curva, filtrado de la señal en caso de que sea necesario y ajuste de la señal obtenida mediante expresiones matemáticas.

Para llevar a cabo las operaciones mencionadas se requiere la presencia de tres cursores sobre la señal a analizar. Estos cursores se pueden desplazar sobre la señal en pantalla con el fin de posicionarlos sobre los puntos de interés de la misma y delimitar el intervalo objeto de estudio. La determinación de la línea de base permite disponer de una referencia sobre la cual efectuar las medidas de amplitud, así como el ajuste mediante una función matemática de la señal.

En nuestro caso, cuando la señal registrada es una corriente iónica transmembrana, el área encerrada bajo la curva representa la carga eléctrica que atraviesa la membrana en el intervalo de tiempo considerado. La medida de dicho área es aplicada al cálculo de la capacidad de la célula, midiendo la corriente que atraviesa la membrana al aplicar un pulso control (10 mV). Asumiendo que la capacitancia específica de la membrana es en promedio $1 \pm 0,1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ (Cole, 1968), se puede estimar el tamaño aproximado de las células considerándolas con forma esférica. El valor obtenido se compara con el tamaño medido directamente al microscopio (ver "Resultados").

En los casos en que sea necesario se puede llevar a cabo un filtrado digital de la totalidad de la señal o bien del intervalo comprendido entre dos cursores.

El ajuste matemático de una determinada parte de la señal registrada, permite describir de forma precisa el comportamiento cinético de los canales involucrados en el paso de corriente. En la mayoría de los casos (estudio de la cinética de cierre de los canales, estudio de la cinética de inactivación de la corriente, etc.) la señal a analizar puede representarse con gran aproximación mediante una función exponencial. El ajuste exponencial se realiza utilizando el método de los mínimos cuadrados. Con el fin de comparar la señal con la función exponencial obtenida, se pueden representar simultáneamente ambas señales en la pantalla del osciloscopio.

Todos estos procesos de análisis anteriormente detallados pueden ser controlados desde teclado, situando los cursores sobre los registros en las posiciones deseadas y eligiendo la operación a realizar.

5.2. Presentación de Parámetros

El sistema de adquisición y análisis permite en todo momento la visualización en la pantalla del ordenador de distintos parámetros:

a) parámetros asociados a los protocolos utilizados:

- potencial de reposo
- ganancia del amplificador de "patch-clamp"
- velocidad de muestreo
- número de pulsos de sustracción
- características del estímulo
 - amplitud del pulso
 - amplitud del prepulso
 - duración del pulso
 - duración del prepulso
 - "sub-holding potential"
 - intervalo entre prepulso y pulso

b) parámetros asociados a la respuesta: consisten en amplitudes e intervalos temporales correspondientes a puntos delimitados por los cursores, así como medidas de la capacidad de la célula y de la constante de tiempo de la función exponencial que se ajusta a la señal registrada.

RESULTADOS

1. ASPECTO GENERAL DE LAS CELULAS Y PROPIEDADES ELECTRICAS PASIVAS.

Las neuronas septales aisladas y mantenidas en cultivo primario presentan forma esférica u ovoide, y tamaño comprendido entre 12 y 25 μm de diámetro. Durante el proceso de aislamiento las células pierden sus prolongaciones, aunque a medida que transcurre el tiempo de permanencia en cultivo comienzan a emitirlos de nuevo. En este trabajo se utilizaron células que llevaban en cultivo entre 2 y 12 horas y no tenían prolongaciones apreciables al microscopio óptico. En este tipo de preparación se puede conseguir un control uniforme del potencial de membrana y por lo tanto es adecuada para el estudio electrofisiológico cuantitativo mediante la configuración de "whole-cell" de la técnica de "patch-clamp" (ver "Discusión").

El presente estudio se basa en registros realizados en más de 150 células, de los que 127 tuvieron una estabilidad y calidad adecuadas como para ser utilizados en la presentación de los resultados. Todas estas células tenían un aspecto birrefringente al microscopio y aparecían sin muestras de deterioro. En la mayoría de los casos se han obtenido registros estables en la configuración de "whole-cell" durante al menos 15-20 minutos, aunque en algunas células se llevaron a cabo experimentos que duraron más de 80 minutos.

1.1. Capacidad de la Membrana y Estimación de la Superficie de las Células.

En algunas células se midió la capacidad total de la membrana aplicando un pulso de 10 mV una vez establecida

la configuración de "whole-cell" y tras compensar completamente la capacidad debida al microelectrodo. La capacidad (C) se calculó mediante la fórmula:

$$C=Q/V \quad (2)$$

donde Q (cantidad de carga eléctrica) se estimó a partir del área comprendida en el transitorio de corriente capacitativa producido por la aplicación del pulso de voltaje (V). La capacidad media de las neuronas septales fue de $7,90 \pm 3,63$ pF (media \pm desviación estandar, n=87); el valor mínimo fue de 3,26 pF y el máximo de 20,88 pF. Teniendo en cuenta que las membranas biológicas tienen una capacidad de $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ (Cole, 1968), de estos valores resulta, asumiendo una forma esférica, un diámetro medio de $15,8 \mu\text{m}$ lo que se corresponde perfectamente con las medidas realizadas al microscopio.

1.2. Resistencia de la Membrana de las Células en Reposo.

La resistencia de la membrana se midió mediante el registro de la corriente (I) generada durante un pulso de 10 ms de duración y 40 mV de amplitud aplicado a partir del potencial de reposo impuesto a las células ("holding potential", desde -80 mV a -120 mV). La resistencia (R) se calcula por la fórmula:

$$R=V/I \quad (3)$$

El valor medio de resistencia obtenido fue de $1,16 \pm 1,11 \cdot 10^9$ ohm (media \pm DS, n=14). Considerando como diámetro medio $15,8 \mu\text{m}$ y asumiendo una forma esférica, se obtiene para las neuronas del septum una resistencia específica de la membrana de aproximadamente $9 \text{ Kohm} \cdot \text{cm}^2$.

1.3. Diálisis y Sustitución del Medio Intracelular.

Se sabe por experimentos previos en otros tipos celulares (Fenwick y col, 1982; Tabares y col., 1989) que en la configuración de "whole-cell" el medio del interior de la micropipeta reemplaza rápidamente la fase acuosa del citoplasma de las células, permitiendo un control experimental de la composición iónica del medio intracelular. Este hecho también ocurre con relativa rapidez en neuronas septales. Durante experimentos en los que la pipeta de registro contenía Cs^+ en lugar de K^+ , las corrientes de potasio desaparecieron a los pocos segundos tras establecerse el modo de registro en "célula completa". Además, cuando se utilizaron soluciones internas con 40 mM Na^+ , se pudo comprobar directamente el tiempo empleado en producirse la diálisis completa de la solución de la pipeta de registro con el citosol; tiempo

que en todos los casos fue inferior a 15 s. Este estudio se llevó a cabo determinando el potencial de inversión de la corriente de sodio, el cual difería en menos de 1 ó 2 mV del valor del potencial de equilibrio teórico calculado por la ecuación de Nernst (ver Apartado 4.2 "Relación Corriente-Voltaje").

2. EXCITABILIDAD DE NEURONAS SEPTALES EN CULTIVO.

En trabajos anteriores realizados en nuestro laboratorio con la técnica de registro intracelular utilizando secciones de encéfalo *in vitro* se ha demostrado que las neuronas de las diferentes áreas del septum, aunque con patrones de actividad eléctrica variable, generan potenciales de acción rápidos dependientes de Na^+ (López-Barneo y col., 1985; Alvarez de Toledo y López-Barneo, 1988; ver "Introducción"). En el presente estudio, la excitabilidad de las neuronas septales aisladas tras el tratamiento enzimático se comprobó registrando el potencial de membrana con la técnica de "current-clamp" utilizando la misma configuración de registro en célula completa (ver "Material y Métodos").

El registro de potenciales de acción se realizó una vez establecida la configuración de "whole-cell". Tras la adquisición de algunos registros de corrientes iónicas, se cambió el amplificador de forma instantánea del modo "voltage-clamp" a "current-clamp". En los primeros milisegundos que siguieron a esta transición todas las células produjeron uno o dos potenciales de acción y posteriormente el potencial de membrana se mantuvo a un nivel muy despolarizado (entre -40 y -30 mV). Para el registro de potenciales de acción fue por lo tanto necesario inyectar corriente continua a través del electrodo de registro y mantener el potencial de reposo en torno a -80 mV, consiguiendo de este modo la deinactivación de todas las conductancias iónicas dependientes de voltaje (véase más adelante). A partir del potencial de -80 mV, se aplicaron pulsos positivos de corriente para despolarizar la membrana.

Las características generales de los potenciales de acción de neuronas septales se ilustran en la Fig. 6. En la parte A de la figura, se muestra la respuesta generada al aplicar un pulso de 0,24 nA de amplitud y 40 ms de duración desde un potencial de membrana mantenido, mediante la inyección de corriente, a -80 mV. Tras la aplicación del pulso existe una primera respuesta pasiva que produce una despolarización de la célula. Esta despolarización alcanza el umbral para la activación de la corriente de sodio (ver Apartado 4 "Corrientes de sodio"),

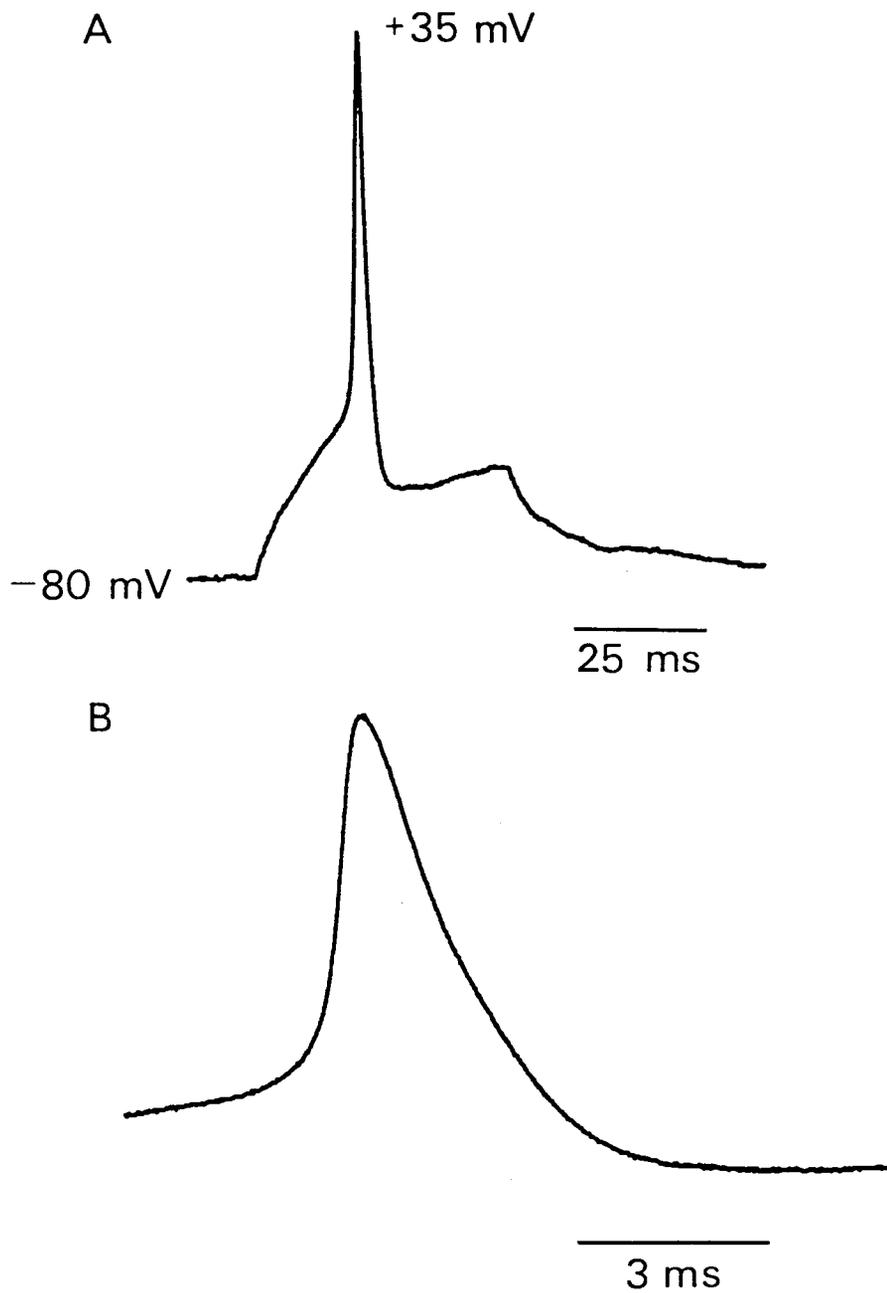


Figura 6. Registro de potenciales de acción en neuronas del septum realizado en la configuración "whole-cell". (A) potencial de acción generado al estimular la célula con un pulso de 0,24 nA aplicado desde un potencial de membrana mantenido a -80 mV. En B se representa el mismo potencial de acción con una base de tiempo más rápida. Soluciones: estándar//estándar.

tras lo cual se produce el disparo de un potencial de acción que hace que el potencial de membrana alcance un valor de 35 mV. Tras la fase rápida del potencial de acción se produce una posthiperpolarización a partir de la cual se comienza de nuevo a despolarizar la célula. Al finalizar el pulso el potencial de membrana vuelve con una trayectoria exponencial al valor de reposo de -80 mV.

En la Fig. 6B se representa, con una base de tiempo más rápida, el mismo potencial de acción. Este trazado ilustra con claridad la fase rápida de despolarización del potencial de acción debida a la activación de los canales de sodio y la repolarización, más lenta, debida a la activación de los canales de potasio. Estos resultados demuestran que las neuronas septales dispersas y sometidas a diálisis del medio intracelular pueden producir potenciales de acción rápidos (duración entre 1 y 2 ms) y de gran amplitud (115 mV pico a pico), similares a los que se registran cuando la estructura tisular está intacta (Alvarez de Toledo y López-Barneo, 1988). Estas observaciones demuestran la viabilidad de nuestra preparación y sugieren que en neuronas en cultivo los canales iónicos de la membrana se conservan funcionales y sin alteración aparente.

3. CORRIENTES IONICAS DE NEURONAS SEPTALES.

En todas las neuronas septales sometidas a "voltage-clamp" la despolarización induce la génesis de corrientes iónicas debidas a la actividad de los canales iónicos voltaje-dependientes de la membrana. Un registro típico de la corriente iónica "completa" producida durante un pulso de despolarización de 6 ms se muestra en la Fig. 7. En este experimento el potencial de reposo fue de -80 mV y la célula se despolarizó hasta un potencial de 20 mV (amplitud del pulso de 100 mV). La composición de las soluciones externa e interna fue la indicada como "estándar" en la Tabla 1 (ver "Material y Métodos").

En el trazado de corriente de la figura se observa tras el inicio del pulso de potencial: a) en primer lugar un componente rápido y transitorio dirigido hacia el interior de la célula; b) posteriormente otro componente dirigido hacia fuera con una cinética más lenta que alcanza un valor máximo estable durante el pulso; c) en el instante de la repolarización se produce un tercer componente caracterizado por un cambio brusco en la dirección de la corriente cuya relajación, una vez terminado el pulso de potencial, refleja el curso temporal del cierre progresivo de canales iónicos.

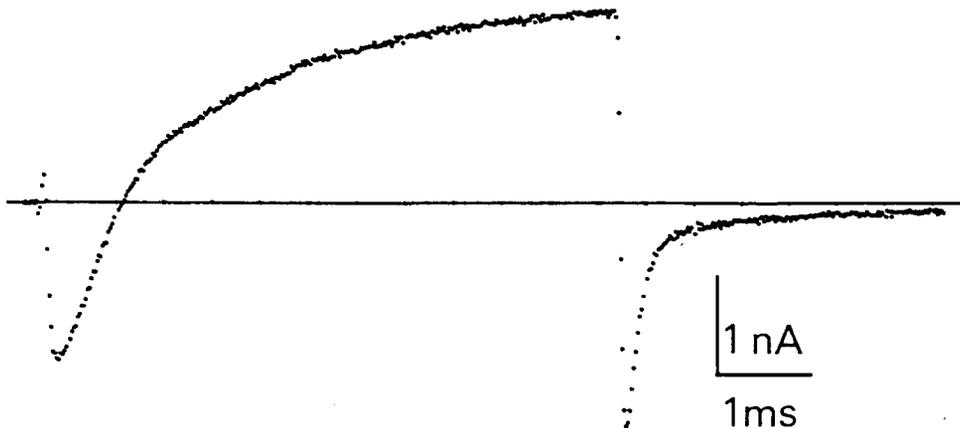


Figura 7. Componentes de la corriente total en neuronas del septum. Corriente generada durante un pulso a 20 mV de 6 ms desde un potencial de reposo (HP) de -80 mV. Durante el pulso se observa una corriente hacia el interior rápida y transitoria, seguida de una corriente hacia el exterior mantenida. Después de la repolarización se produce una corriente de cierre dirigida hacia el interior de la célula. Soluciones: estándar//estándar.

Cada uno de los componentes de la corriente descritos en el párrafo anterior se debe, como se demuestra más adelante, a la activación de tipos distintos de canales iónicos. El primer componente, rápido y transitorio, de la corriente se debe a la actividad de canales de sodio y al flujo de Na^+ desde el exterior al interior de la célula. El segundo componente lo produce la activación de canales de potasio y la salida de K^+ al medio extracelular. El tercer componente refleja el cierre progresivo de canales de calcio que, aunque contribuyen durante el pulso con una corriente hacia el interior de la célula ésta no se observa debido a que su curso temporal es parecido a la corriente de potasio, de una magnitud muy superior.

Aunque en todas las neuronas septales la despolarización induce la génesis de corrientes iónicas con los tres componentes básicos indicados anteriormente, es importante destacar que la contribución relativa de cada componente a la corriente "total" varía de célula a célula, lo cual indica una densidad variable de los distintos canales iónicos. Además de esta variabilidad "cuantitativa" existe entre células distintas una variabilidad "cualitativa" debido a que algunos componentes (sobre todo la corriente de potasio y la de calcio) se deben a la actividad de subtipos de canales distribuidos con mayor o menor densidad en diferentes células. En los apartados siguientes se analizan de forma individualizada cada una de las corrientes iónicas que se

encuentran en neuronas septales y se estudian las propiedades biofísicas de los distintos tipos de canales iónicos.

4. CORRIENTE DE SODIO.

4.1. Identificación y Aislamiento.

La identificación como corriente de sodio del primer componente rápido y transitorio de la corriente "completa" se debe fundamentalmente a que se bloquea en su totalidad en presencia de concentraciones nM de tetrodotoxina (TTX), bloqueante específico de los canales de Na^+ tanto en invertebrados (Narahashi y col., 1964) como en neuronas del sistema nervioso central de mamíferos (Llinás y Sugimori, 1980a y b; López-Barneo y Llinás, 1988). El efecto de TTX sobre una corriente de sodio registrada en neuronas septales se ilustra en la Fig. 8.

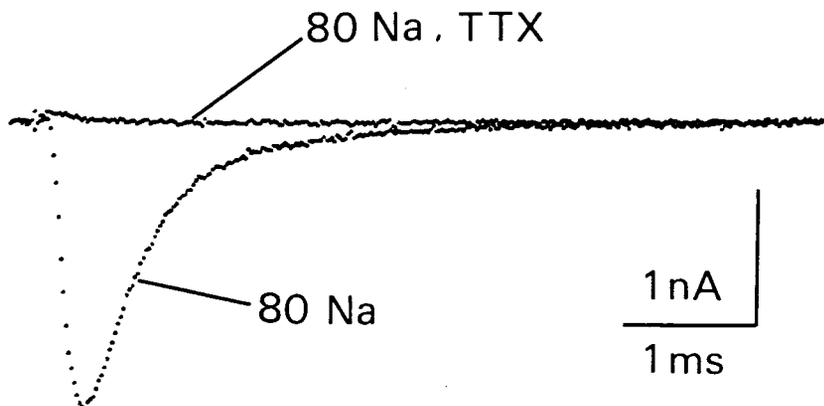


Figura 8. Identificación de la corriente de sodio. Corriente generada durante un pulso a 0 mV desde un HP de -80 mV (80 Na) y efecto de la aplicación de 2 μM TTX a la solución externa (80 Na, TTX). Soluciones: Na·Tris//130 Cs.

La corriente de sodio se registró de forma individualizada sustituyendo los iones que permean por el resto de los canales iónicos (K^+ y Ca^{2+}) por iones impermeables. Normalmente el K^+ interno se sustituyó por Cs^+ (Bezanilla y Armstrong, 1972; solución 130 Cs en Tabla 1 de "Material y Métodos") y el Ca^{2+} externo por Mg^{2+} (Kohlhardt y col., 1972; solución estándar). En la mayoría de los experimentos parte del Na^+ extracelular se sustituyó por Tris^+ (un catión impermeable por los canales de Na^+ , solución "Na·Tris" en Tabla 1) para disminuir la

amplitud de la corriente y de este modo favorecer un control preciso del potencial de membrana.

La Fig. 8 muestra un registro típico de corriente de sodio aislada obtenido en una neurona septal en ausencia de TTX y en las condiciones iónicas indicadas anteriormente. El trazado, que muestra la alta resolución de nuestro sistema de registro y adquisición y un control perfecto del potencial de membrana, es similar al que se obtiene en el axón gigante de calamar (Hodgkin y Huxley, 1952) y en otras preparaciones de mamíferos (Matteson y Armstrong, 1984; López-Barneo y col., 1988; Sah y col., 1988a).

4.2. Relación Corriente-Voltaje.

La corriente de sodio es función del potencial de membrana debido a que esta variable influye no solo en el número de canales que se activan sino también sobre el gradiente electroquímico para los iones. En esta sección se analiza la relación corriente-voltaje (curva I-V) para la corriente de sodio en presencia y ausencia de Na^+ intracelular.

La Figura 9A muestra una familia de corrientes de sodio generadas durante la aplicación de pulsos despolarizantes de 6 ms de duración y de diferente amplitud desde un potencial de reposo de -80 mV. En ella se observa cómo la despolarización a partir de un cierto nivel induce una corriente dirigida hacia el interior de la célula. Esta corriente se activa rápidamente hasta alcanzar un valor máximo y posteriormente se inactiva, también de forma rápida, aun cuando se mantenga la despolarización de la célula. La amplitud de la corriente aumenta a medida que incrementa la amplitud del pulso. Sin embargo, a partir de un potencial de membrana determinado, mayores despolarizaciones producen corrientes cada vez de menor amplitud, ya que el gradiente electroquímico para los iones de sodio decrece de forma progresiva. Dadas las condiciones experimentales utilizadas (solución interna con 130 Cs) no se han aplicado despolarizaciones más positivas de 60 mV, ya que a este nivel la corriente de sodio es inapreciable.

En la curva I-V de la Figura 9B se representa, para la misma neurona, el valor máximo de corriente (ordenada) en función del potencial de membrana durante cada pulso (abscisa). Este gráfico muestra que el umbral para la activación de la corriente se encuentra situado a un potencial algo más negativo de -40 mV. A partir de este potencial, la amplitud de la corriente aumenta a medida que incrementa el grado de despolarización. El valor máximo de corriente se obtiene a un potencial cercano a

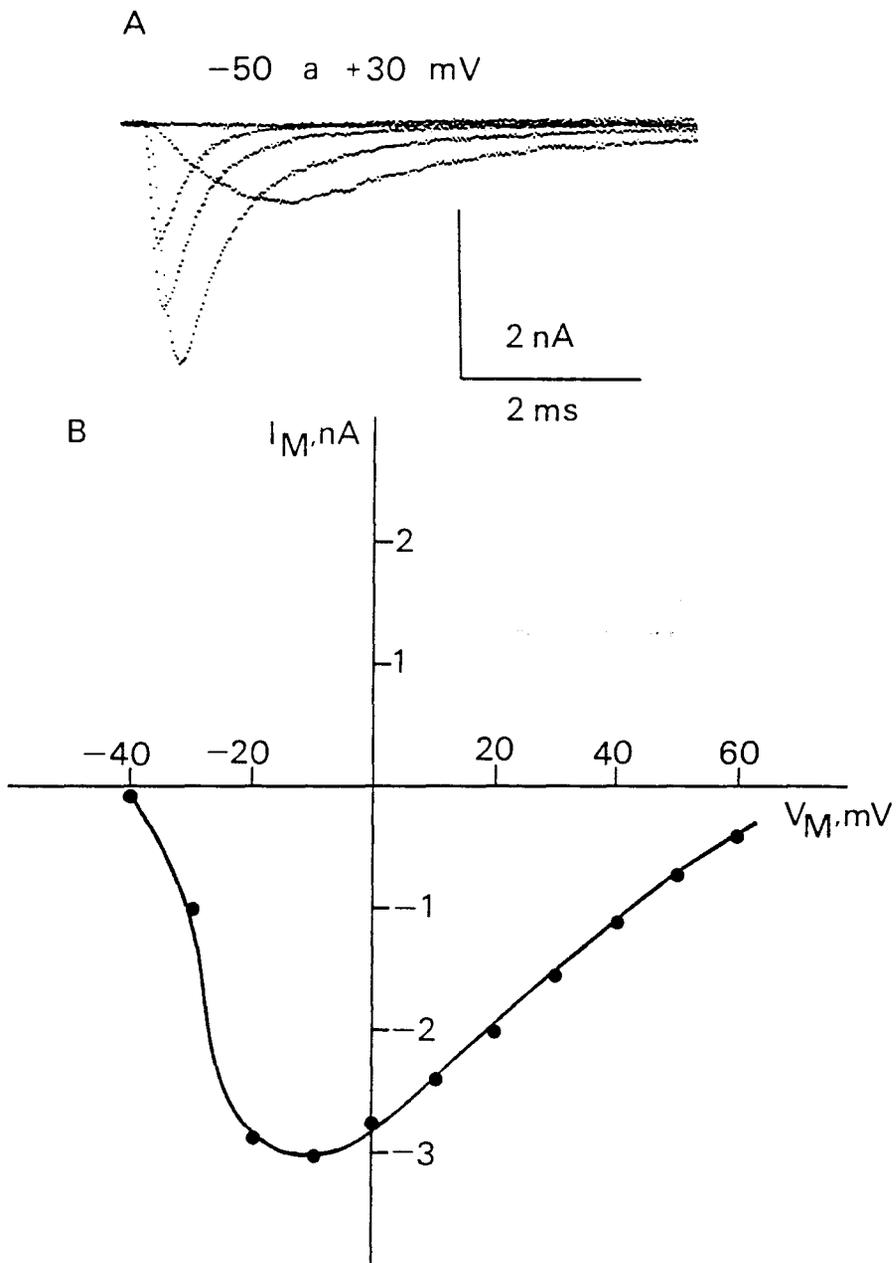


Figura 9. Familia de corrientes de sodio registradas durante despolarizaciones a -50, -30, -10, 10 y 30 mV desde HP=-80 mV (A). La amplitud máxima de la corriente (ordenada) en función del potencial de membrana durante el pulso (abscisa) se representa en B. Soluciones: estándar//130 Cs.

-10 mV y a partir de este punto, y debido a la disminución progresiva del gradiente electroquímico para Na^+ , la amplitud de la corriente disminuye.

Con el fin de analizar la permeabilidad de los canales de sodio al paso de iones Na^+ hacia el exterior de la célula se han realizado experimentos en los que parte del Cs^+ intracelular se sustituyó por Na^+ (solución estándar con 140 Na^+ /40 Na^+). En la figura 10A se representa una familia de corrientes generadas en una neurona en esta situación experimental. Desde el potencial de reposo (-80 mV), se aplican pulsos de 6 ms que fijan el potencial a distintos niveles entre -50 y 90 mV. La amplitud de la corriente aumenta con la despolarización, disminuye con potenciales de membrana positivos y cambia de dirección (flujo de Na^+ desde el citosol hacia el exterior) con potenciales de membrana superiores a 30 mV. La corriente dirigida hacia el exterior de la célula es mayor conforme aumenta el nivel de despolarización, ya que el valor del potencial de membrana se aleja del potencial de equilibrio para los iones de sodio.

La relación I-V para los registros anteriores se representa en la Figura 10B. En ella se observa que el umbral para la activación de la corriente está situado a un potencial algo más negativo de -40 mV. El valor máximo se obtiene con un pulso a -20 mV, y a partir de este punto la amplitud comienza a disminuir al incrementar el nivel de la despolarización. Con las soluciones utilizadas el potencial de equilibrio para el sodio (calculado mediante la ecuación de Nernst) es de 31,55 mV. En la curva I-V se observa que el potencial al cual la corriente de sodio cambia de dirección (potencial de inversión) está situado a un voltaje algo más positivo de 30 mV, lo que indica que los canales de sodio seleccionan fuertemente a Na^+ frente a otros iones y que la solución de la pipeta de registro se equilibró completamente con la fase acuosa del citosol (ver Apartado 1.3. "Diálisis y Sustitución del Medio Intracelular").

Como se ha comentado anteriormente, la mayoría de los experimentos sobre corrientes de sodio se han realizado utilizando 80 mM Na^+ en la solución externa. Al reducir la concentración externa de sodio de 130 a 80 mM disminuye el gradiente electroquímico para dicho ión, por lo que se aprecia una reducción de la amplitud de la corriente para un mismo nivel de despolarización. En estas condiciones iónicas se mejora el control del potencial de membrana aplicado a la célula, al reducir los posibles problemas derivados de la existencia de resistencias de acceso a la célula. En la Figura 11 se representa la curva corriente-voltaje obtenida en una célula bañada en una solución externa con la mezcla $\text{Na}^+\cdot\text{Tris}$. Si se compara con la curva I-V de la Figura 9 (solución externa con 130 mM Na^+) se puede apreciar que aunque la amplitud de la corriente es distinta en cada caso, la curva I-V no presenta grandes variaciones respecto a la dependencia del voltaje y en

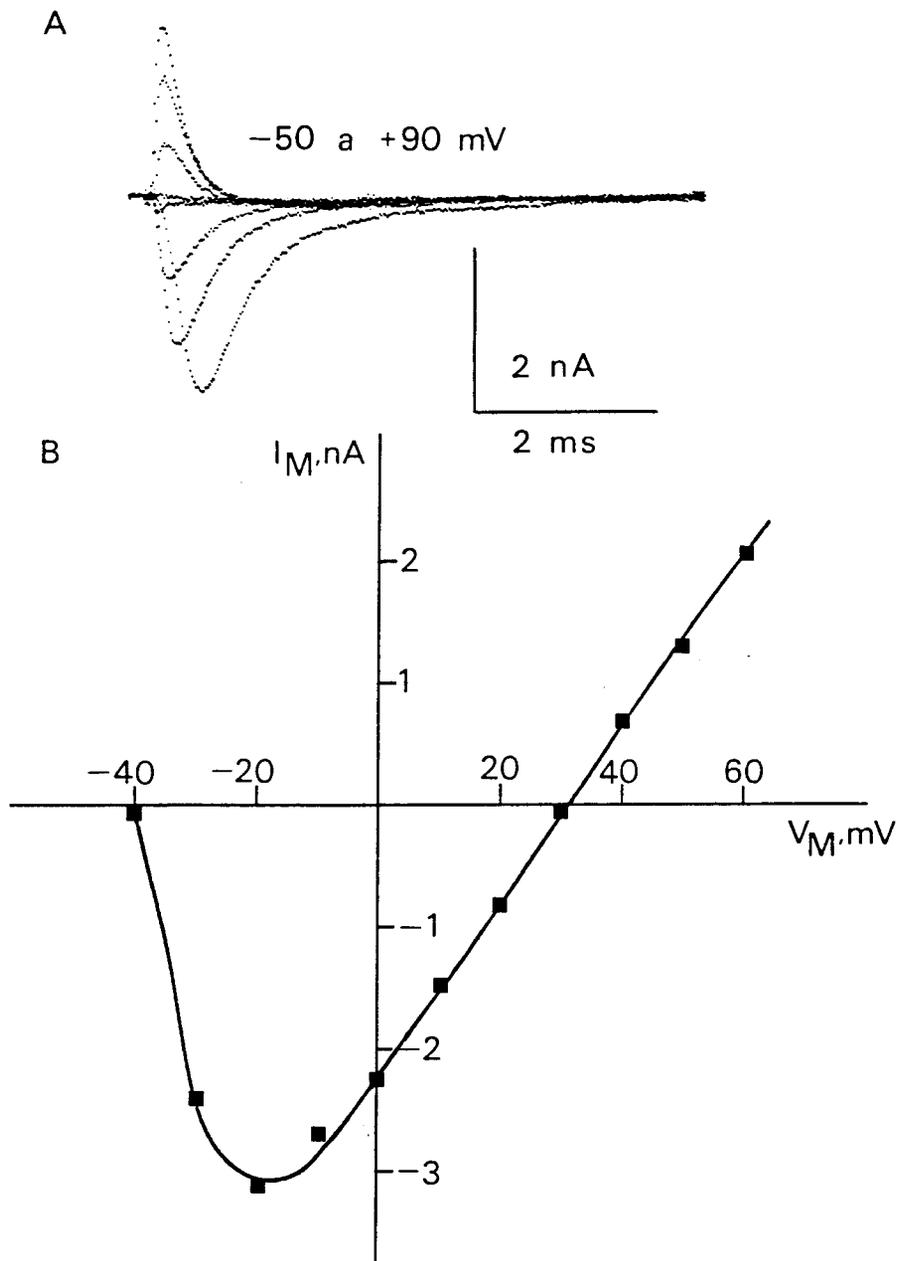


Figura 10. Familia de corrientes de sodio hacia adentro y hacia afuera registradas durante despolarizaciones entre -50 y 90 mV (salto 20 mV) desde HP=-80 mV (A). En B se representa la amplitud máxima de la corriente (ordenada) en función del potencial de membrana durante el pulso (abscisa). Soluciones: estándar (140 Na)//40 Na.

ambas la corriente máxima se obtiene al mismo valor de potencial de membrana (V_M).

La comparación de las relaciones corriente-voltaje en diferentes células ilustra también la variabilidad en la amplitud de la corriente de sodio que se registra en

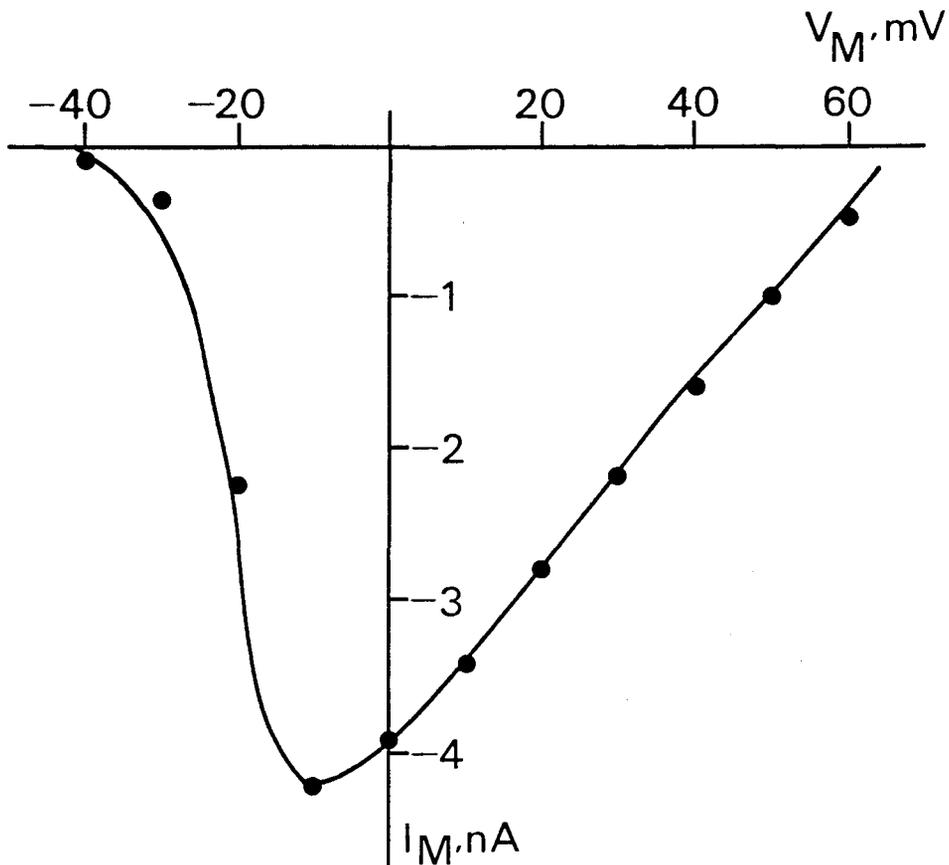


Figura 11. Relación corriente-voltaje para la corriente de sodio con soluciones: Na·Tris//130 Cs. La amplitud máxima de la corriente (ordenada) se representa en función del potencial de membrana durante el pulso (abscisa). HP=-80 mV.

neuronas septales. Utilizando soluciones estándar//130 Cs (solución externa con 130 mM Na^+) la amplitud de la corriente de sodio generada durante un pulso desde -80 hasta 0 mV es de $4,62 \pm 1,69$ nA (media \pm DS, $n=21$). Cuando se utiliza la solución externa con la mezcla Na·Tris (solución externa con 80 mM Na^+) la amplitud media de la corriente producida por el mismo estímulo es de $2,83 \pm 1,33$ nA (media \pm DE, $n=49$).

4.3. Activación y Deactivación.

Curva conductancia vs. voltaje.

En la curva I-V descrita en la sección anterior la corriente iónica varía con el potencial de membrana y el gradiente electroquímico para Na^+ ; el análisis aislado de la activación de los canales de sodio en función del potencial de membrana se puede realizar con mayor detalle

mediante la relación conductancia-voltaje (curva $g_{Na}-V$) en la que se calcula para cada potencial de membrana el valor del gradiente electroquímico (Hodgkin y Huxley, 1952). Para la medida de la relación $g_{Na}-V$ se utilizaron soluciones estándar//40 Na, que permitían definir, como se ha indicado anteriormente, el potencial de equilibrio de forma precisa.

Para el cálculo de la relación $g_{Na}-V$ se escogieron solamente experimentos en los que el control del potencial de membrana fue perfecto. En algunas células, al aplicar pulsos de pequeña amplitud desde un potencial de reposo de -80 mV, se observaron corrientes de sodio que se generaban con un retraso apreciable tras la aplicación del pulso y mostraban una morfología inusual (fig. 12). Este fenómeno produce una discontinuidad en la curva $g_{Na}-V$ y es el resultado de la falta de control en el voltaje aplicado a la célula, bien debido al gran tamaño de algunas neuronas, que hace que existan zonas del interior celular que no se encuentren al voltaje deseado, o a la existencia de un sello de baja resistencia. Estos registros, como se indicó anteriormente, no se utilizaron para el análisis y se muestran en esta sección para ilustrar una de las posibles fuentes de error en el estudio de la dependencia de los canales de sodio del potencial de membrana.

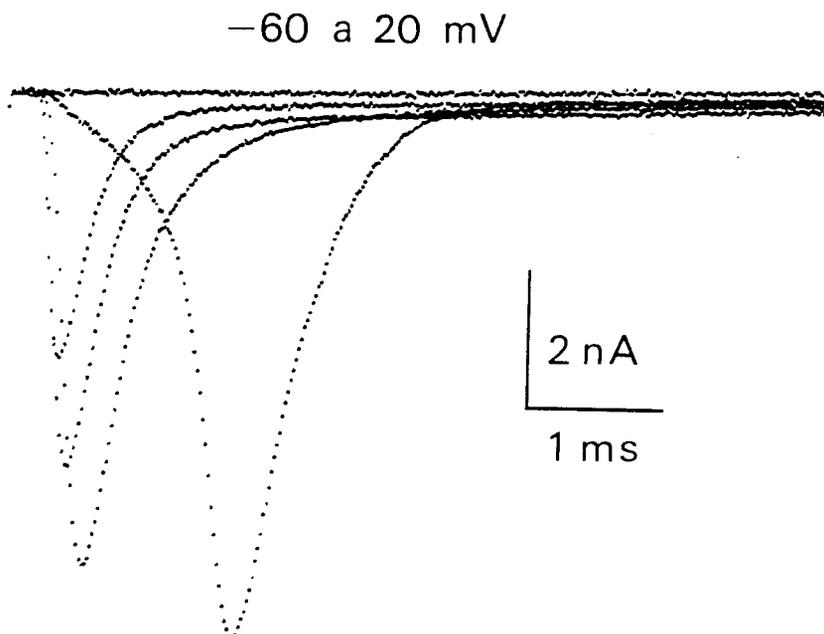


Figura 12. Corrientes de sodio registradas en una neurona con control defectuoso del potencial de membrana. Registros obtenidos con despolarizaciones a -60 , -40 , -20 , 0 y 20 mV desde $HP=-80$ mV. Soluciones: Na·Tris//130 Cs.

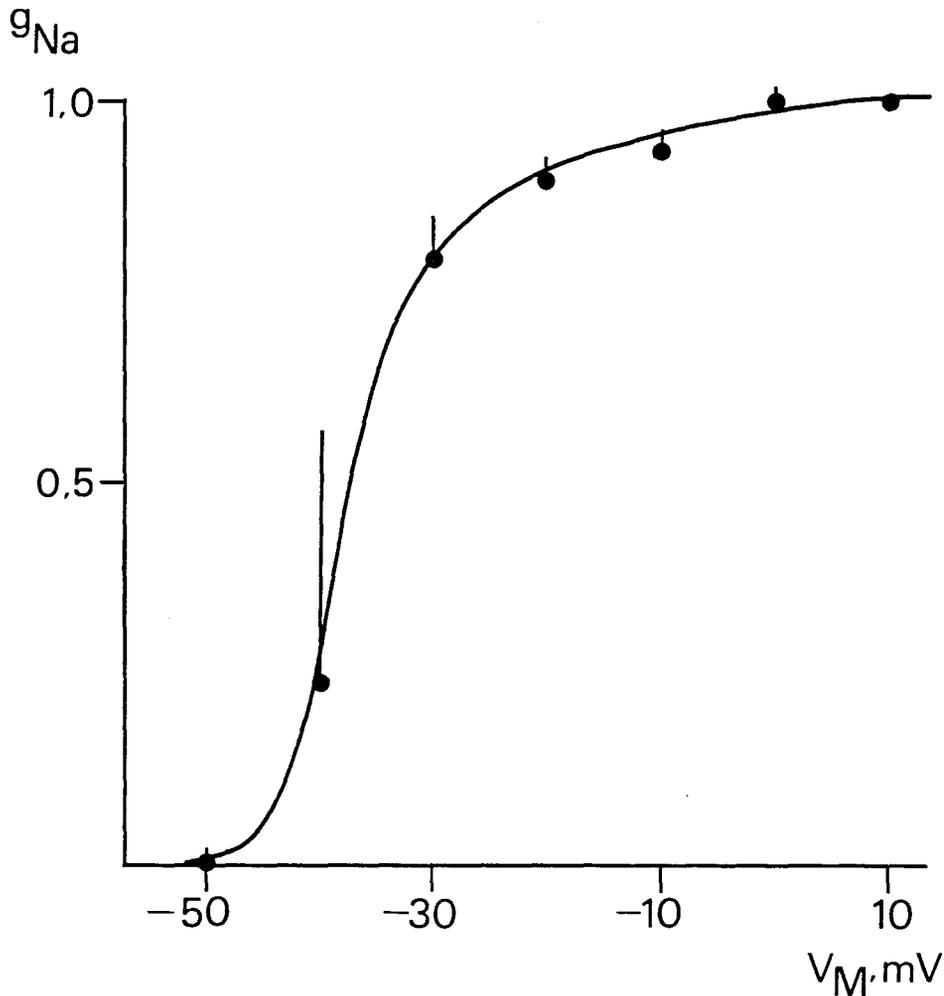


Figura 13. Relación conductancia-voltaje para la corriente de sodio. La conductancia (ordenada) se estimó a partir de la amplitud máxima de la corriente durante pulsos a diferentes potenciales de membrana (abscisa). HP=-80 mV. Los símbolos representan el valor medio de medidas realizadas en tres células, las barras indican los valores de la desviación estándar. Soluciones: estándar//40 Na.

La curva de activación de la corriente de sodio de neuronas septales se muestra en la Fig. 13. Los puntos de la gráfica se obtuvieron a partir de la curva I-V aplicando la fórmula:

$$g_{Na} = I_{Na} / (V - V_{Na}) \quad (4)$$

en la que I_{Na} es la corriente máxima para cada valor de potencial aplicado a la célula (V) y V_{Na} es el potencial de equilibrio para el sodio. En la ordenada se representa normalizado el valor de g_{Na} , y en la abscisa el correspondiente valor del potencial de membrana. El umbral

para la activación de los canales de sodio está situado a un nivel algo más negativo de -40 mV. La conductancia máxima se alcanza a un potencial de 0 mV y se mantiene con despolarizaciones aun mayores. El 50% de la conductancia máxima se obtiene alrededor de -35 mV. Estos datos indican que a 0 mV el 100% de los canales de sodio funcionales están abiertos y que solo el 50% se activan a -35 mV. La conductancia máxima de los canales de sodio tiene un valor medio de $90,6 \pm 33,1$ nS (media \pm DE, $n=3$).

Cinética de activación.

En las familias de corrientes de sodio que se muestran en las Figuras 9 y 10 se aprecia que la rapidez con la que la corriente de sodio alcanza el valor máximo también depende del potencial de membrana. Para cuantificar los cambios en la cinética de activación en

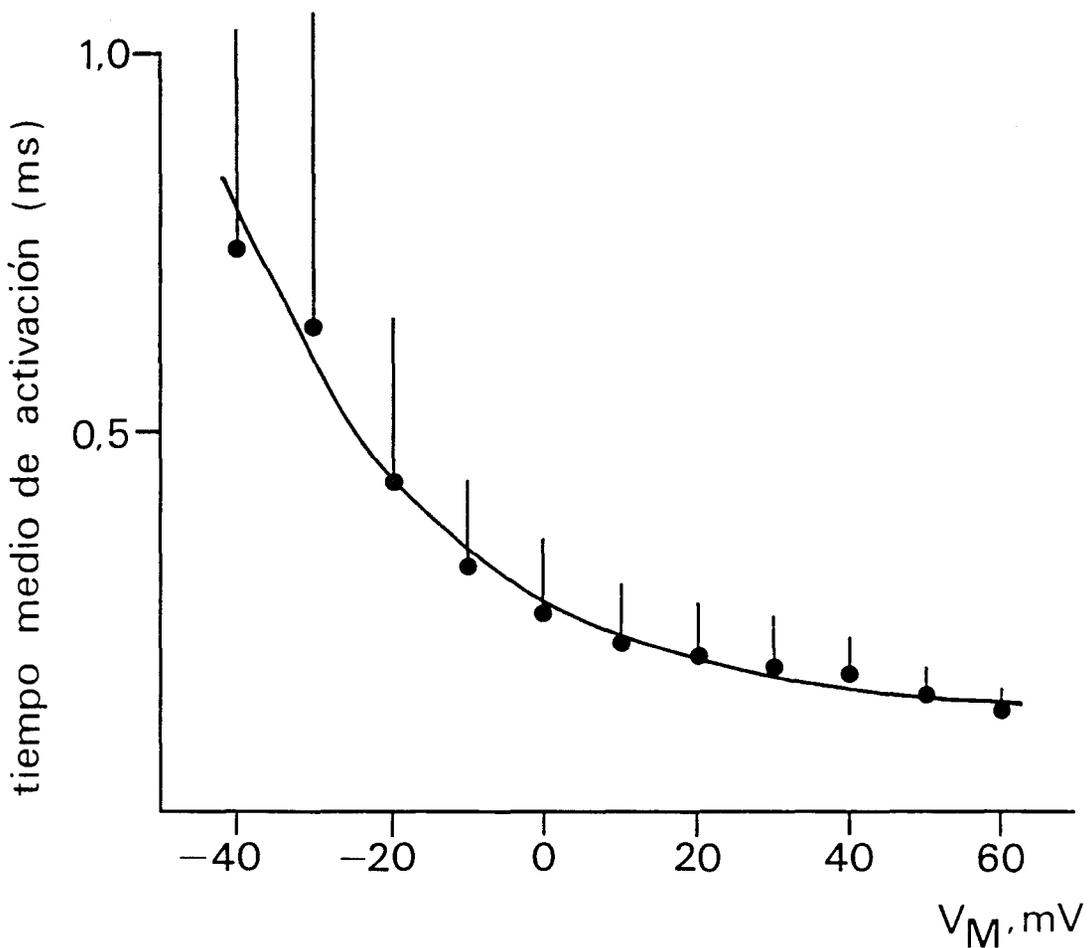


Figura 14. Tiempo medio de activación de la corriente de sodio. La gráfica representa el tiempo que tarda en alcanzarse el 50% de la amplitud máxima (ordenada) durante pulsos a diferentes potenciales de membrana (abscisa). $HP=-80$ mV. Los símbolos y las líneas verticales indican los valores medios (\pm DE) de medidas realizadas en 10 células.

función del voltaje se determinó el tiempo que tarda la corriente en alcanzar el 50% de la amplitud máxima ($t_{1/2}$) para cada valor de V_M .

En la figura 14 se representa con medidas realizadas en varias células el $t_{1/2}$ de activación (ordenada) en función del voltaje aplicado en cada pulso (abscisa). Se observa que a medida que se incrementa la amplitud del pulso la activación es más rápida, es decir se alcanza en menor tiempo el valor máximo de la corriente. El $t_{1/2}$ de activación para despolarizaciones hasta 10 mV es de $0,226 \pm 0,077$ ms (media \pm DE, $n=10$).

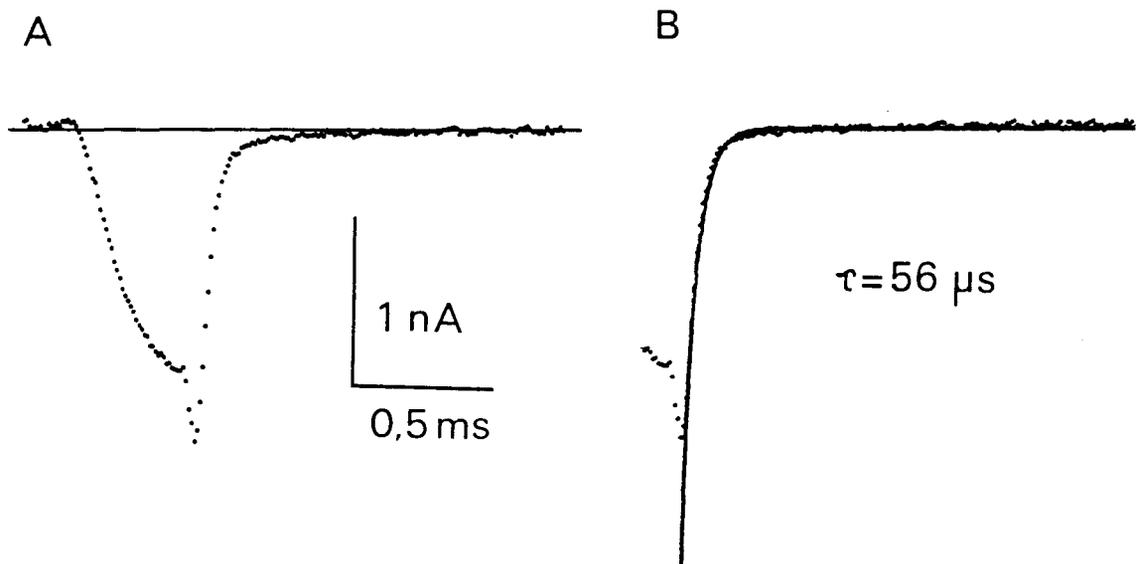


Figura 15. Cinética de cierre de los canales de sodio. (A) Corriente de sodio generada durante un pulso a 0 mV de 500 μ s. (B) El curso temporal de la deinactivación de la corriente puede ser ajustado mediante una función exponencial (línea continua) con una constante de tiempo de 56 μ s. HP=-80 mV. Soluciones: Na-Tris//130 Cs.

Cinética de deactivación.

La cinética de cierre de los canales de sodio se estudió mediante la aplicación de pulsos de corta duración, con el fin de repolarizar la célula en el momento en que la conductancia es máxima y aún no se ha producido la inactivación de la corriente. En el presente trabajo se utilizaron pulsos de duración entre 0,5 y 1,5 ms.

En la figura 15A se muestra la corriente de sodio generada al despolarizar la célula hasta 0 mV durante 500 μ s. Al final del pulso se produce un aumento brusco de la amplitud de la corriente debido al incremento en el



gradiente electroquímico para Na^+ y el flujo de estos iones a través de los canales durante el tiempo que están abiertos. La deactivación de la corriente presenta un curso temporal que, como se ilustra en la parte B de la figura, se puede ajustar mediante una sola función exponencial. El valor de la constante de tiempo de la deactivación a -80 mV varió entre 49 y 114 μs con un valor medio de $74,75 \pm 29,34$ μs (media \pm DE, $n=4$).

4.4. Inactivación.

En los trazados de corriente de sodio que se muestran en las figuras anteriores se observa que ésta tiene dos procesos cinéticos claramente diferenciables. La corriente se activa rápidamente hasta alcanzar un valor máximo (activación) y posteriormente, aunque se mantenga despolarizada la célula, disminuye progresivamente de amplitud hasta que desaparece. A este proceso de "relajación", descrito inicialmente por Hodgkin y Huxley (1952) en el axón gigante de calamar, se le denomina inactivación y se debe al cambio conformacional que sufren los canales de sodio cuando se les aplica una despolarización prolongada.

Inactivación en estado estacionario.

El porcentaje de canales de sodio que están inactivados a diferentes potenciales de membrana (h_∞ en la terminología de Hodgkin y Huxley, 1952) se estudió mediante el protocolo experimental que se ilustra en la parte inferior de la figura 16. Se registró la corriente durante un pulso hasta 0 mV aplicado desde un potencial de membrana determinado por un prepulso de amplitud variable y de 50 ms de duración. En la figura 16A se muestra la corriente generada durante el pulso cuando el potencial mantenido durante el prepulso fue de -100 , -80 , -50 y -20 mV. Se observa que a medida que aumenta el nivel de despolarización previo, la corriente que se registra durante el pulso es progresivamente menor. En la figura 16B se representa la amplitud máxima de la corriente que se produce durante cada pulso (ordenada) frente al valor de V_M del prepulso (abscisa). La amplitud de la corriente está normalizada con respecto al valor máximo de corriente que se obtiene con prepulsos de -10 a -20 mV. El potencial de membrana al que se encuentra inactivada el 50% de la corriente es aproximadamente -48 mV. A -80 mV (que es el potencial de membrana usado normalmente) alrededor del 5% de los canales se encuentran inactivados, siendo necesaria una hiperpolarización (hasta -100 mV) para conseguir la deinactivación de la totalidad de los canales. A potenciales más positivos de -20 mV la corriente de sodio se encuentra totalmente inactivada.

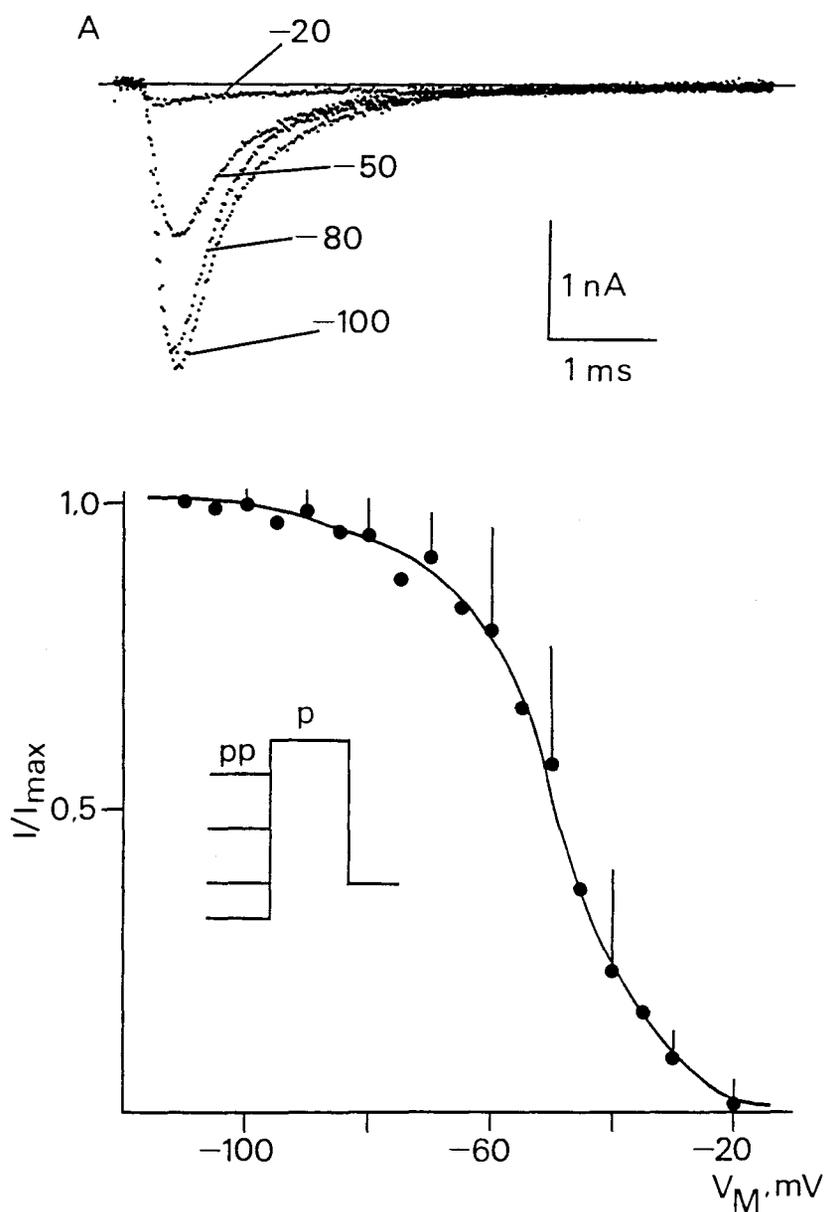


Figura 16. Inactivación en estado estacionario de la corriente de sodio. (A) Corrientes de sodio generadas durante un pulso control a 0 mV después de la aplicación de prepulsos de 50 ms a -100, -80, -50 y -20 mV. (B) La gráfica representa la amplitud máxima de la corriente (ordenada) durante el pulso control (p) en función del potencial de membrana aplicado durante el prepulso (pp; abscisa). Soluciones: Na·Tris//130 Cs.

Curso temporal de la inactivación.

Durante la aplicación de un pulso de despolarización, la corriente de sodio alcanza un valor de conductancia máximo y posteriormente se inactiva. Este cambio de conductancia, medido por la amplitud de las corrientes de cierre, se ilustra en la Figura 17 donde se observa claramente que la amplitud de la corriente de cierre (proporcional a la conductancia y por lo tanto al número de canales abiertos) que se produce al repolarizar la membrana en el instante donde la corriente es máxima es muy superior a la corriente que se registra tras pulsos de mayor duración que terminan cuando la corriente está parcialmente inactivada.

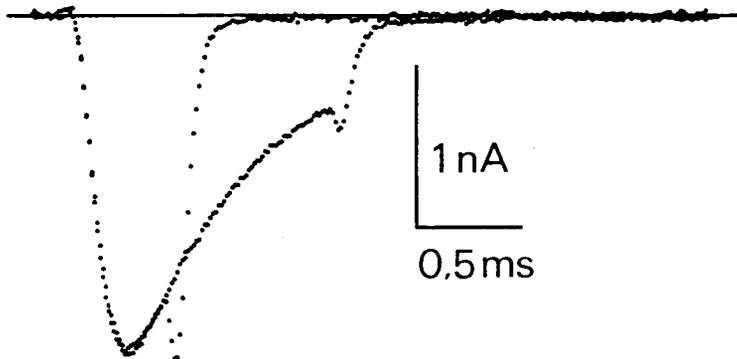


Figura 17. Curso temporal de la inactivación de la corriente de sodio. Corrientes de sodio generadas durante pulsos a 0 mV de 0,5 y 1,2 ms de duración. La amplitud inicial de la corriente de cierre es proporcional al número de canales que se encuentran abiertos en ese instante. Soluciones: Na-Tris//130 Cs.

La inactivación es un proceso cuya cinética es de primer orden y por lo tanto sigue un curso exponencial. En la figura 18A se muestra un registro obtenido al despolarizar una neurona durante 6 ms a 10 mV y superpuesta una función exponencial extrapolada al inicio del pulso y que se ajusta perfectamente al curso temporal de la corriente. La constante de tiempo de esta función exponencial ($501 \mu\text{s}$ en el ejemplo de la figura) es también función del potencial de membrana. En la Fig. 18B se representa con mediciones realizadas en varias células el valor de la constante de tiempo (τ) de la función exponencial (ordenada) en función del potencial de membrana que se alcanza durante los pulsos de despolarización (abscisa). Se observa que a potenciales de membrana negativos, la constante de tiempo varía muy poco en función del V_M aplicado. A partir de -20 mV , su valor disminuye a medida que aumenta la despolarización. La

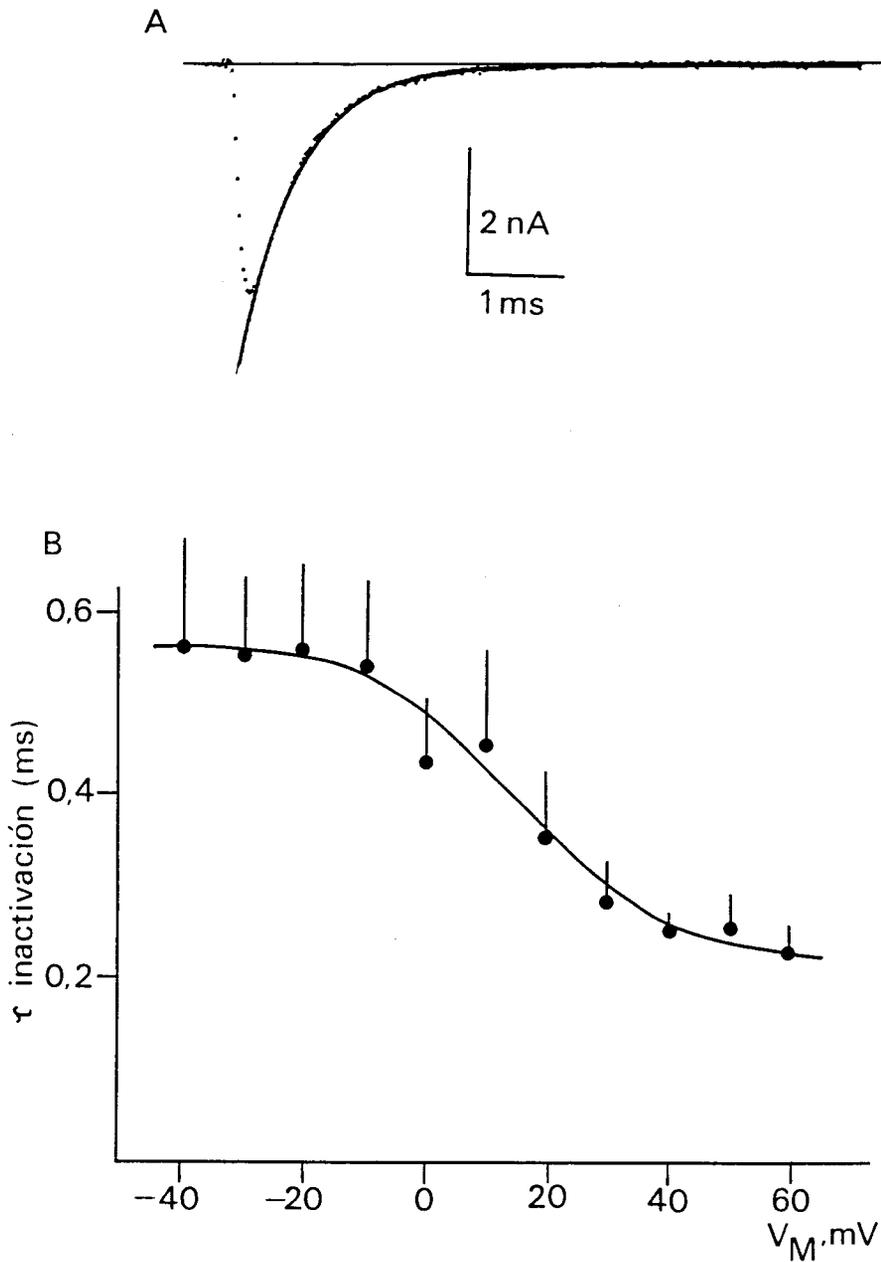
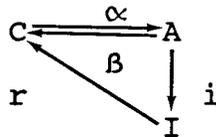


Figura 18. Curso temporal de la inactivación de la corriente de sodio. (A) Corriente de sodio registrada durante un pulso a 0 mV. La inactivación es ajustada mediante una función exponencial con una constante de tiempo de 0,501 ms (línea continua). (B) La gráfica representa la constante de tiempo de la inactivación (ordenada) medida en registros obtenidos durante pulsos a diferentes potenciales de membrana (abscisa). Los símbolos representan el valor medio de medidas realizadas en cinco células, las barras indican los valores de la desviación estándar. HP=-80 mV. Soluciones: Na·Tris//130 Cs.

constante de tiempo del proceso de inactivación con un pulso a 0 mV es de $0,436 \pm 0,086$ ms (media \pm DE, n=5).

Recuperación de la inactivación.

Los canales de sodio una vez que se inactivan pueden volver al estado cerrado (y por tanto vuelven a ser activables) mediante la transición que se representa por r en el esquema cinético



Este proceso denominado "recuperación de la inactivación" depende del campo eléctrico al que se someten los canales y progresa con el tiempo. El protocolo experimental que se utilizó para analizar la recuperación de la inactivación se muestra en la Fig. 19. Se aplica un prepulso (pp) de amplitud (80 mV) y duración (50 ms) suficiente para inactivar la corriente de sodio, seguido de un intervalo (i) de duración variable a distintos potenciales de membrana. Tras el intervalo se estimula la célula con un pulso (p) a 0 mV y 6 ms de duración. La amplitud de la corriente durante el pulso se compara con la generada con un pulso de igual amplitud y duración pero en ausencia de prepulso y al potencial de membrana en reposo (-80 mV).

En la figura 19 se muestran registros de corriente durante el pulso en ausencia de prepulso (control) y 10 y 25 ms después de un prepulso. Cada grupo de corrientes se obtuvieron a diferentes potenciales de membrana (-80, -100 y -120 mV) durante el intervalo. La amplitud de la corriente durante el pulso (indicativo del grado de recuperación de la inactivación) es mayor con intervalos más largos y con V_M más negativos. El experimento completo que se llevó a cabo en esta célula se resume en la Fig. 20, donde se representa la amplitud de la corriente producida a distintos tiempos tras la inactivación (ordenada) en función del potencial de membrana mantenido durante el intervalo (abscisa). La recuperación de la inactivación sigue una función exponencial cuya constante de tiempo refleja la dependencia de este proceso de V_M . A un potencial de membrana durante el intervalo de -80 mV la constante de tiempo es de 18 ms y la deinactivación total se produce a los 500 ms, mientras que a -120 mV la constante de tiempo es de 3 ms y la recuperación se produce en 50 ms.

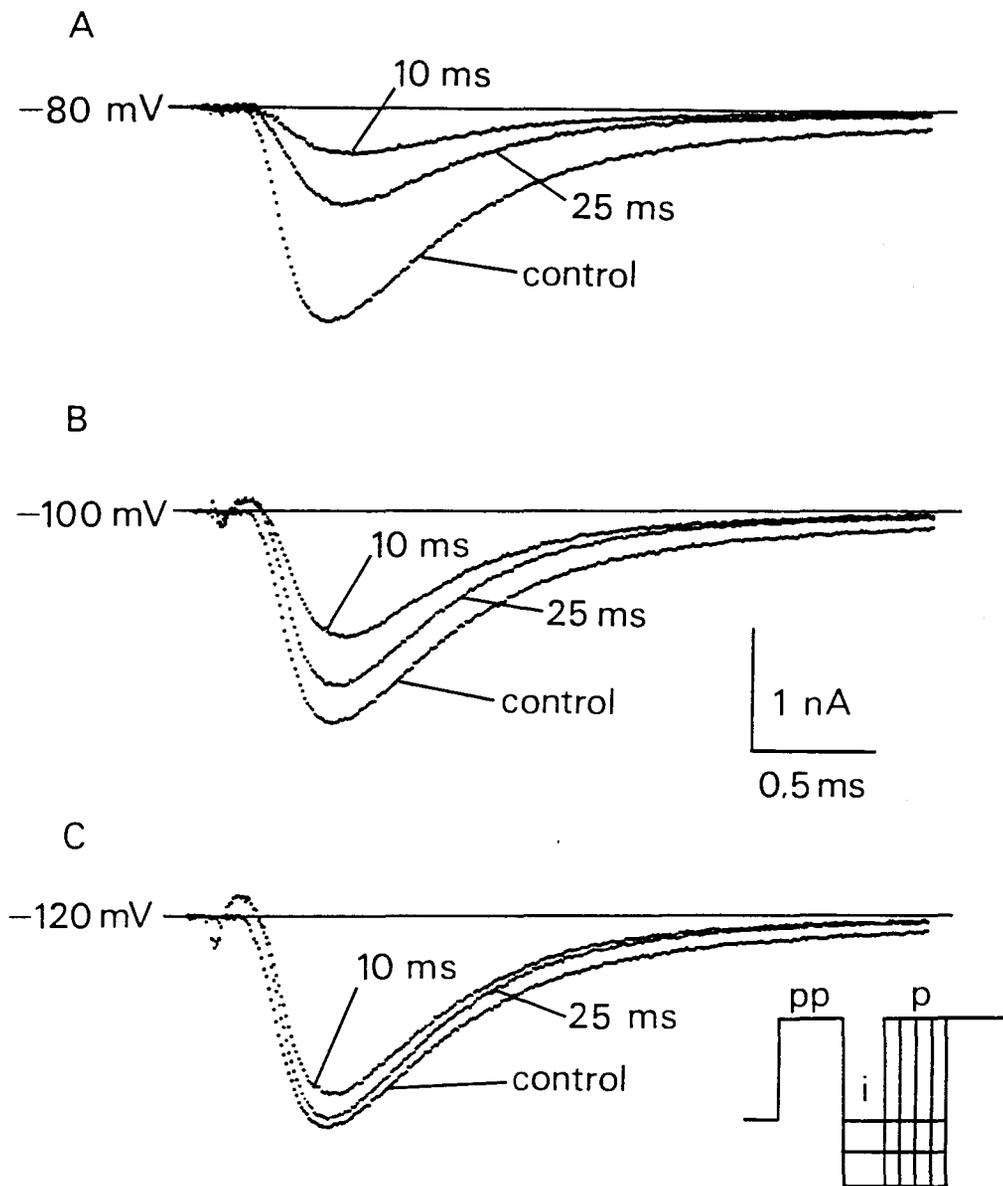


Figura 19. Recuperación de la inactivación de la corriente de sodio. Corrientes de sodio registradas durante un pulso (p) a 0 mV en ausencia de prepulso (control), y 10 y 25 ms después de la aplicación del prepulso (pp), a un potencial de membrana durante el intervalo (i) de -80 (A), -100 (B) y -120 mV (C). En la parte inferior de la figura se muestra un esquema del protocolo experimental. Soluciones: Na·Tris//130 Cs.

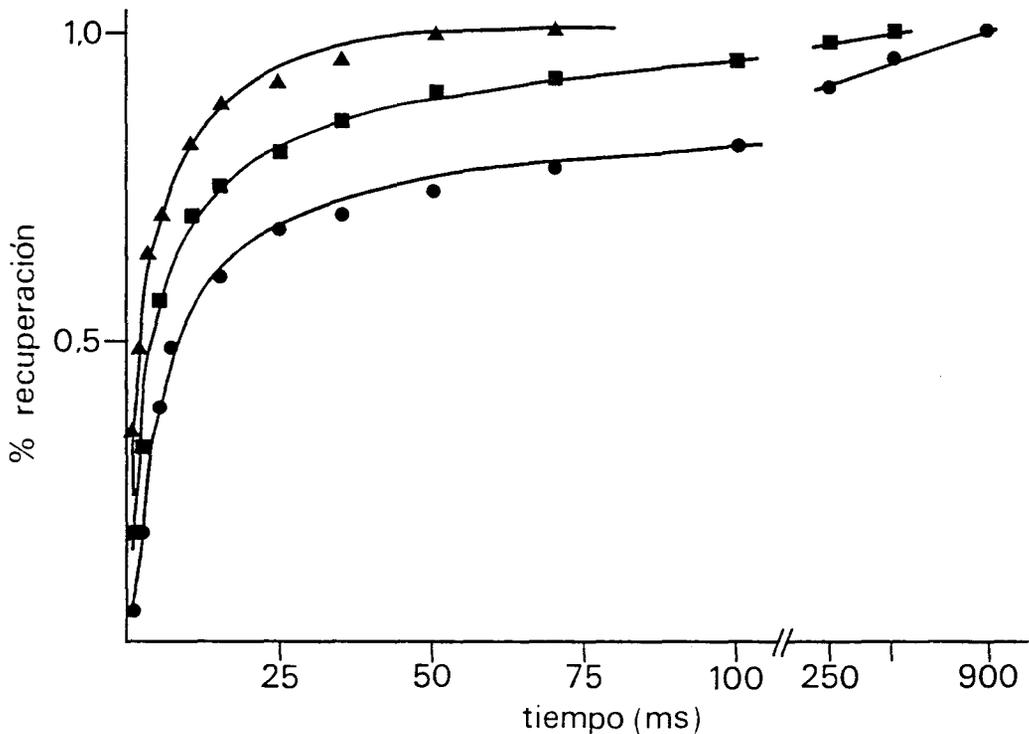


Figura 20. Recuperación de la inactivación de la corriente de sodio. La gráfica representa la amplitud máxima de la corriente normalizada (ordenada) en función del tiempo transcurrido desde la aplicación del prepulso (abscisa) a diferentes potenciales de membrana durante el intervalo. (●) : -80 mV, (■) : -100 mV y (▲) : -120 mV. Soluciones igual que en Fig. 19.

4.5. Cambios Producidos en la Corriente de Sodio Durante el Proceso de Diálisis.

Aunque en cada preparación los canales iónicos están definidos por parámetros dependientes del potencial de membrana, existen evidencias que sugieren que durante el proceso de diálisis, necesario en la técnica de "voltage-clamp" en célula completa, se producen modificaciones en algunos de estos parámetros (Fernández et al., 1984; Tabares et al., 1989). En esta sección se muestra que la curva I/V de la corriente de sodio de neuronas septales sufre un desplazamiento hacia voltajes más negativos conforme progresa el tiempo de diálisis.

La figura 21A muestra corrientes de sodio registradas 30 y 600 segundos después de establecer la configuración "whole-cell" por la aplicación de un pulso de la misma amplitud y duración. La corriente generada a los 600 segundos tiene una cinética de activación más rápida que la que se registró al inicio del experimento. El efecto del tiempo de diálisis se observa también claramente

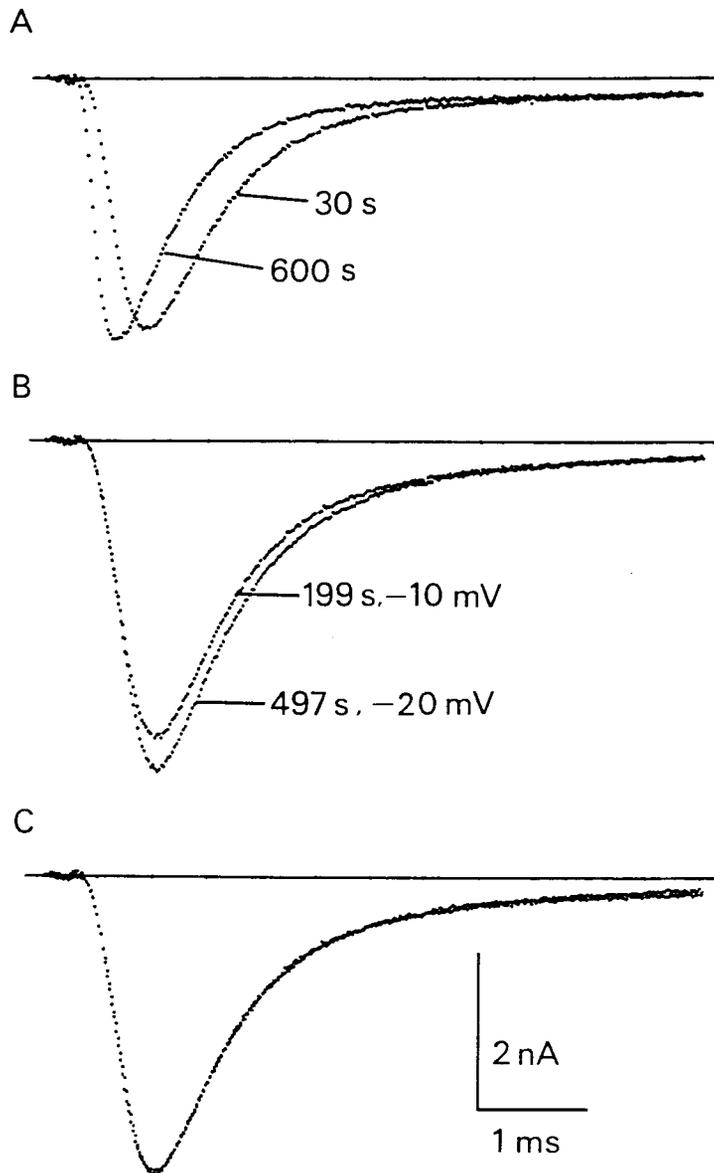


Figura 21. Cambios en la corriente de sodio durante la diálisis. (A) Corrientes de sodio generadas 30 y 600 segundos después del comienzo del registro durante un pulso a 0 mV. (B) Corrientes de sodio producidas durante pulsos a -10 mV y a -20 mV, 199 y 497 s, respectivamente, después del comienzo de la diálisis. Estos mismos registros son escalados hasta obtener la misma amplitud para comparar sus cursos temporales (C). HP=-80 mV. Soluciones: Na·Tris//130 Cs.

mediante el examen de las curvas corriente-voltaje obtenidas en una misma célula 1, 8 y 11 minutos después de establecer la configuración "whole-cell" (fig. 22). Esta figura muestra un desplazamiento hacia voltajes negativos de la curva I/V de 5 a 10 mV. La magnitud de este desplazamiento se ilustra también en los paneles B y C de la figura 21. En B se superponen dos trazados

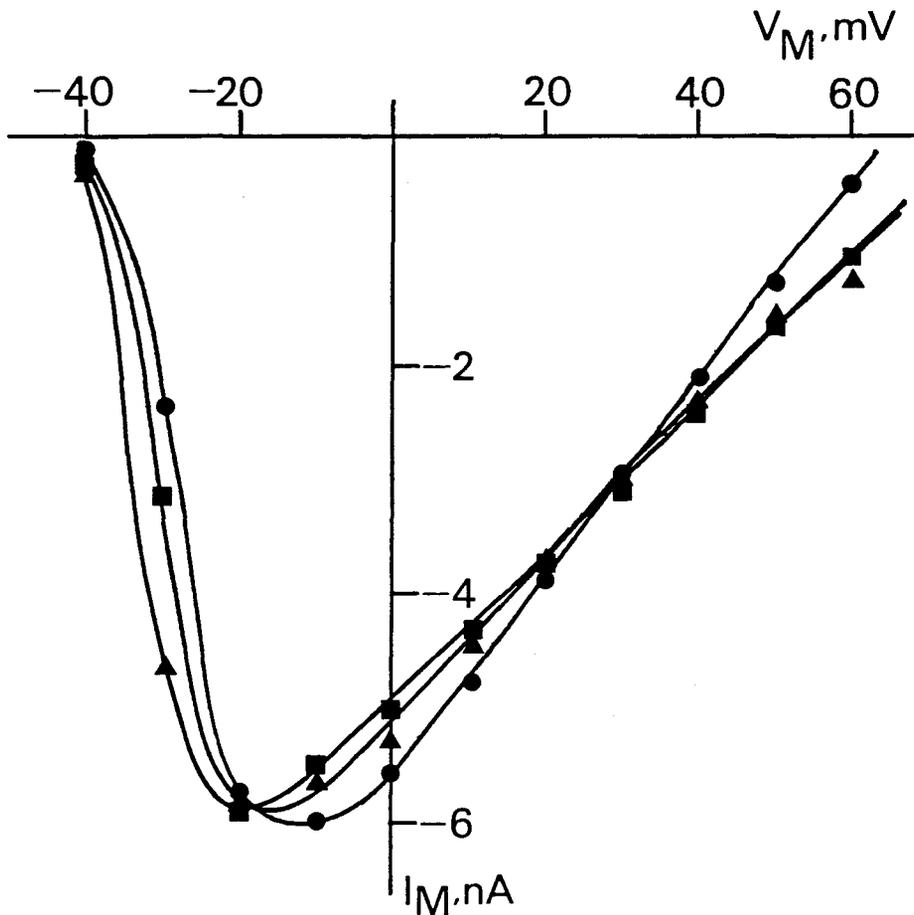


Figura 22. Relación corriente-voltaje de las corrientes de sodio registradas en una misma célula a distintos tiempos desde el comienzo de la diálisis. Se representa la amplitud máxima de la corriente (ordenada) en función del potencial de membrana aplicado durante el pulso (abscisa) 1 (●), 8 (■) y 11 (▲) minutos después del inicio del experimento. HP=-80 mV. Soluciones: Na·Tris//130 Cs.

registrados con una diferencia temporal de 5 minutos por despolarizaciones a -10 y a -20 mV. La amplitud en cada caso es muy parecida y la cinética (como se muestra en C donde los dos barridos están escalados a la misma amplitud) es idéntica.

Nuestros resultados indican, por lo tanto, que durante los primeros 10-15 min de diálisis la corriente de sodio sufre una transformación en sus parámetros dependientes del potencial de membrana consistente en un desplazamiento de aproximadamente 10 mV hacia potenciales más negativos. Este desplazamiento cesa, en general, a los 30 minutos después del establecimiento de la configuración "whole-cell". La adición de 3 mM ATP-Mg a la solución interna produce un enlentecimiento de este proceso, pero sin llegar a impedirlo.

5. CORRIENTES DE CALCIO

5.1. Aislamiento e Identificación.

Para el estudio de la corriente de calcio se utilizaron soluciones internas con cesio como catión predominante (solución 130 Cs en Tabla 1 de "Material y Métodos") para abolir el componente debido a la corriente de potasio. En estas condiciones experimentales (Fig. 23 trazado A) la despolarización hasta 20 mV produce solamente corriente hacia el interior de la célula generada por la actividad de canales de sodio y calcio. El componente transitorio inicial, debido a la actividad de canales de sodio, se bloquea por la presencia de 2 μM TTX a la solución externa. El componente resistente a TTX (trazado B en Fig. 23) refleja el curso temporal de la corriente de calcio en completo aislamiento. La corriente de calcio tiene una activación lenta y a este potencial alcanza un valor máximo a los 2-4 ms que se mantiene durante los 6 ms que dura el pulso. En el instante de la repolarización se produce una típica corriente de mayor amplitud que, como se ilustra más adelante, es de gran utilidad para el análisis de la deactivación de los canales de calcio.

La identificación de la corriente de calcio se realiza por lo tanto por ser resistente a TTX y porque disminuye de amplitud cuando parte del Ca^{2+} de la solución externa se sustituye por Co^{2+} y Mg^{2+} , bloqueantes inorgánicos de los canales de calcio (Kohlhardt y col., 1972). En la mayoría de las preparaciones la corriente de calcio aumenta en amplitud cuando el Ca^{2+} externo se sustituye por Ba^{2+} (Hagiwara y col., 1976).

5.2. Permeabilidad a Ba^{2+} y Bloqueo por Co^{2+} y Mg^{2+} .

Se sabe desde hace tiempo que los iones Ba^{2+} permean mejor que Ca^{2+} a través de algunos tipos de canales de calcio (Hagiwara y col., 1976). Con el fin de confirmar este hecho en los canales de calcio de neuronas septales se realizaron experimentos en los que se sustituyó parte del calcio extracelular por bario.

El trazado a de la figura 24A muestra la corriente generada en una neurona septal al aplicar un pulso de 6 ms a un potencial de 10 mV, desde un potencial de reposo de -80 mV, cuando la solución externa contiene 10 mM Ca^{2+} (solución 10 Ca en tabla 1). En el trazado b se ilustra la corriente producida en la misma célula al aplicar un pulso con una solución conteniendo 1 mM Ca^{2+} y 10 mM Ba^{2+} (solución 10 Ba en tabla 1). No se sustituyó totalmente el Ca^{2+} extracelular ya que la utilización de solución

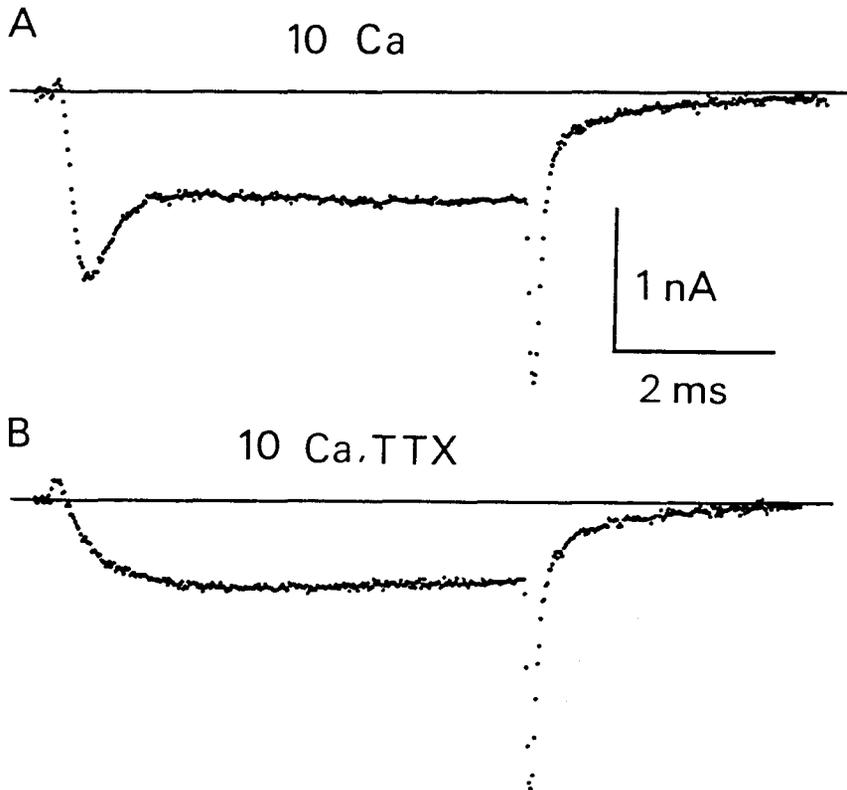


Figura 23. Aislamiento de la corriente de calcio. Corrientes de sodio y calcio (A) generadas al aplicar un pulso a 20 mV con soluciones 10 Ca//130 Cs. La adición de 2 μ M TTX a la solución externa permite aislar la corriente de calcio (B). HP=-80 mV.

externa libre de calcio produce un incremento en la corriente de fuga (Armstrong y López-Barneo, 1987).

La comparación de los registros a y b indica que tanto la corriente que se genera durante el pulso como la corriente producida al repolarizar la célula presentan mayor amplitud cuando el Ba^{2+} sustituye al Ca^{2+} como ión portador de corriente. En este caso, la amplitud de la corriente para un mismo potencial de membrana es aproximadamente un 30% mayor cuando la solución externa contiene 10 mM Ba^{2+} . El trazado c muestra la corriente que se produce en la misma célula al sustituir el Ca^{2+} extracelular por 1.5 mM Co^{2+} y 8.5 mM Mg^{2+} (solución Mg·Co en tabla 1). En estas condiciones se produce un bloqueo de la corriente de calcio que queda reducida a una mínima corriente de cierre en el instante de la repolarización. Las relaciones I-V para esta misma célula utilizando soluciones que contienen 10 mM Ca^{2+} y 10 mM Ba^{2+} se representan en la figura 24B. En ella se observa como para todos los valores de V_M la corriente presenta una mayor amplitud cuando Ba^{2+} es el ión permeable.

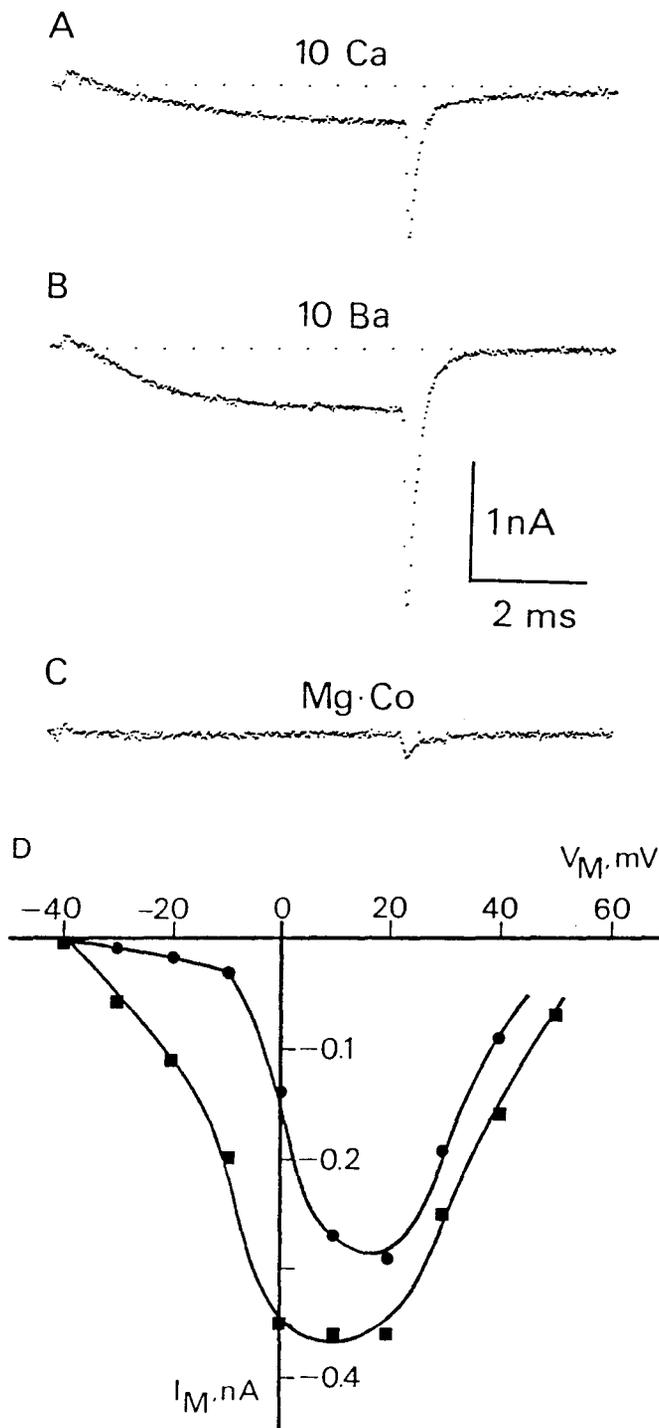


Figura 24. Identificación de la corriente de calcio. Corriente a través de los canales de calcio al despolarizar la célula a 10 mV durante 6 ms con soluciones externas 10 Ca (A), 10 Ba (B) y Mg-Co (C). HP=-80 mV. Todos los registros corresponden a la misma célula. (D) Relación corriente-voltaje en la misma célula con soluciones 10 Ca (●) y 10 Ba (■). La amplitud de la corriente a los 6 ms (ordenada) se representa en función del potencial de membrana aplicado durante el pulso (abscisa). Solución interna: 130 Cs.

5.3. Relación Corriente-Voltaje.

La figura 25 muestra una familia de corrientes de calcio generadas al despolarizar una neurona septal desde un potencial de reposo de -80 mV mediante pulsos de diferente amplitud. Se observa que con despolarizaciones a partir de -20 mV aparece una corriente de pequeña amplitud dirigida hacia el interior de la célula que, al menos con pulsos de corta duración (6 ms), se mantiene estable mientras dura el estímulo. A medida que aumenta el grado de despolarización aumenta la amplitud de la corriente, hasta llegar a un valor máximo. A partir de cierto valor de V_M , mayores despolarizaciones producen una disminución de la amplitud de la corriente, al ir disminuyendo progresivamente el gradiente electroquímico para Ca^{2+} .

La amplitud de la corriente de calcio medida a los 6 ms (ordenada), en función del V_M aplicado en cada pulso (abscisa) se ilustra en la figura 26. Este gráfico muestra que el umbral para la activación de la corriente se encuentra situado a un potencial de membrana alrededor de -40 mV. La amplitud de la corriente incrementa a medida que aumenta la amplitud del pulso, y la amplitud máxima se obtiene a un valor de V_M de 20 mV. A partir de este potencial de membrana la estimulación de la célula con despolarizaciones mayores produce corrientes cada vez de menor amplitud debido a la disminución progresiva del gradiente electroquímico para Ca^{2+} . Con 10 mM Ca^{2+} externo, la amplitud media de la corriente de calcio, medida a los 6 ms, al aplicar un pulso hasta 20 mV fue de $0,35 \pm 0,22$ nA (media \pm DE, $n=12$).

5.4. Separación de Dos Tipos de Canales de Calcio.

Al repolarizar la célula tras la aplicación de un pulso despolarizante se observa un repentino incremento en la amplitud de la corriente dirigida hacia el citosol. En ese instante se produce un aumento del gradiente electroquímico para los iones Ca^{2+} , los cuales pasan a través de los canales mientras se produce la deactivación de los mismos.

En la familia de corrientes de la figura 25 se puede observar que al repolarizar la célula a un potencial de membrana de -80 mV tras aplicar despolarizaciones superiores a 60 mV ($V_M = -20$ mV), aparece un componente de corriente que tras incrementar bruscamente su amplitud en el instante de la repolarización disminuye con un curso temporal lento. La amplitud de este componente aumenta progresivamente conforme incrementa el nivel de despolarización durante el pulso. Al someter a la célula a despolarizaciones más positivas de 0 mV aparece otro

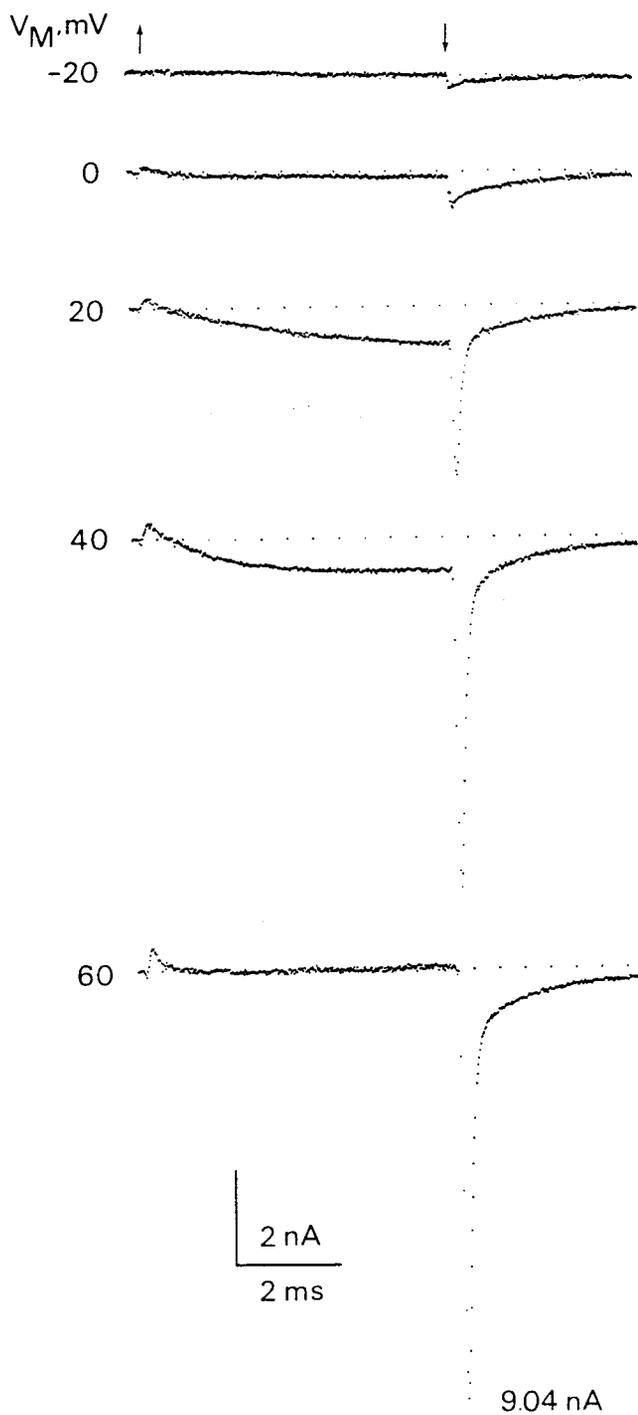


Figura 25. Familia de corrientes de calcio generadas al despolarizar la célula a -20, 0, 20, 40 y 60 mV durante 6 ms desde un potencial de membrana de -80 mV. Las flechas indican el principio y el final de la despolarización. Soluciones: 10 Ca//130 Cs.

componente en la corriente de cierre cuya amplitud disminuye con un curso temporal más rápido. Estas observaciones sugieren la existencia en neuronas septales de al menos dos tipos de canales de calcio con distintas cinéticas de cierre y distinto umbral para la activación.

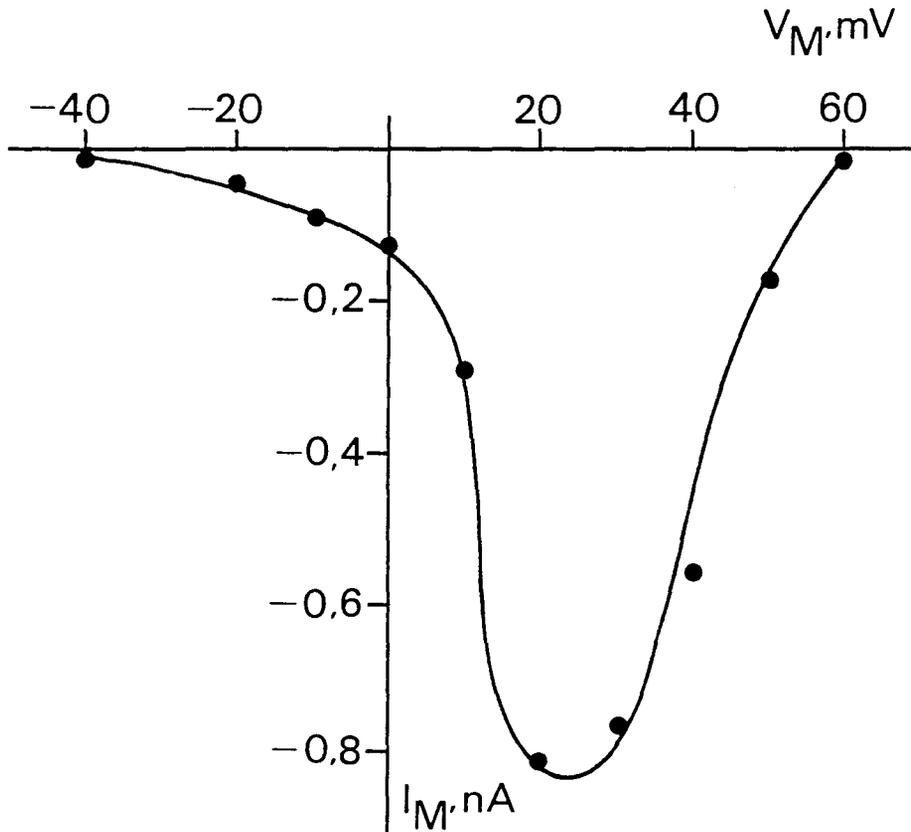


Figura 26. Relación corriente-voltaje en la célula de la figura 25. La amplitud de la corriente medida al final de un pulso de 6 ms (ordenada) se representa en función del potencial de membrana aplicado (abscisa). Soluciones igual que en Fig. 25.

La forma de la curva I-V de la figura 26 también sugiere la existencia de dos tipos de canales de calcio en neuronas septales. La corriente hacia el interior de la célula se hace apreciable a potenciales de membrana más positivos de -40 mV y su amplitud máxima se obtiene a un valor de V_M alrededor de 20 mV. A partir de este potencial, mayores despolarizaciones producen una corriente de menor amplitud, al ir disminuyendo progresivamente el gradiente electroquímico para los iones de calcio. A un potencial cercano a -10 mV se observa una pequeña inflexión en la curva I-V.

Esta característica se ha observado también en otras células excitables y concuerda con la presencia de dos tipos de canales de calcio con diferentes umbrales de activación (Cota, 1986). A un potencial de membrana entre -40 y -20 mV solamente se genera una corriente de calcio cuyos responsables son los canales de calcio de bajo umbral o de deactivación lenta (SD). Con mayores despolarizaciones se activa un componente adicional que se debe al paso de iones Ca^{2+} a través de canales de calcio de alto umbral y de deactivación rápida (FD). La inflexión que aparece en la curva I-V se hace menos evidente en presencia de 10 mM Ba (compárense las curvas I/V en Fig. 24B), lo cual se puede explicar por un cambio selectivo en la curva de activación de los canales FD hacia voltajes más negativos (Matteson y Armstrong, 1986; Cota, 1986; Tabares y col., 1989; Ureña y col., 1989a; ver "Discusión"). Estos resultados confirman la existencia de al menos dos tipos de canales de calcio en neuronas septales.

5.4.1. Activación y Deactivación.

La relación entre el potencial de membrana y el grado de activación de los canales de calcio se estudió analizando la corriente de cierre después de un pulso despolarizante a distintos potenciales. Se aplicaron pulsos de 6 ms para activar los canales y se midió la amplitud de la corriente de cierre, la cual es proporcional al número de canales que están abiertos al final del pulso. El cálculo de la contribución relativa de los canales SD y FD a la corriente de cierre total se efectuó de la siguiente forma: se realiza un ajuste exponencial de la fase lenta del proceso de deactivación en cada registro, una vez que el componente rápido ha decaído, y se extrapola al punto de inicio de la repolarización (punto inicial de la corriente de cierre). Esta exponencial representa el curso temporal del componente de deactivación lenta y su amplitud inicial es una medida relativa del número de canales SD activos en ese instante. El componente de deactivación rápida se aísla al restar de la corriente de cierre total la función exponencial lenta.

La figura 27 ilustra el procedimiento de disección de las corrientes SD y FD aplicado a un pulso de 6 ms a 40 mV. El barrido A muestra la corriente de calcio registrada al repolarizar la célula a un potencial de -80 mV y superpuesto al trazado de corriente la función exponencial que se obtiene al ajustar el componente lento de la misma. El trazado B representa el componente rápido, aislado por sustracción como se indicó anteriormente. Como puede observarse en la figura, ambos componentes pueden ajustarse perfectamente mediante funciones exponenciales

simples con valores de constante de tiempo de 1,963 y 0,149 ms para los componentes lento y rápido, respectivamente.

En la figura 27C se representa la amplitud de la corriente de cierre en el instante inicial de la repolarización (ordenada) en función del potencial de membrana durante el pulso (abscisa). Los círculos se refieren a la amplitud del componente SD y los cuadrados a la del componente FD; ambos componentes han sido normalizados en relación a su valor máximo. Como se sugirió previamente al analizar la curva I-V (Fig. 26), la curva conductancia-voltaje para los canales SD es significativamente diferente de la correspondiente a los FD. El umbral de activación para cada uno de los canales es diferente, -40 mV para los canales SD o de bajo umbral, y -20 mV para los FD o de alto umbral. El 50% de la activación máxima se obtiene a un potencial de membrana alrededor de 0 mV para los canales SD y alrededor de 20 mV para los FD. Además, la pendiente de la curva de activación de los canales FD es más pronunciada.

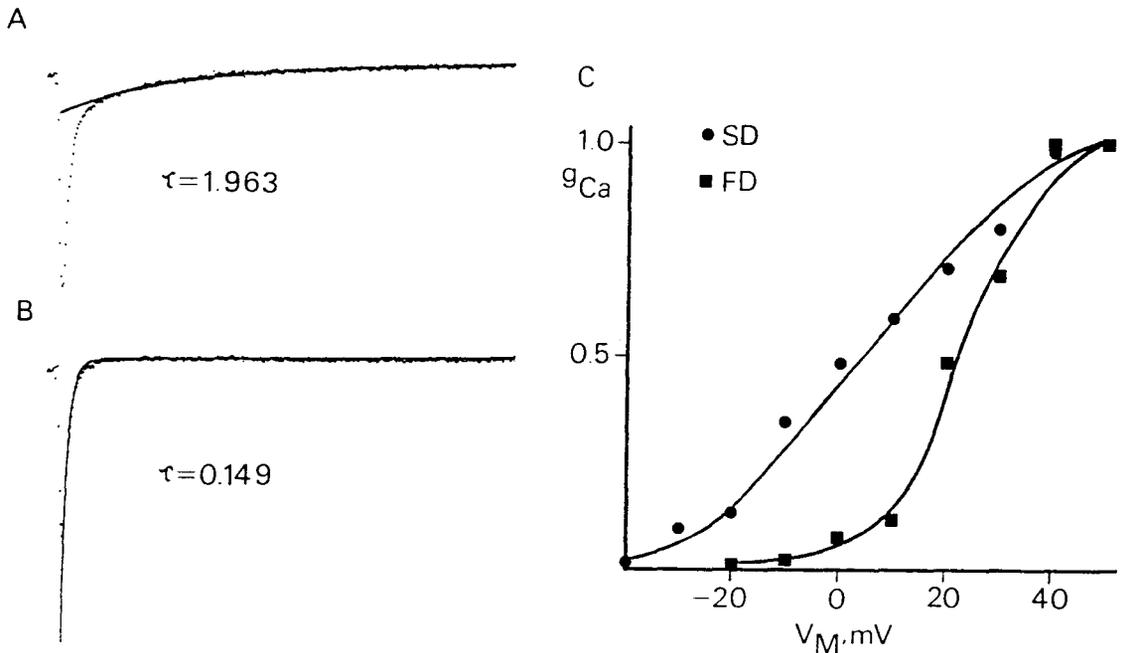


Figura 27. Separación de dos tipos de canales de calcio. (A) Corriente de cierre al final de un pulso de 6 ms a 40 mV. La línea continua es la función exponencial que se ajusta al componente lento de la deactivación. La sustracción del componente lento a la corriente aisla el componente rápido, el cual se ajusta con una nueva función exponencial (B). Las constantes de tiempo de las exponenciales se indican en cada trazo. (C) Relación conductancia-voltaje para las corrientes de calcio. La conductancia (ordenada) se estimó a partir de la amplitud inicial de los dos componentes de la corriente de cierre al repolarizar tras la aplicación de un pulso de 6 ms a diferentes potenciales de membrana. HP=-80 mV. Soluciones: 10 Ca//130 Cs.

La cinética de cierre de los canales de calcio SD y FD presenta, como se ha mencionado anteriormente, un curso temporal exponencial. Con 10 mM Ca^{2+} la constante de tiempo de la deactivación de los canales medida a un potencial de reposo de -80 mV después de un pulso de 6 ms a 20 mV osciló entre 1,9 y 2,3 ms para los SD y alrededor de 0.150 ms para los FD. A 25° C las constantes de tiempo tienen unos valores medios de $1,985 \pm 0,206$ y $0,110 \pm 0,026$ ms (media \pm DE, n=6) para los canales SD y FD, respectivamente.

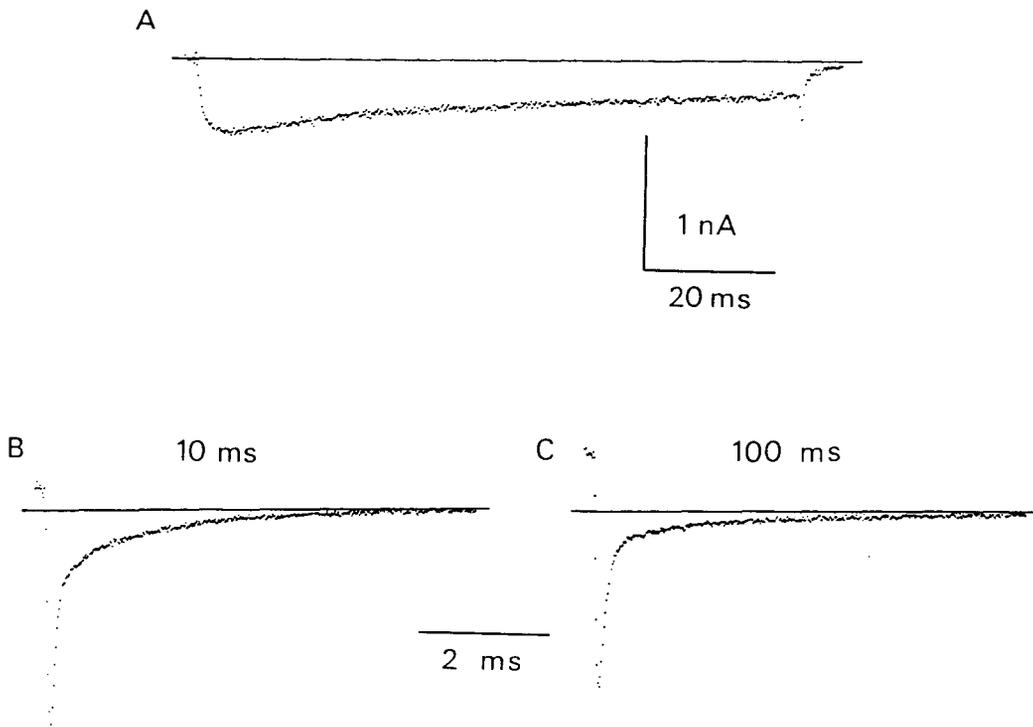


Figura 28. Inactivación de la corriente de calcio. (A) Curso temporal de la corriente de calcio durante un pulso de 90 ms a 20 mV. Corrientes de cierre registradas al repolarizar la célula a -80 mV después de un pulso a 20 mV de 10 (B) y 100 ms (C). Soluciones: 10 Ca//130 Cs.

5.4.2. Inactivación.

Aunque con pulsos de corta duración (entre 6 y 10 ms) la corriente de calcio, al contrario de lo que ocurre con la corriente de sodio, no se inactiva, con pulsos de duración superior a 25 ms se produce una inactivación parcial de la corriente. En la Fig. 28A se muestra la corriente generada en una neurona al aplicar un pulso de 90 ms a un potencial de 20 mV. La corriente alcanza la amplitud máxima en unos 6-8 ms, y a partir de ese momento comienza a decrecer lentamente, debido a la inactivación de los canales de calcio.

El análisis de la corriente de cierre tras la aplicación de pulsos de distinta duración permite estimar el grado de inactivación de la corriente en cada momento. En los trazados B y C se muestran las corrientes de cierre registradas tras aplicar pulsos a 20 mV de 10 y 100 ms de duración, respectivamente. Se observa cómo el componente rápido tiene prácticamente la misma amplitud en ambos registros, mientras que, por el contrario, el componente lento se reduce considerablemente al final del pulso de 100 ms. Esta observación sugiere que los canales SD se inactivan más rápidamente que los FD.

Curso temporal de la inactivación.

El curso temporal de la inactivación de los canales de calcio se estudió analizando la amplitud inicial de la corriente de cierre tras aplicar pulsos despolarizantes hasta 60 mV de duración variable. Al final de un pulso de 6 ms a este potencial de membrana ambos componentes se encuentran totalmente activados. Aplicando pulsos de mayor duración (10-100 ms), y realizando el ajuste exponencial de la corriente de cierre se puede estimar el grado de inactivación de los canales FD y SD.

La figura 29 ilustra el curso temporal de la inactivación de los canales de calcio. En ella se representa la amplitud normalizada de cada uno de los componentes de la corriente de cierre (ordenada) en función de la duración del pulso (abscisa). Los círculos hacen referencia a la amplitud de la corriente SD y los cuadrados a la amplitud del componente FD. Se observa que a medida que aumenta la duración de la despolarización, la amplitud del componente de deactivación lenta (SD) va disminuyendo progresivamente, mientras que el componente de deactivación rápida (FD) apenas se inactiva. Al final de un pulso de 100 ms a 60 mV, la amplitud de la corriente que pasa a través de los canales SD es tan sólo el 30% de la máxima, mientras que la corriente mediada por los canales FD tiene un valor superior al 90% de la amplitud máxima.

5.4.3. Lavado de los Canales de Calcio.

En células dializadas con soluciones salinas las corrientes de calcio no son estables a lo largo del tiempo, ya que tienden a disminuir progresivamente de amplitud desde el inicio de la perfusión (Kostyuk, 1984; Matteson y Armstrong, 1986; Cota, 1986; Ureña y col., 1989; Rodríguez-Benot y col., 1989). Este fenómeno denominado de "lavado" ("wash-out") se debe a la disminución progresiva de canales de calcio funcionales y afecta principalmente a los canales FD.

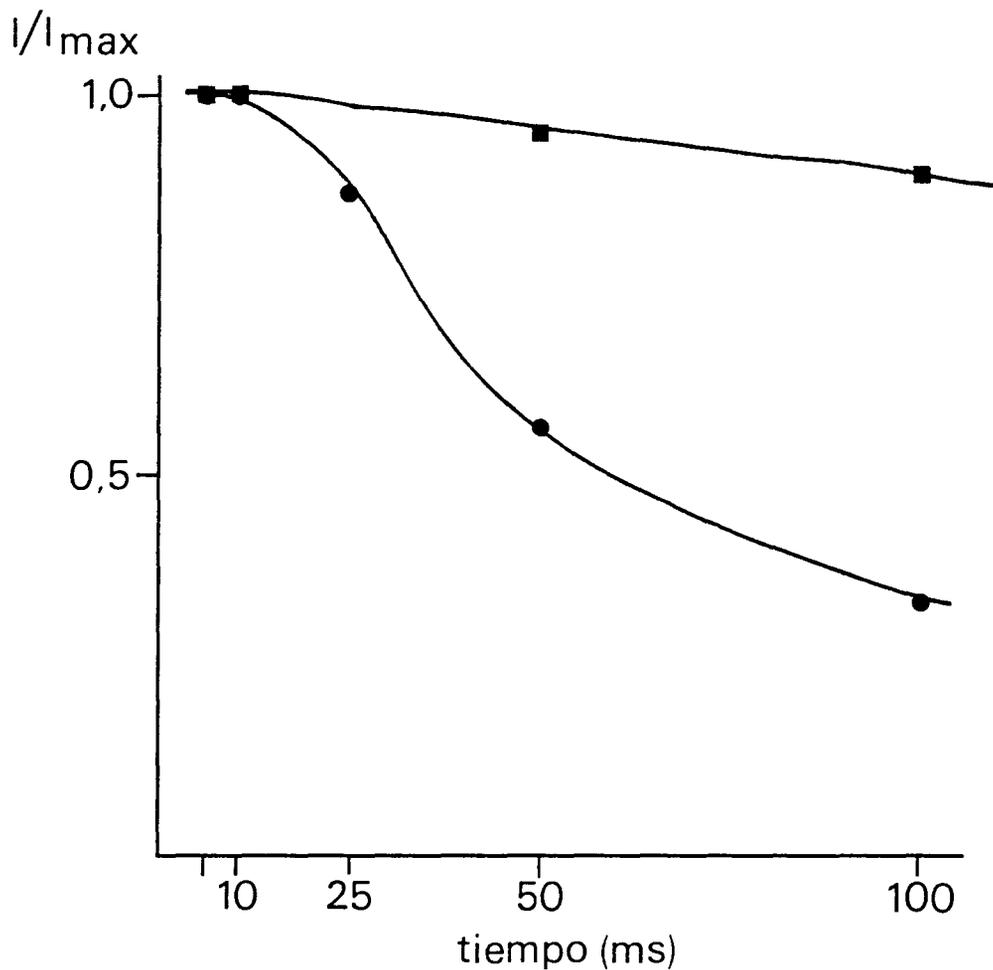


Figura 29. Curso temporal de la inactivación de la corriente de calcio. La amplitud de los componentes FD (■) y SD (●) de la corriente de cierre (ordenada) se representan en función de la duración del pulso (abscisa). HP=-80 mV. Soluciones: 10 Ca//130 Cs.

La figura 30 muestra corrientes de calcio registradas 20 y 400 segundos después de establecer continuidad entre el interior celular y la solución de la pipeta. La amplitud de la corriente producida durante el pulso y la del componente rápido de la corriente de cierre tienen menor amplitud en el registro obtenido a los 400 segundos que en el obtenido al comienzo del experimento. Por el contrario, la amplitud del componente de deactivación lenta permanece intacta. Esta disminución de la actividad de los canales de calcio tiene lugar sin indicios visuales de deterioro celular ni cambio en la resistencia del sello. Además, las constantes de tiempo de los dos componentes de la corriente de cierre, no varían apreciablemente a lo largo del tiempo. La adición de 3 mM adenosina trifosfato (ATP) a la solución interna retrasa

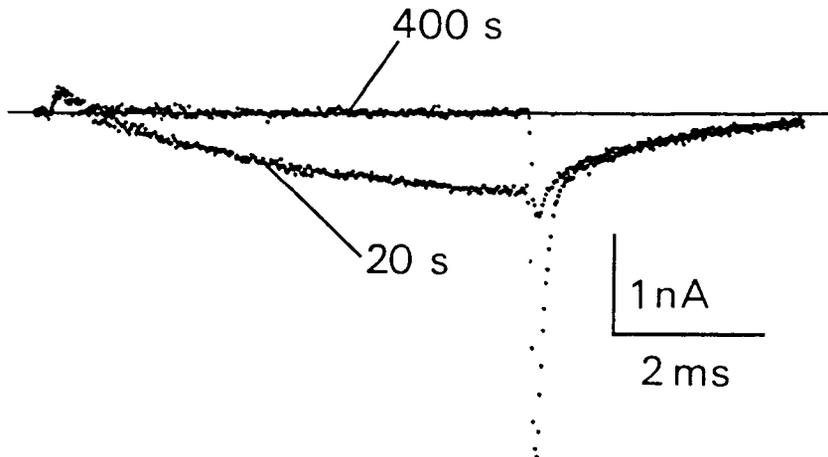


Figura 30. "Lavado" de la corriente de calcio durante el proceso de diálisis. Corrientes de calcio registradas durante un pulso de 6 ms a 40 mV, 20 y 400 segundos después del comienzo del registro. HP=-80 mV. Soluciones: 10 Ca//130 Cs.

considerablemente el proceso de "lavado" de los canales FD, pero no impide totalmente la disminución de la corriente a lo largo del tiempo (Rodríguez-Benot y col, 1989).

5.4.4. Variabilidad en la Distribución de Canales de Calcio en Diferentes Células.

El análisis de las corrientes de cierre que se registran en las neuronas septales pone de manifiesto la existencia de una gran diversidad en la población celular. Esta variabilidad es consecuencia de la distinta densidad de cada tipo de canales de calcio en diferentes células.

La contribución relativa de cada uno de los componentes se ha estimado a partir de la corriente de cierre producida al repolarizar a un potencial de membrana de -80 mV tras aplicar un pulso de 6 ms a 20 mV aplicando el análisis descrito en la sección 4.1.1. "Activación y Deactivación". En la figura 31 se muestran registros representativos correspondientes a tres células distintas en las que la contribución relativa de ambos componentes era diferente. Las corrientes se produjeron al repolarizar las células a un potencial de membrana de -80 mV después de un pulso de 6 ms a 40 mV. La mayor parte de la corriente de cierre que se ilustra en el trazado A se debe a la actividad de los canales SD. En B, se observa corriente con dos componentes lo que sugiere que se debe a la actividad de los dos tipos de canales de calcio. El registro C muestra, por último, una célula en la cual

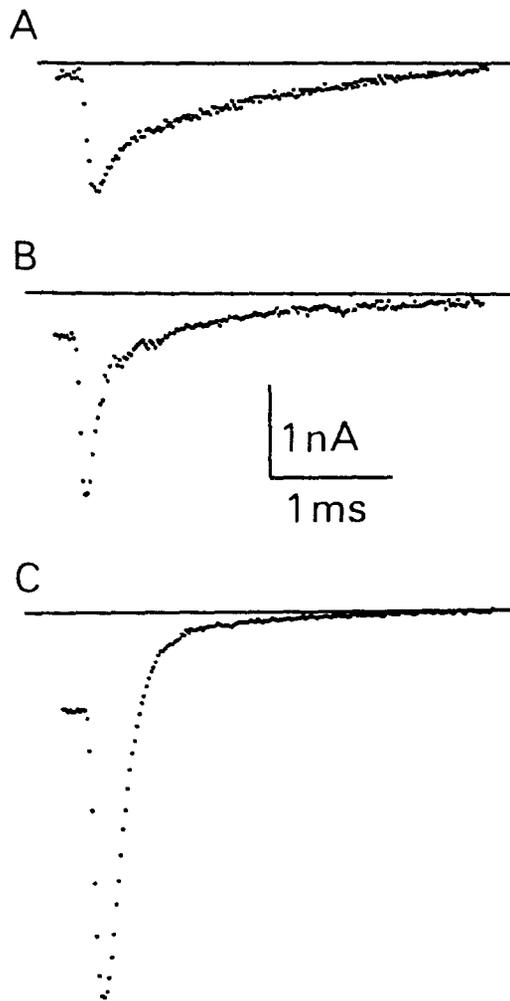


Figura 31. Variabilidad de la corriente de calcio en neuronas septales. Corrientes de cierre en distintas células obtenidas en idénticas condiciones experimentales. La amplitud relativa de los componentes SD y FD varía en cada célula. HP=-80 mV. Soluciones: 10 Ca//130 Cs.

predominan los canales FD ya que apenas hay componente lento en la corriente de cierre.

El porcentaje medio de contribución de cada uno de los componentes a la corriente de cierre total medida en todas las células estudiadas es del $72.92 \pm 31.15\%$ para los canales FD, y $25.44 \pm 30.00\%$ para los canales SD (media \pm DE, n=65). La mayoría de las células tienen canales FD, con una mayor o menor densidad, sin embargo, no todas las neuronas tienen canales SD. Como se discutirá más adelante (ver "Discusión") estas observaciones pueden ser la base de la diversidad funcional encontrada en neuronas septales (Alvarez de Toledo y López-Barneo, 1988).

6. CORRIENTES DE POTASIO

6.1. Identificación y Aislamiento.

Como se ha indicado previamente (ver Apartado "Corrientes Iónicas en Neuronas Septales") en todas las neuronas septales estudiadas se observó, además de las corrientes de sodio y calcio descritas anteriormente, una corriente dirigida hacia el exterior de la célula. Esta corriente se debe a la salida de K^+ desde el citosol, ya que desaparece al sustituir la totalidad de este ión del interior de la micropipeta por cantidades equimolares de Cs^+ , ión impermeable a través de los canales de potasio (Bezanilla y Armstrong, 1972). En el presente trabajo el aislamiento de las corrientes de potasio se ha realizado utilizando solución externa estándar o Na·Tris a la cual se añadió 1-6 μM TTX y solución interna estándar a la que se añadió 10 mM EGTA para mantener la concentración de calcio libre en el citoplasma a niveles por debajo de 10^{-9} M (Martell y Smith, 1974; Tabares y col., 1989).

La figura 32 muestra la corriente de potasio generada en una neurona septal al aplicar un pulso despolarizante que mantiene durante 20 ms el potencial de membrana a 40 mV. Esta corriente tiene un curso temporal complejo; se activa de forma rápida, a los 4-5 ms se aprecia una inflexión a partir de la cual la cinética de activación se

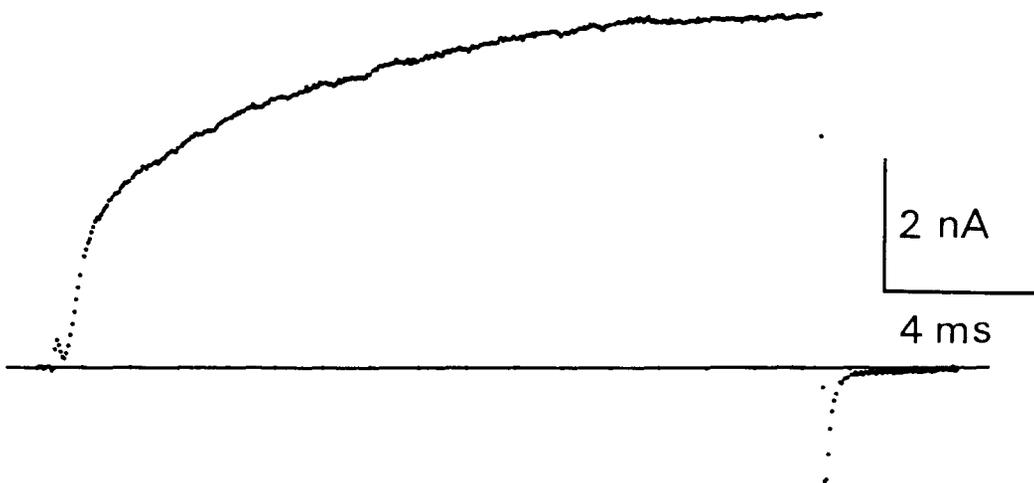


Figura 32. Corriente de potasio registrada durante un pulso de 20 ms a 40 mV desde un potencial de reposo de -80 mV. Soluciones: Na·Tris, TTX//estándar.

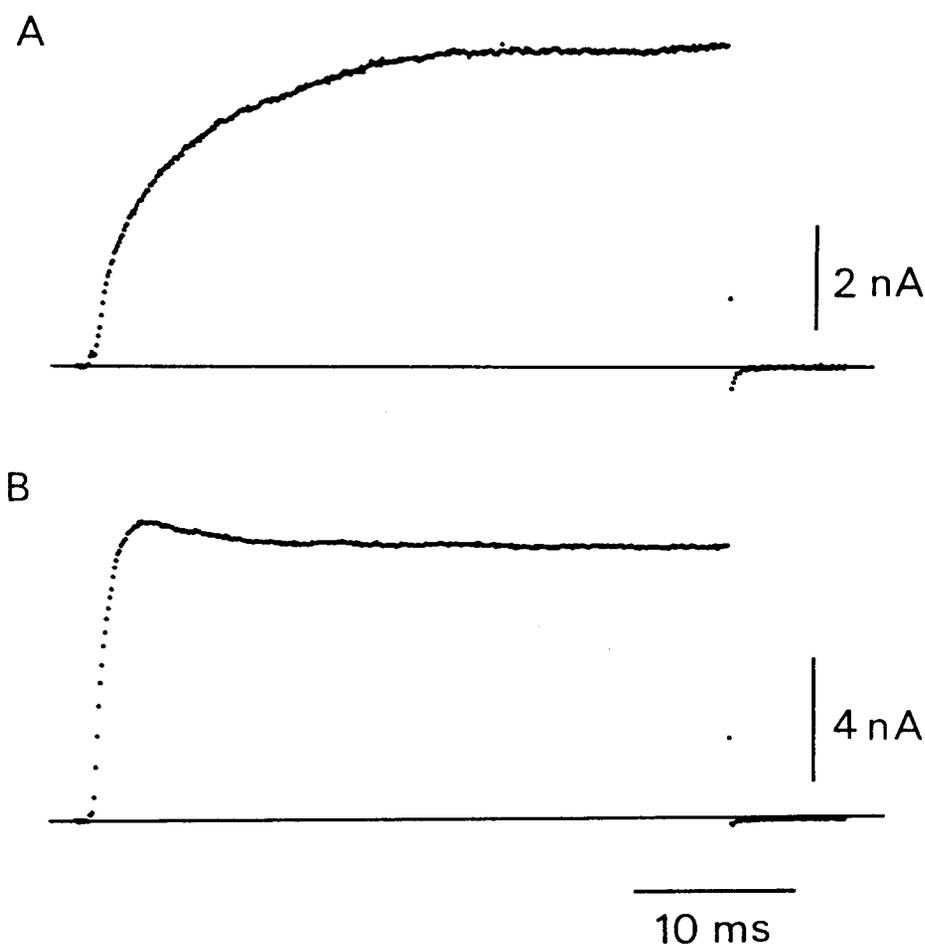


Figura 33. Variabilidad de las corrientes de potasio. Corrientes de potasio generadas en idénticas condiciones experimentales (pulso de 40 ms a 20 mV) en dos neuronas distintas. HP=-80 mV. Soluciones: Na-Tris, TTX//estándar.

hace progresivamente más lenta y, finalmente, alcanza una amplitud estable. Al final del pulso se produce una corriente de cierre debida a la deactivación de los canales de calcio. Este curso temporal sugiere la existencia de más de un tipo de corriente de potasio en células del septum.

La figura 33 muestra las corrientes de potasio generadas en dos neuronas distintas de la misma preparación al aplicar un protocolo experimental similar, consistente en un pulso despolarizante de 40 ms a 20 mV. La corriente que se representa en el trazado A se activa de forma lenta con un curso temporal sigmoideo, alcanza un valor estable en 15-20 ms y no se inactiva en el tiempo que dura el pulso. En el registro B se muestra una

corriente de potasio que se activa de forma rápida, alcanza un máximo en 4-5 ms y comienza a decrecer para posteriormente mantener una amplitud estable hasta el final del pulso. Mientras que la corriente del registro A parece ser el resultado de la actividad de un solo tipo de canal iónico, la corriente del trazado B refleja la actividad de más de un tipo de canal de potasio.

Por lo tanto, las corrientes de potasio que se registran en neuronas septales tienen una gran variabilidad tanto a nivel cualitativo (presencia de distintos tipos de corrientes en diferentes células) como a nivel cuantitativo (distinta contribución de cada tipo de corriente en las diferentes neuronas). Esta observación corrobora sugerencias previas basadas en datos obtenidos mediante registro intracelular in vitro (Alvarez de Toledo y López-Barneo, 1988).

6.2. Tipos de Corrientes de Potasio.

6.2.1. Corriente Transitoria.

La aplicación de pulsos despolarizantes desde un potencial de membrana de -80 mV induce, en algunas neuronas septales, la génesis de una corriente dirigida hacia el exterior de la célula que se activa de forma rápida, alcanza la amplitud máxima en 4-5 ms y posteriormente se inactiva, disminuyendo en amplitud también de forma relativamente rápida (Fig. 33B).

En la figura 34 se muestran las corrientes de potasio generadas en una neurona en la que está presente la corriente transitoria antes descrita. Los registros de la parte A de la figura son el resultado de la aplicación, desde un potencial de membrana de -80 mV, de pulsos de 40 ms de duración y amplitud variable. En ellos se aprecia una corriente con cinética de activación rápida que tras alcanzar un máximo comienza a decrecer lentamente. A potenciales de membrana superiores a 0 mV se observa un posterior aumento de amplitud en la corriente al final del pulso. En la figura 34B se muestran las corrientes generadas en la misma célula al aplicar pulsos de igual amplitud y mayor duración (200 ms). La corriente tras activarse rápidamente y alcanzar un valor máximo comienza a disminuir en amplitud para, posteriormente, volver a aumentar y alcanzar un valor que se mantiene estable durante el resto del pulso. A potenciales de membrana por encima de 0 mV se observa con mayor claridad este segundo componente. Este curso temporal es, como se muestra más adelante, consecuencia de la contribución de más de una corriente de potasio con distintas cinéticas de activación e inactivación. La corriente total refleja, por lo tanto, el curso temporal de dos tipos de corrientes distintas.



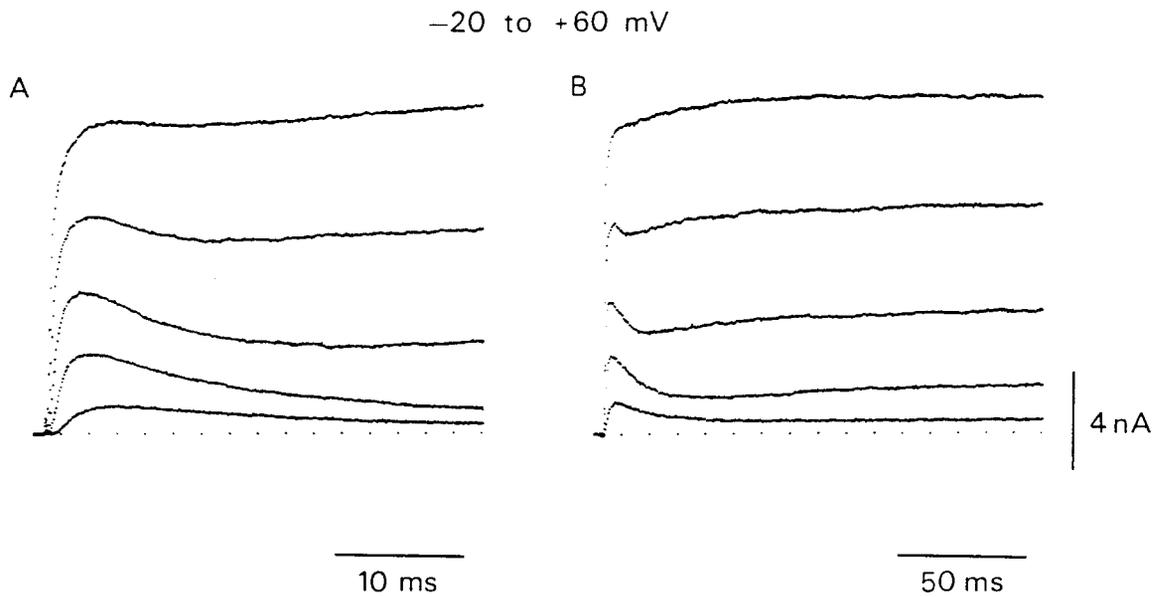


Figura 34. Familias de corrientes de potasio generadas en una misma célula al despolarizar a -20, 0, 20, 40 y 60 mV desde un potencial de reposo de -80 mV durante 40 (A) y 200 ms (B). Soluciones: Na·Tris, TTX//estándar.

Aislamiento.

El protocolo experimental diseñado para el aislamiento de la corriente de potasio con cinética de activación rápida ha sido descrito y utilizado en otras preparaciones celulares tanto de invertebrados (Connors y Stevens, 1971) como de vertebrados (Segal y Barker, 1984; Castellano y col., 1989). Este método se basa en que el mantenimiento del potencial de membrana a un nivel despolarizado (-50 mV) produce la inactivación de la corriente transitoria y afecta poco a otras corrientes de potasio. Por el contrario, si se mantiene el potencial de reposo hiperpolarizado (-110 mV) la amplitud de la corriente transitoria aumenta con respecto a la que se registra con un potencial de membrana mantenido a -80 mV.

Las corrientes generadas al aplicar en una misma célula un pulso a 20 mV después de mantener durante 250 ms un potencial de membrana de -110 mV y -50 mV se muestran en la figura 35A. La corriente que se produce al activar la célula desde un potencial de -110 mV tiene un curso temporal, con dos componentes distintos, similar al ilustrado en la figura 34. Al mantener el potencial de membrana despolarizado (-50 mV) el componente que se activa rápidamente desaparece, como consecuencia de la

inactivación de los canales responsables de esta corriente. El componente que se activa lentamente no parece sufrir ningún cambio entre uno y otro registro (la amplitud al final del pulso es la misma en ambos trazados). La sustracción del registro que se obtiene al potencial de reposo de -50 mV del que se obtiene con un potencial de -110 mV da como resultado el trazado de la figura 35B, el cual representa la fracción de corriente que se ha inactivado al mantener el potencial de membrana despolarizado, y que se corresponde con el componente de corriente que se activa rápidamente y, como se puede comprobar, se inactiva también de forma rápida. Por esta razón en el presente trabajo se le denomina **corriente transitoria de potasio (I_t)**.

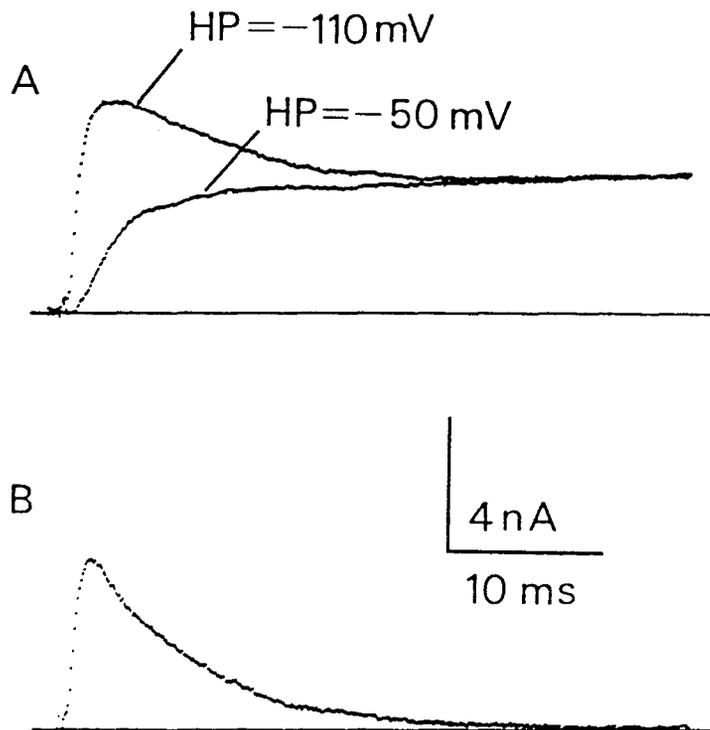


Figura 35. Separación de dos tipos de corrientes de potasio. Corrientes de potasio registradas al despolarizar la célula durante 40 ms a 20 mV después de prepulsos a -110 y -50 mV de 250 ms (A). La sustracción del registro obtenido desde -50 mV al obtenido desde -110 mV produce el trazado que se muestra en B, el cual ilustra el curso temporal de la corriente de potasio transitoria. Soluciones: Na·Tris, TTX//estándar.

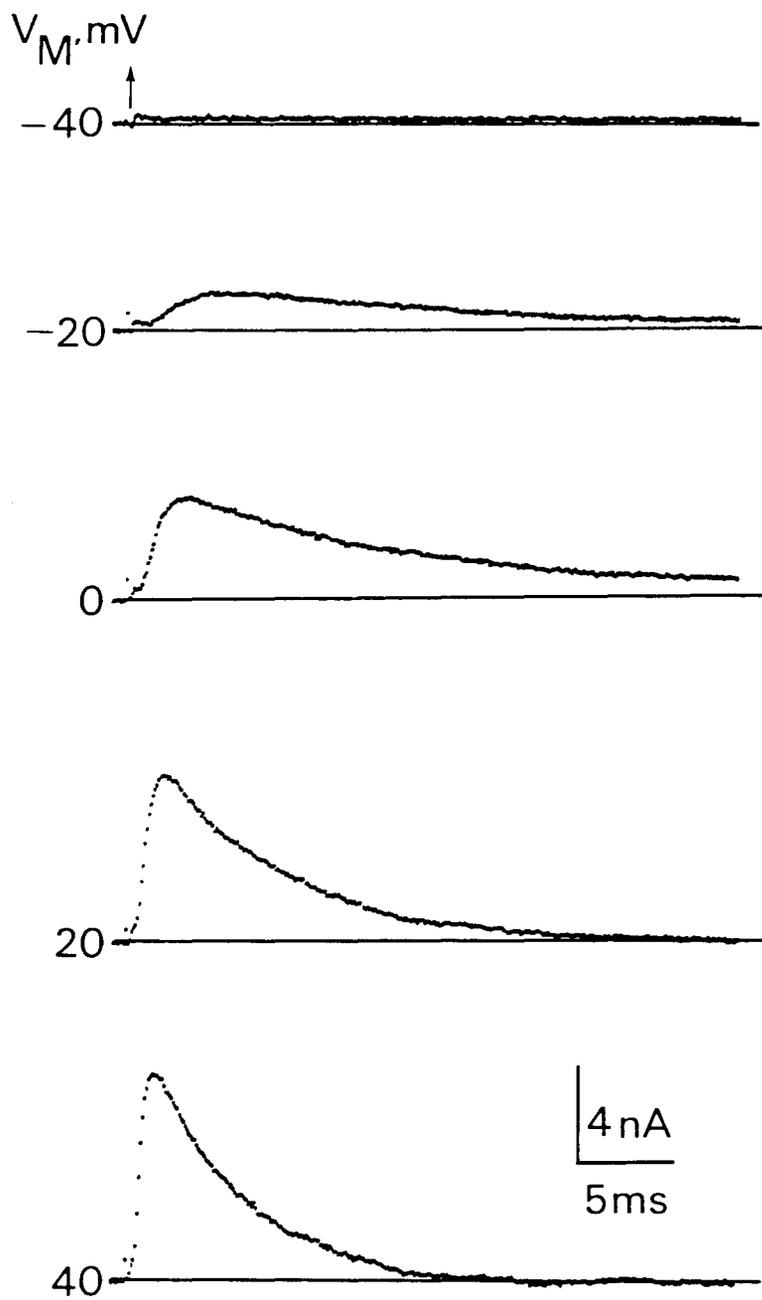


Figura 36. Corrientes transitorias de potasio, obtenidas mediante el protocolo de aislamiento mostrado en la figura 35, durante pulsos a distintos potenciales de membrana (-40, -20, 0, 20 y 40 mV). Soluciones: Na-Tris, TTX//estándar.

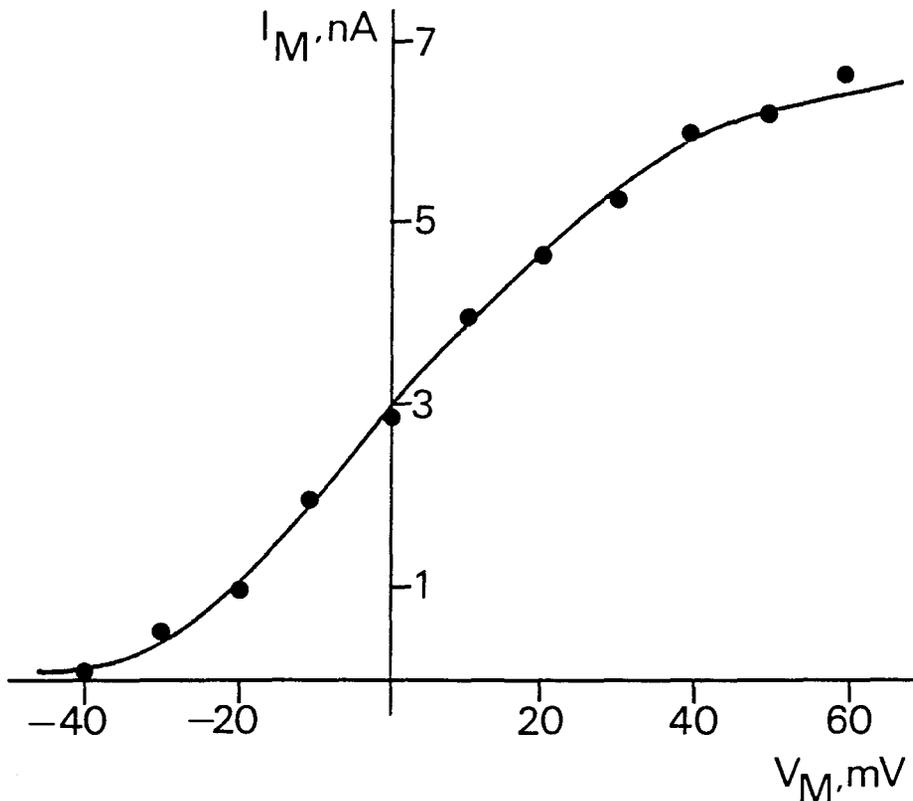


Figura 37. Relación corriente-voltaje en la célula de la Fig. 36. La gráfica representa la amplitud máxima de la corriente (ordenada) en función del potencial de membrana aplicado durante el pulso (abscisa). Soluciones como en Fig. 36.

Relación corriente-voltaje y activación.

La figura 36 muestra una familia de corrientes de potasio obtenidas en una misma célula utilizando el protocolo de aislamiento detallado en la sección anterior. La corriente se activa de forma rápida, alcanza el valor máximo de amplitud en 4-5 ms y se inactiva con un curso temporal aproximadamente exponencial en menos de 50 ms. A medida que aumenta el nivel de despolarización durante el pulso incrementa la amplitud de la corriente y su cinética de activación se hace más rápida.

La relación entre amplitud máxima de la corriente (ordenada) y potencial de membrana aplicado en cada pulso (abscisa), para esta misma neurona, se muestra en la curva I-V de la figura 37. El umbral para la activación de la corriente está situado a un potencial de membrana algo más positivo de -50 mV. Desde este nivel la amplitud de la corriente aumenta de forma casi lineal conforme incrementa el nivel de despolarización, y a potenciales más positivos de 50 mV se observa cierto grado de saturación de la corriente.

Inactivación en estado estacionario.

La corriente transitoria de potasio tiene al igual que la corriente de sodio dos procesos cinéticos dependientes de voltaje claramente diferenciables: activación e inactivación. En esta sección se analiza la dependencia del potencial de membrana del proceso de inactivación. El porcentaje de canales que se encuentran inactivados a los distintos potenciales de membrana (h_{∞}) se ha estudiado mediante el siguiente protocolo experimental. Tras aplicar un prepulso de 250 ms de duración a distintos potenciales de membrana, se registra la corriente generada durante un pulso de 40 ms a 30 mV. La amplitud de la corriente producida durante el pulso se compara con la obtenida cuando el potencial de membrana durante el prepulso es de -110 mV, desde el cual se obtiene la corriente máxima.

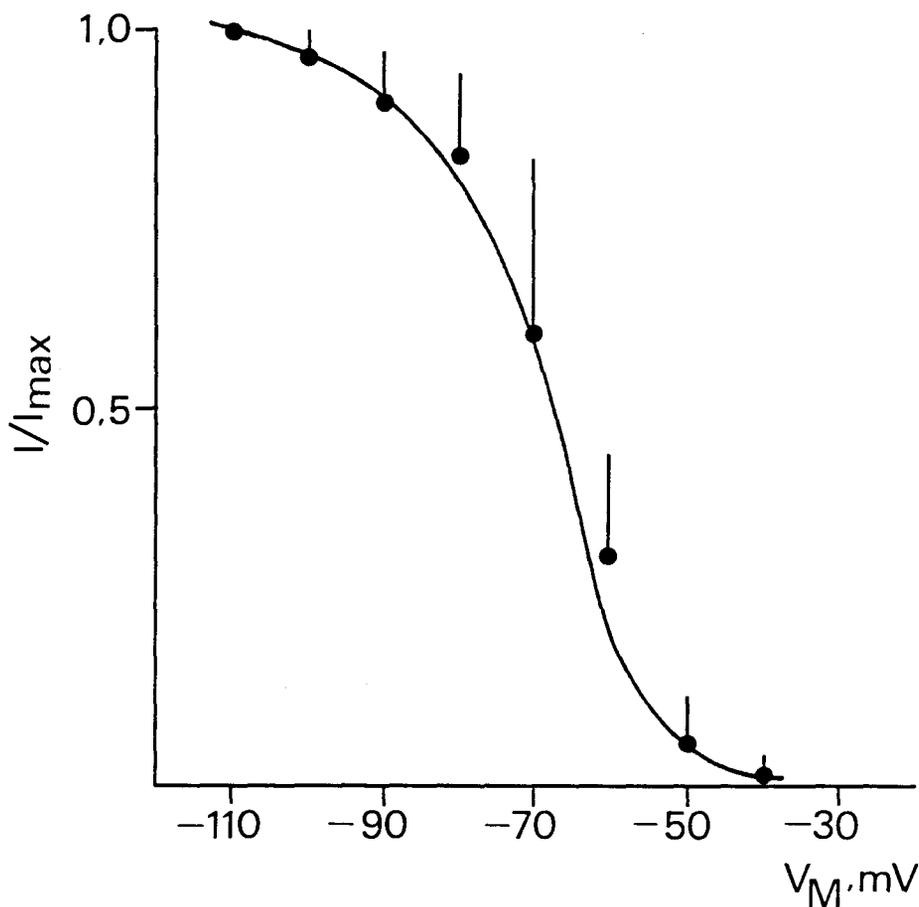


Figura 38. Inactivación en estado estacionario de la corriente transitoria de potasio. La gráfica representa la amplitud máxima de la corriente normalizada durante el pulso "test" (ordenada) en función del potencial de membrana durante el prepulso (abscisa). Los símbolos indican los valores medios y la desviación estandar obtenidos en tres células. Soluciones: Na·Tris, TTX//estándar.

En la figura 38 se representa en el eje de ordenadas la amplitud máxima de la corriente durante cada pulso (normalizada) en función del potencial de membrana mantenido durante el prepulso (abscisa). A medida que aumenta la amplitud del prepulso disminuye progresivamente la amplitud de la corriente. Esta gráfica ilustra que a -80 mV alrededor del 17% de los canales se encuentran inactivados. La deinactivación completa de la corriente se obtiene con un prepulso a -110 mV, mientras que la totalidad de los canales se encuentran inactivados a un potencial de membrana más positivo de -50 mV. La inactivación del 50% de los canales se produce a un valor de V_M de -67 mV.

Recuperación de la inactivación.

Una vez inactivados los canales de potasio I_t , la recuperación de la inactivación (deinactivación) es dependiente del tiempo y del potencial de membrana. Para el estudio de este fenómeno se ha utilizado el mismo protocolo experimental usado en el estudio de la corriente de sodio (ver Apartado "4.4. Inactivación"). El prepulso (pp) que inactiva la corriente tiene una duración de 500 ms y mantiene el potencial de membrana a -50 mV. Tras el prepulso, sigue un intervalo (i) a distintos potenciales de membrana y de duración variable, al final del cual se aplica un pulso (p) a 30 mV de 40 ms. La amplitud del componente transitorio durante el pulso se compara con la obtenida al aplicar un pulso idéntico en ausencia de prepulso y desde el potencial de membrana en reposo de -80 mV.

La figura 39 muestra las corrientes generadas en una misma neurona transcurridos 50 y 250 ms después de la aplicación del prepulso que produce la inactivación, a un potencial de membrana durante el intervalo de -80 (A) y -110 mV (B). Se observa, en ambas condiciones, que a medida que aumenta la duración del intervalo mayor es la amplitud de la corriente registrada durante el pulso. En la figura 39C la amplitud normalizada de la corriente (ordenada) se representa en función del tiempo que transcurre entre prepulso y pulso a los distintos potenciales de membrana aplicados durante el intervalo (abscisa). Cuando el potencial de membrana durante el intervalo que separa prepulso y pulso se mantiene a -80 mV el 50% de la deinactivación se obtiene en 70 ms. A un V_M durante el intervalo de -110 mV, el mismo porcentaje de deinactivación se obtiene en 25 ms. La recuperación total de la inactivación (igual amplitud que en ausencia de prepulso) se consigue aproximadamente a los 300 ms a -110 mV y en 1 segundo a -80 mV. Por tanto, a potenciales de membrana más negativos el tiempo necesario para producir la deinactivación de la corriente es menor.

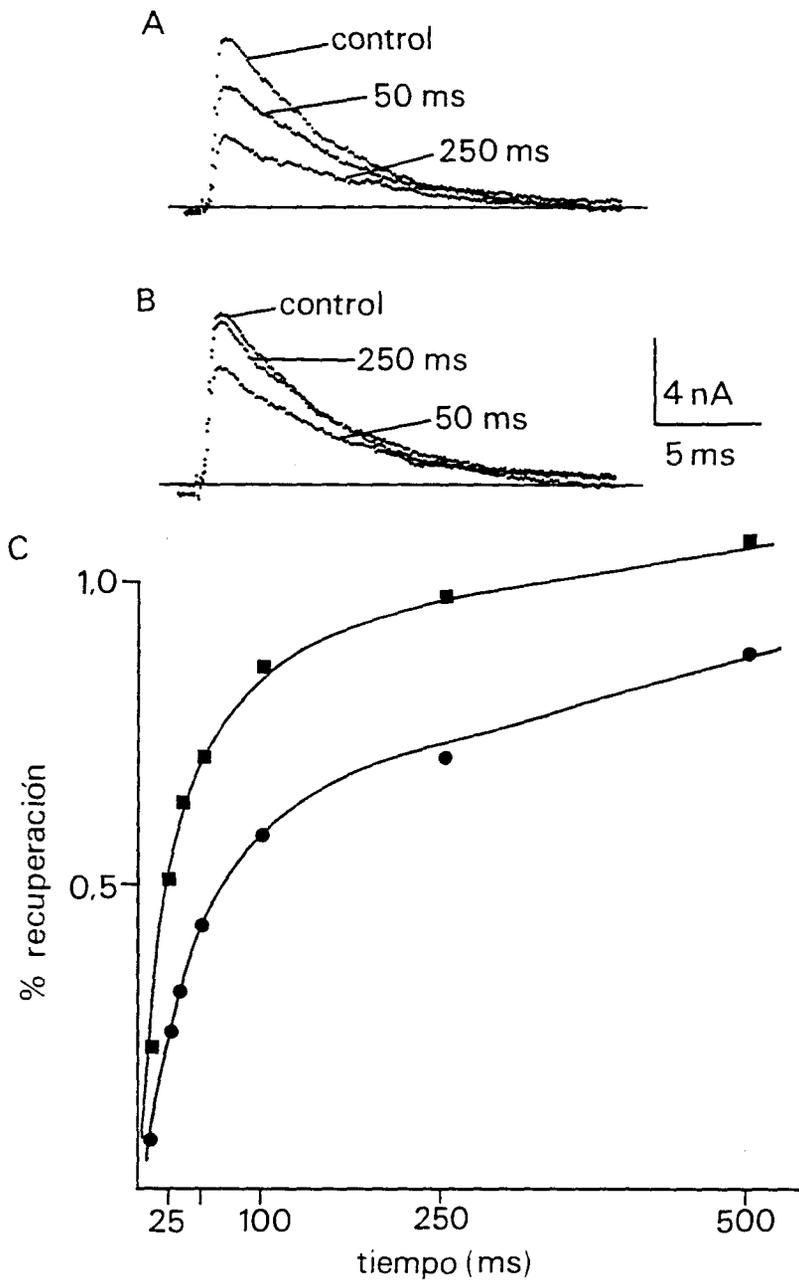


Figura 39. Recuperación de la inactivación de la corriente transitoria de potasio. Corrientes generadas durante un pulso "test" a 20 mV en ausencia de prepulso (control; HP=-80 mV), y 50 y 250 ms después del prepulso a potenciales de membrana durante el intervalo de -80 (A) y -110 mV (B). (C) La gráfica representa la amplitud normalizada de la corriente durante el pulso "test" (ordenada) en función del tiempo transcurrido desde el prepulso (abscisa) a potenciales de reposo de -80 (●) y -110 mV (■). Soluciones: Na·Tris, TTX//estándar.

Las características observadas en la corriente (I_t) presente en neuronas septales se asemejan a las que muestran un amplio grupo de corrientes de potasio en una gran variedad de tipos celulares, denominadas genéricamente I_A (Connors y Stevens, 1971; Neher, 1971; Gustafsson y col., 1982; Castellano y col., 1989). En el presente trabajo esta corriente siempre se ha observado junto a otra de potasio con cinética de activación más lenta, la cual se analiza en la sección siguiente. Dentro del total de células estudiadas la corriente I_t se registró en el 27%.

6.2.2. Corriente de Potasio con Cinética de Activación Lenta.

La corriente de potasio de activación lenta se observó en todas las células estudiadas; como se ha descrito anteriormente, en algunas ocasiones junto a la corriente de potasio I_t .

Aislamiento

Como se ha mencionado anteriormente la solución interna utilizada para el estudio de las corrientes de potasio contenía 10 mM EGTA, lo cual determina una concentración de calcio libre citoplasmático menor de 10^{-9} M. En estas condiciones, tras establecer la configuración "whole-cell" y esperar al "lavado" de los canales de calcio, la concentración interna de este

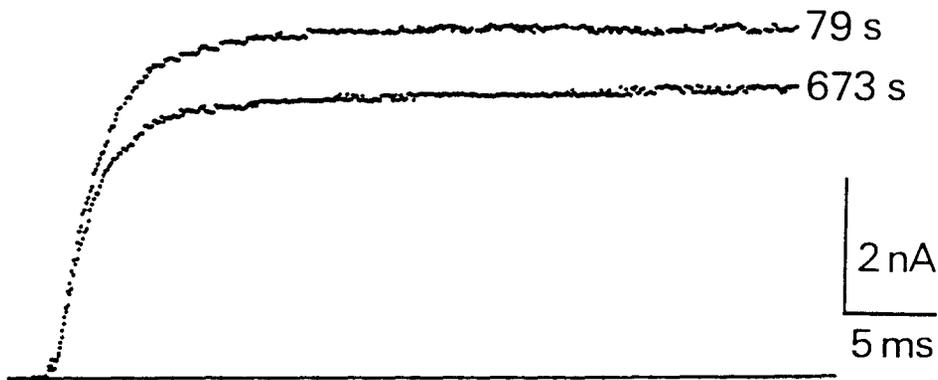


Figura 40. Aislamiento de la corriente de potasio I_K . Corrientes de potasio registradas durante un pulso de 40 ms a 40 mV, 79 y 673 segundos después del inicio de la diálisis. Disminución de la corriente de potasio a medida que se produce el "lavado" de los canales de calcio. HP=-80 mV. Soluciones: Na·Tris, TTX//estándar.

ión es, en principio, insuficiente para activar los canales de potasio dependientes de calcio.

La figura 40 muestra la corriente de potasio generada en una neurona septal poco después de establecer la continuidad entre el citoplasma celular y el interior de la micropipeta (trazado 79 s), y aproximadamente 11 minutos más tarde (trazado 673 s). Se observa que la amplitud de la corriente disminuye simultáneamente al lavado de los canales de calcio (aunque no se ilustra en la figura, la corriente de cierre tras aplicar pulsos de corta duración desaparece). A partir de ese instante la amplitud de la corriente para un pulso de las mismas características permanece estable durante el resto del registro. Por tanto, se asume que toda la corriente registrada a partir de ese momento y en estas condiciones se debe a la actividad de los canales de potasio I_K independientes de la concentración de calcio intracelular.

Relación corriente-voltaje

La figura 41A muestra una familia de corrientes de potasio generadas al despolarizar durante 40 ms una neurona septal a potenciales entre -40 y 60 mV (salto de 20 mV). La activación de la corriente se produce a potenciales de membrana más positivos de -40 mV. La cinética de activación es lenta y tiene un curso temporal sigmoideo. La corriente alcanza la amplitud máxima en 15-20 ms y no se inactiva. A medida que incrementa el grado de despolarización, aumenta la amplitud de la corriente. La relación entre amplitud máxima de la corriente (ordenada) y potencial de membrana (abscisa) se muestra en la figura 41B. El umbral para la activación de la corriente se encuentra situado a un valor de V_M alrededor de -30 mV, y a partir de este nivel al incrementar la despolarización aumenta progresivamente la amplitud. La relación corriente-voltaje se hace lineal a potenciales de membrana superiores a 20 mV.

Inactivación.

La aplicación de pulsos de larga duración (>100 ms) produce la inactivación parcial de la corriente de potasio I_K . En el presente trabajo los pulsos aplicados tuvieron una duración máxima de 200 ms. En la figura 42 se muestran las corrientes de potasio obtenidas en dos células distintas que no tenían corrientes I_t . La comparación de los registros indica que el grado de inactivación de la corriente es variable de célula a célula. En los registros de la parte A de la figura el porcentaje de inactivación al final del pulso alcanzó el 50%, mientras que en los de la parte B la corriente apenas se inactivó. El porcentaje de inactivación de la corriente presentó gran variación,

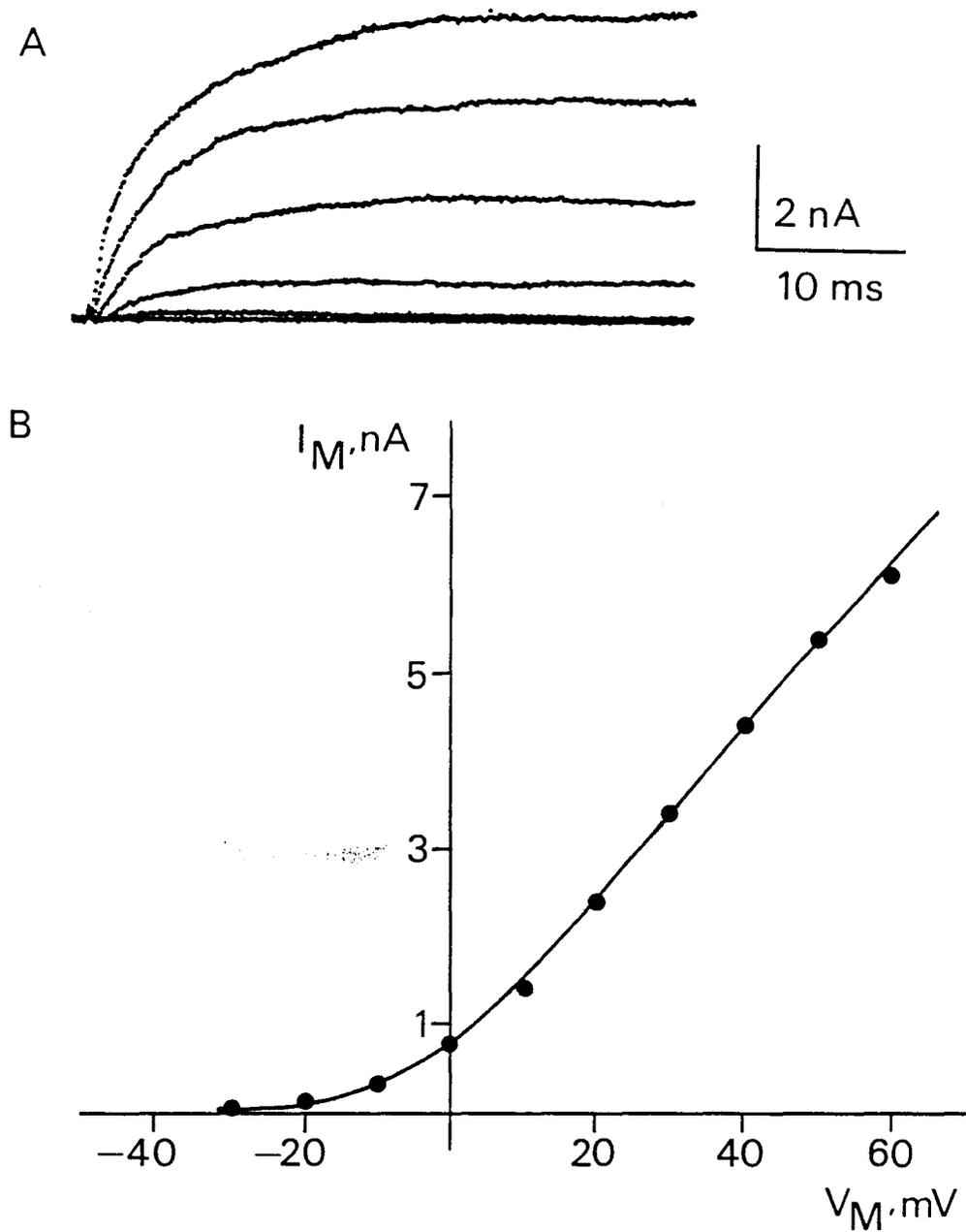


Figura 41. Familia de corrientes de potasio generadas al aplicar, desde un potencial de reposo de -80 mV, pulsos despolarizantes de 40 ms a -40 , -20 , 0 , 20 , 40 y 60 mV (A). En B se muestra la relación corriente-voltaje para la misma célula. La amplitud al final del pulso (ordenada) se representa en función del potencial de membrana durante el mismo (abscisa). Soluciones: Na·Tris, TTX//estándar.

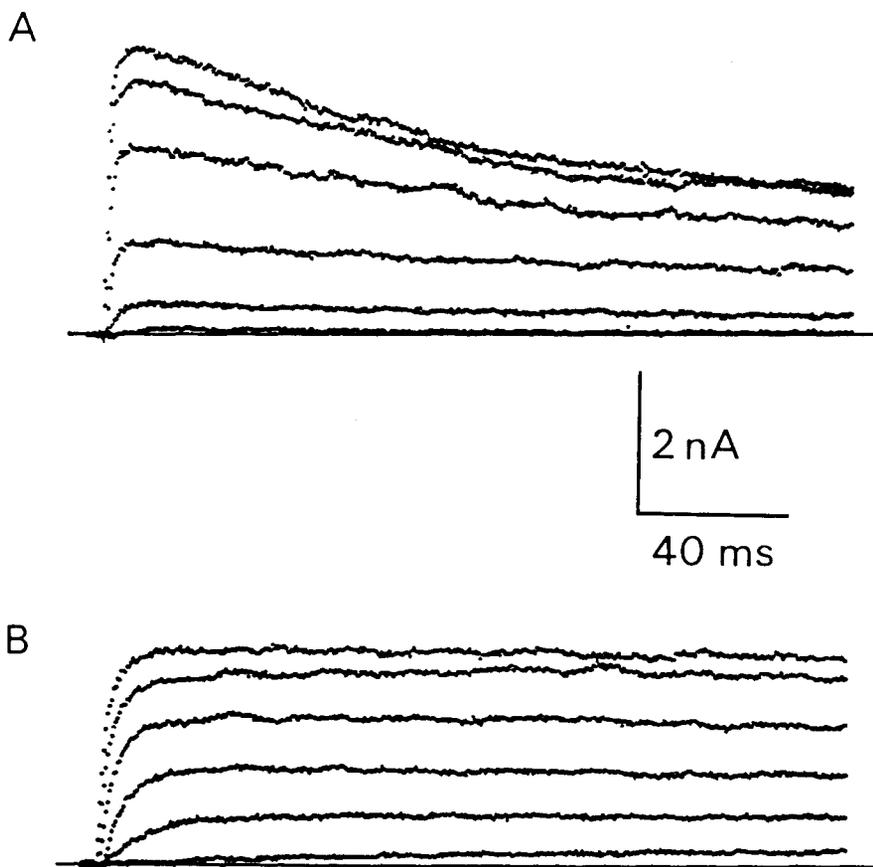


Figura 42. Inactivación de la corriente de potasio I_K . Familias de corrientes de potasio registradas en dos neuronas distintas al aplicar pulsos despolarizantes de 200 ms desde -40 a 60 mV (salto 20 mV). El porcentaje de inactivación de la corriente es distinto en cada célula. HP=-80 mV. Soluciones: Na-Tris, TTX//estándar.

siendo el valor medio de $15,54 \pm 10,92\%$ (media \pm DE, $n=22$) a un V_M de 60 mV.

Inactivación en estado estacionario.

La dependencia de la inactivación de I_K en función del potencial de membrana se ha analizado mediante el siguiente protocolo experimental. Se aplicaron prepulsos de 500 ms de duración a distintos valores de V_M seguidos de un pulso a 40 mV de 200 ms. En la Fig. 43 se representa en el eje de ordenadas la amplitud normalizada de la corriente, y en el eje de abscisas el potencial de membrana aplicado durante el prepulso. A mayor grado de despolarización durante el prepulso, menor es la amplitud de la corriente generada durante el pulso. Al potencial de membrana en reposo (-80 mV) el 100% de los canales se encuentran deinactivados. Tan sólo a potenciales de

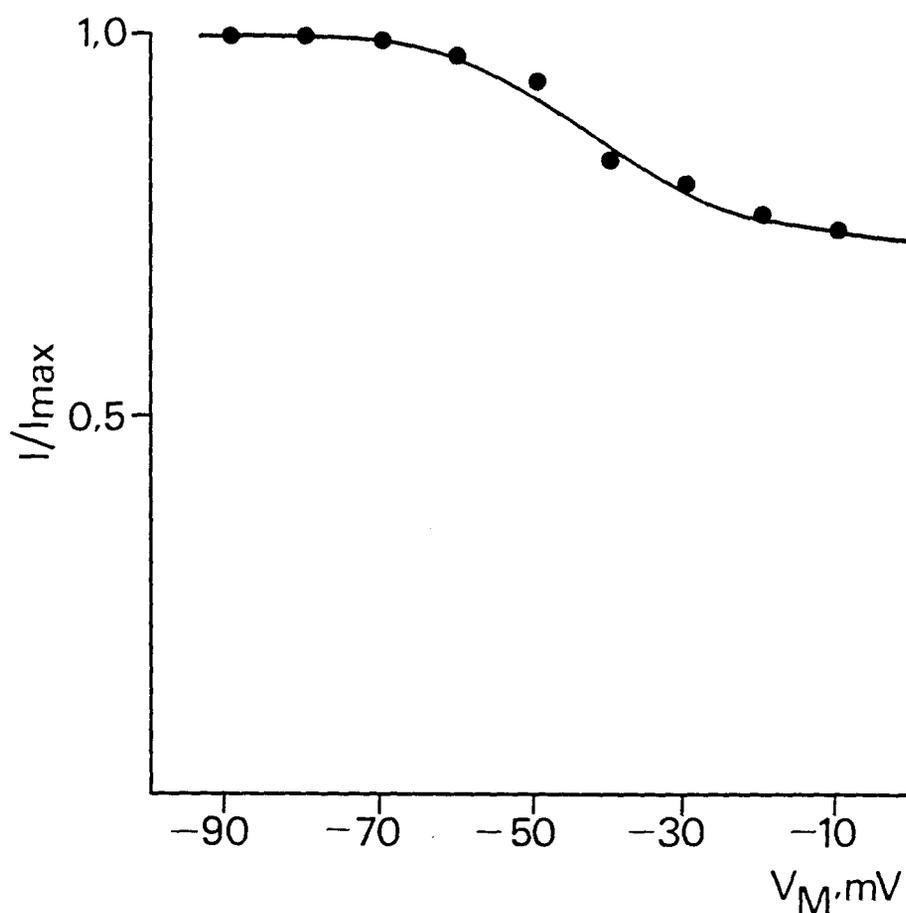


Figura 43. Inactivación en estado estacionario de la corriente de potasio I_K . La amplitud máxima de la corriente durante un pulso "test" de 200 ms a 40 mV (ordenada) se representa en función del potencial de membrana aplicado durante prepulsos de 500 ms a diferentes potenciales de membrana (abscisa). Soluciones: Na·Tris, TTX//estándar.

membrana más positivos de -60 mV se aprecia cierto grado de inactivación. A -50 mV el porcentaje de inactivación es del 5% mientras que a -10 mV únicamente el 25% de la corriente se encuentra inactivada.

En resumen, la corriente de potasio con cinética de activación lenta presente en neuronas septales se debe a la contribución conjunta de, al menos, dos tipos de corrientes de potasio I_K e $I_{K(Ca)}$. La contribución relativa de cada una de ellas a la corriente total varía en diferentes células. La corriente I_K presente en neuronas septales tiene, aunque con cinética más lenta, características similares a las descritas por Hodgkin y Huxley en el axón gigante de calamar y a las observadas en otras preparaciones de neuronas del SNC de mamíferos (Segal y Barker, 1984; Sah y col., 1988b).

7. MODULACION DE LAS CONDUCTANCIAS IONICAS DE NEURONAS SEPTALES POR NEUROPEPTIDOS.

Los canales iónicos dependientes de voltaje pueden ser modulados por una serie de moléculas denominadas neuromoduladores, entre las cuales se encuentran algunos neuropéptidos y hormonas. Los mecanismos de acción son variados, e incluyen la fosforilación de la molécula que forma el canal y la interacción de la misma con proteínas intracelulares.

En este estudio se procedió a analizar el efecto de la Hormona liberadora de la Tirotropina (TRH) y la Hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH) sobre las corrientes iónicas de neuronas septales. A estas hormonas peptídicas se les atribuye una función neurotransmisora o neuromoduladora, aunque, por el momento, no se ha descrito ningún efecto sobre las corrientes iónicas dependientes del potencial de membrana. Además, se han identificado receptores para la TRH (Simasko y col., 1984) y terminaciones en las que se libera LHRH (Reubi y col., 1987; Schwanzel-Fukuda y Pfaff, 1989) en la región septal.

7.1. Efecto de TRH y sus Derivados Sobre las Corrientes Iónicas Totales.

En el presente trabajo se han analizado los efectos que la TRH (pGlu-His-Pro amida) y su forma ácida TRHa (pGlu-His-Pro) producen sobre las corrientes iónicas de neuronas septales. Para ello, se añadieron a la solución externa cantidades entre 1 y 3 μM de estos compuestos. Inicialmente se utilizaron soluciones Na·Tris//estándar con el fin de analizar los posibles efectos sobre la corriente total.

La figura 44 resume los efectos de la TRH sobre las corrientes iónicas de neuronas septales. En la figura 44A se representa la corriente generada al aplicar un pulso de 20 ms a un potencial de membrana de 40 mV antes (control), durante (TRH) y después (lavado) de la aplicación de 1 μM TRH. Durante cada pulso se genera la corriente rápida y transitoria de sodio a la que sigue la corriente de potasio dirigida hacia el exterior. La exposición de la célula a la solución externa a la cual se ha añadido TRH produce un incremento en la amplitud de la corriente de potasio, sin afectar a la corriente de sodio. Este efecto fue totalmente reversible, como se indica en la misma figura en un registro (lavado) obtenido dos minutos después de volver a la solución control.

En la parte B de la figura se muestra el efecto sobre la corriente total, en una neurona distinta, de la

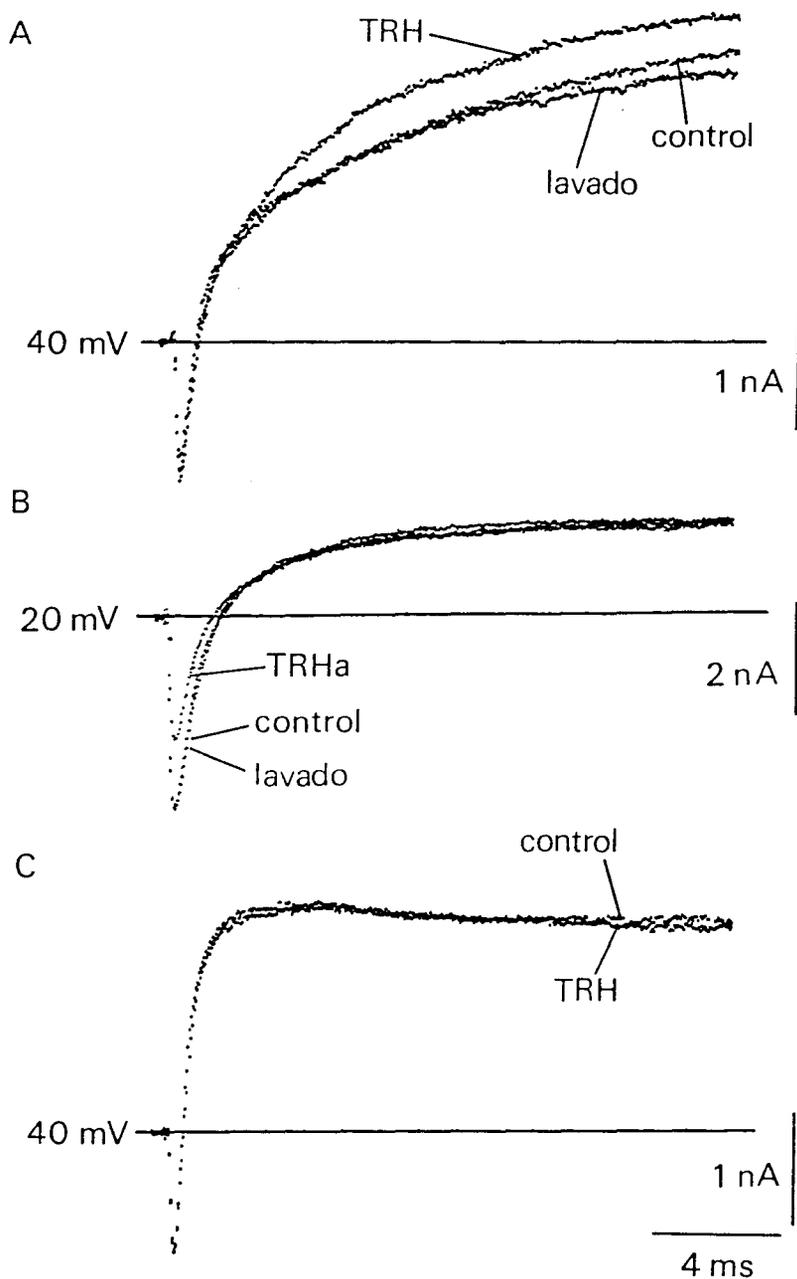


Figura 44. Efecto de TRH y su forma ácida (TRH_a) sobre las corrientes iónicas de neuronas septales. (A) corrientes generadas durante pulsos de 20 ms a 40 mV antes (control), durante (TRH) y después (lavado) de la aplicación de 1 μ M TRH. (B) Efecto de la aplicación de 2,75 μ M TRH_a sobre las corrientes generadas en otra neurona durante pulsos a 20 mV. (C) Registros obtenidos en una célula en la cual la TRH no produjo efecto alguno. Soluciones: Na·Tris//estándar.

aplicación de $2,75 \mu\text{M}$ TRHa a la solución externa. En ella se muestran los registros obtenidos con pulsos a 20 mV de 20 ms en situación control, en presencia de TRH_a, y después de volver a la solución Na·Tris. La aplicación de TRH_a produce una disminución de casi el 40% en la amplitud de la corriente de sodio, sin afectar aparentemente a la corriente de potasio. Este efecto fue totalmente reversible como se observa en el registro obtenido 90 segundos después de volver a la solución control (lavado).

En la figura 44 C se muestran, por último, registros de corrientes totales en una célula septal donde ni la TRH ni su forma ácida produjeron ninguna modificación. Además de la corriente transitoria de sodio y la de potasio de activación lenta, en esta célula también se observa la corriente de potasio rápida y transitoria, descrita anteriormente. El que existan células en las cuales no se observa cambio alguno demuestra que los efectos producidos sobre las corrientes iónicas por la hormona y sus derivados no son inespecíficos. Posiblemente las modificaciones de las conductancias iónicas requieren la presencia en la membrana de un receptor para la hormona o sus derivados (ver "Discusión").

7.1.1. Efecto de TRH Sobre la Corriente de Sodio.

El efecto de TRH_a sobre la corriente de sodio aislada se ha estudiado utilizando soluciones internas con 130 Cs para abolir la corriente de potasio. Como solución externa se utilizó la mezcla Na·Tris que contiene magnesio y con la que la corriente de calcio es mínima. El posible efecto de TRH sobre la corriente de calcio no se ha estudiado en detalle.

En la figura 45 se muestra la corriente de sodio generada en una neurona a distintos potenciales de membrana antes (control), durante (TRH_a) y después (lavado) de la aplicación de $3 \mu\text{M}$ TRH_a. La inhibición de la corriente de sodio se produce entre 30 y 50 segundos después de comenzar la aplicación de la hormona, y la recuperación total se obtiene aproximadamente un minuto después de volver a la solución control. En los tres registros se observa que la aplicación externa de TRH_a produce una reducción de la amplitud de la corriente de sodio totalmente reversible. Las pequeñas diferencias que se aprecian entre los registros control y lavado pueden ser atribuibles a los cambios producidos en la corriente de sodio a lo largo del tiempo durante el proceso de diálisis, y que se han comentado anteriormente.

La exposición a TRHa parece producir un cambio en la conductancia total para los iones de sodio sin afectar a las cinéticas de activación e inactivación. En la

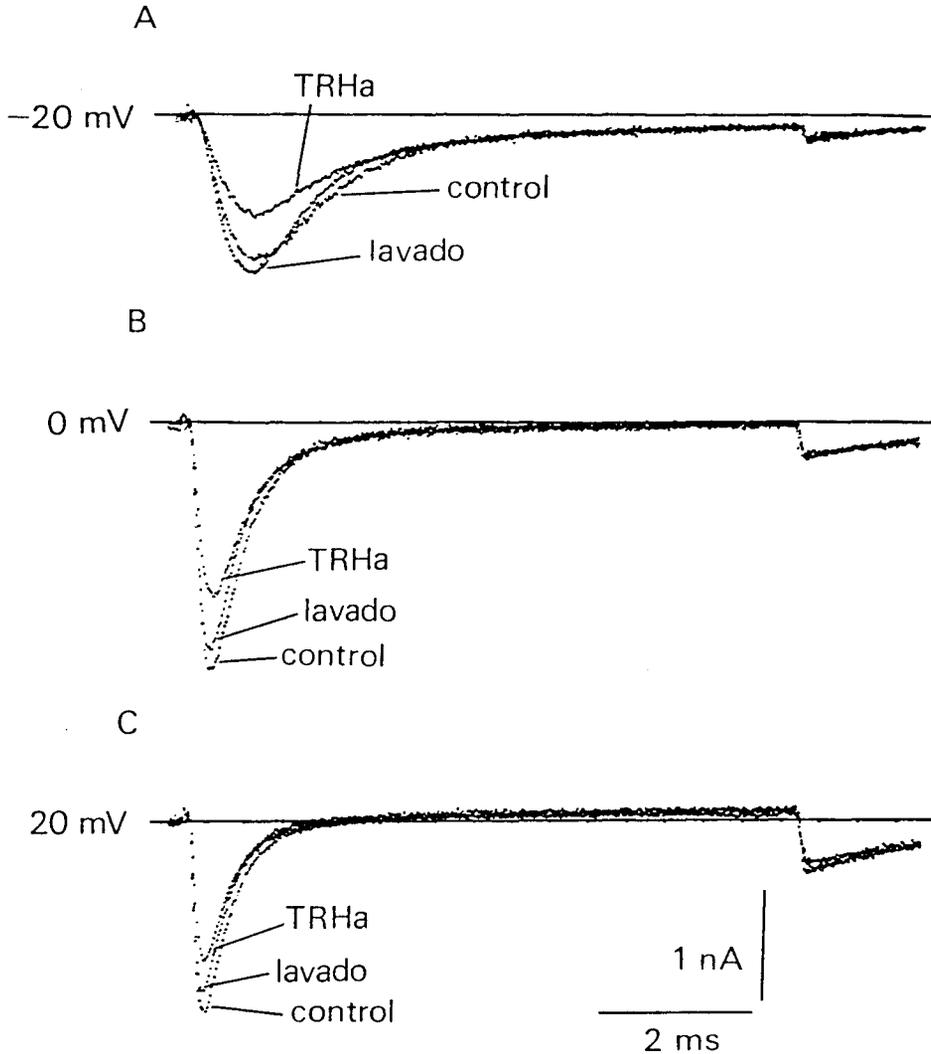


Figura 45. Efecto de la aplicación de $3 \mu\text{M TRH}_a$ sobre las corrientes de sodio generadas en una misma neurona durante pulsos de 8 ms a -20 (A), 0 (B) y 20 mV (C). Soluciones: Na·Tris//130 Cs.

figura 46 se muestran los registros correspondientes a las soluciones control y TRH_a de la figura 45 escalados a la misma amplitud. Ambos grupos de registros se obtuvieron con un intervalo de tiempo inferior a 2 minutos (para minimizar los cambios debidos a la progresión de la diálisis) y su comparación ilustra que, aparte de la disminución en amplitud, el curso temporal de las corrientes es perfectamente superponible.

La relación entre amplitud de la corriente (ordenada) y el potencial de membrana (abscisa) para la corriente de sodio antes y durante la aplicación de TRH_a , en la neurona de la figura 45, se muestra en la figura 47. Se representa con círculos la amplitud de la corriente de sodio con

solución externa Na·Tris, y con cuadrados la amplitud de la corriente en presencia de la hormona. Las relaciones I/V muestran que la corriente de sodio se afecta en proporción similar a todos los potenciales de membrana estudiados, por lo que no parece ser un efecto dependiente de este parámetro.

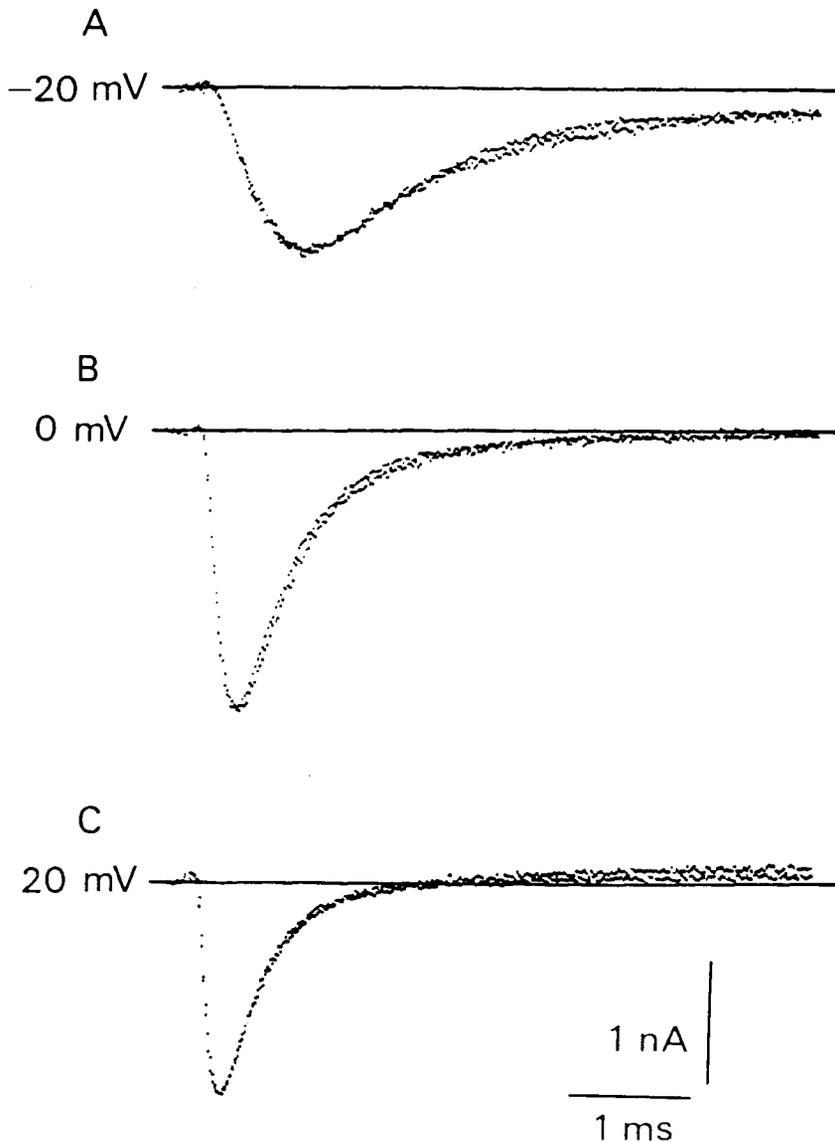


Figura 46. Registros correspondientes a solución control y TRH_a de la figura 45 escalados hasta obtener la misma amplitud. El potencial de membrana se indica junto a cada trazado. Soluciones igual que en Fig. 45.

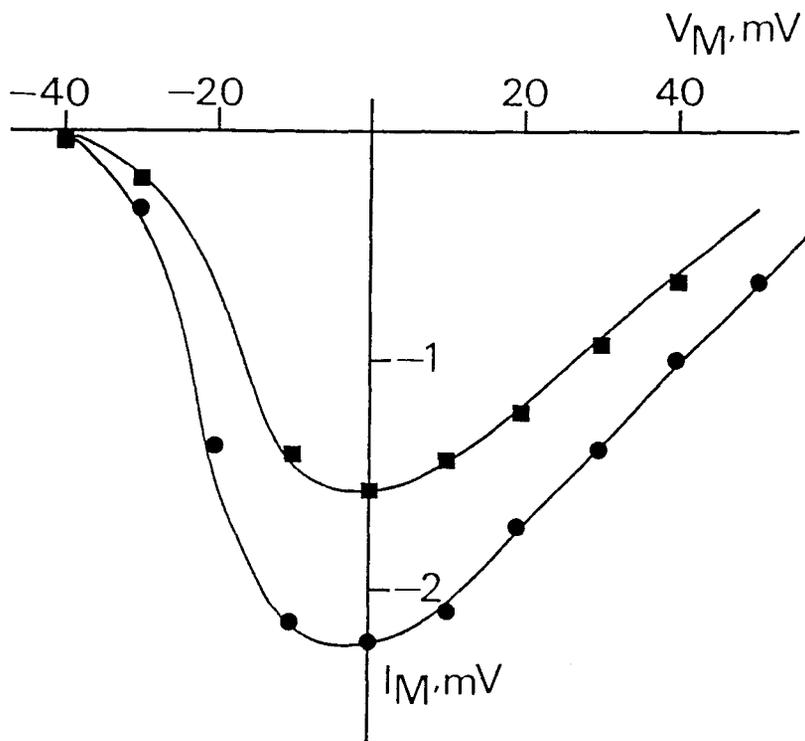


Figura 47. Relación corriente-voltaje para la corriente de sodio en situación control (●) y en presencia de $3 \mu\text{M TRH}_a$ (■) para la misma neurona de la fig. 45.

El efecto de la exposición repetida a TRHa sobre las corrientes de sodio se muestra en la figura 48. Después de una primera exposición al tripéptido y tras esperar que la reversión del efecto fuera máxima (panel A) se procedió a una segunda exposición a la misma concentración de TRHa (panel B). Mientras que la primera exposición a TRHa produjo una reducción del 28% de la corriente de sodio, durante la segunda exposición se produjo una reducción de la corriente de sodio solamente del 8%. Este fenómeno ha sido observado en todas las células en las cuales se realizaron exposiciones repetidas a TRHa, y apoya la idea de la existencia de un receptor específico en la membrana. El que se produzca un efecto menor en la segunda aplicación de la hormona puede deberse a un fenómeno de desensibilización del mecanismo responsable (ver Apartado "Discusión").

En el presente trabajo se ha estudiado el efecto de la TRHa en 63 células, en 22 de las cuales (35%) se ha observado reducción de la amplitud de la corriente de sodio. Las concentraciones de TRHa utilizadas variaron

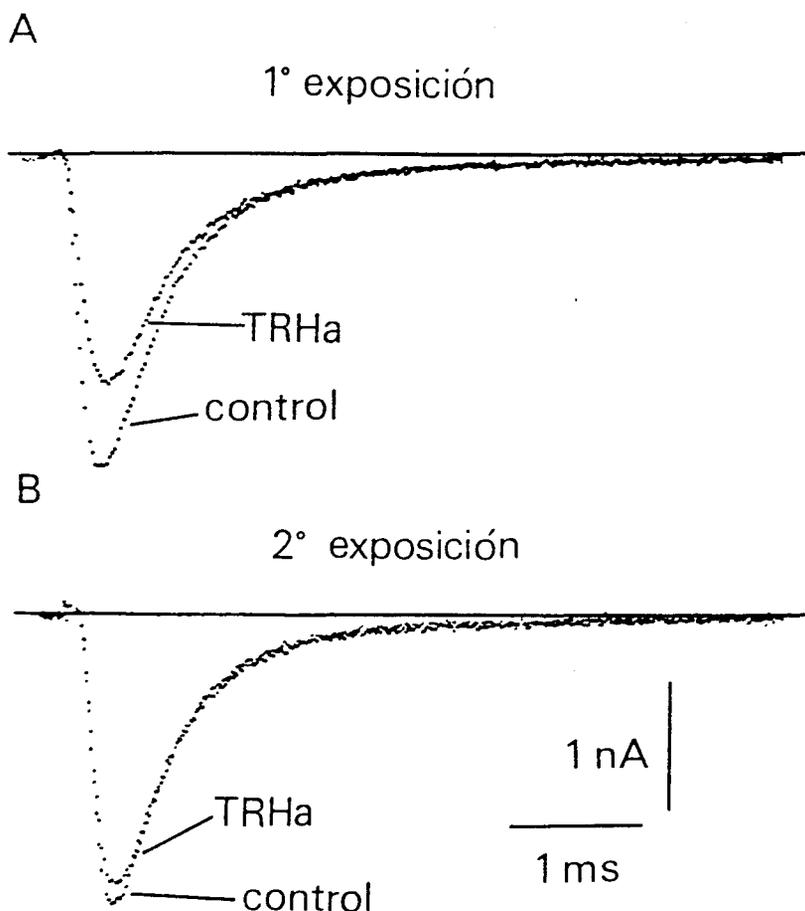


Figura 48. Efecto de la exposición repetida a TRH_a ($3 \mu M$) sobre la corriente de sodio. Las corrientes se registraron durante pulsos de 6 ms a 0 mV. Se observa que el efecto durante la segunda exposición (B) es menor que en la primera (A). Soluciones: Na·Tris//130 Cs.

entre 1 y 3 μM y la magnitud del efecto presentó grandes diferencias entre distintas células. La reducción de la corriente de sodio osciló entre el 10 y el 50%. Utilizando solución externa con una concentración de TRH_a 2,75 μM el valor medio de inhibición de la corriente de sodio para un pulso a 0 mV fue del $22,3 \pm 11,8\%$ (media \pm DE; n=14) del valor control.

7.1.2. Efecto de TRH Sobre la Corriente de Potasio.

Como se indicó anteriormente la aplicación de TRH a la solución externa produce en algunas neuronas un incremento en la amplitud de la corriente de potasio lenta sin afectar aparentemente a la corriente de sodio. En la figura 49 se muestran los registros obtenidos antes (control), durante (TRH) y después (lavado) de la

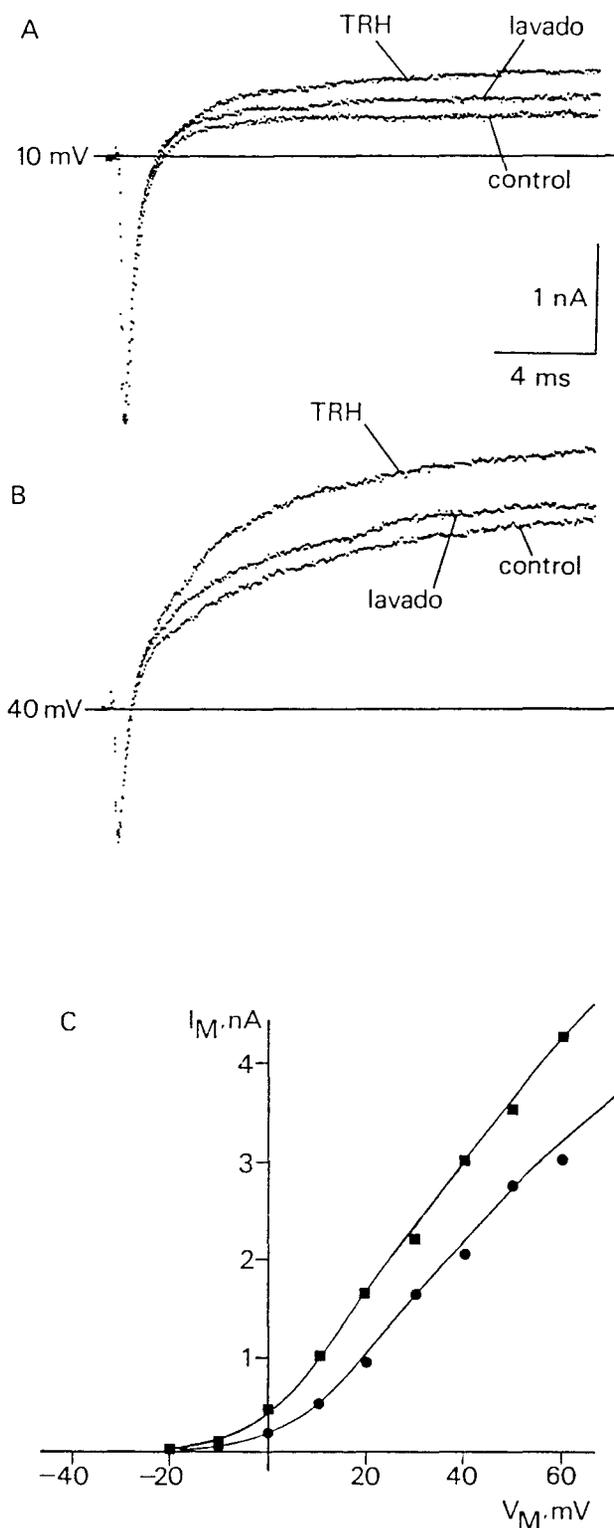


Figura 49. Efecto sobre la corriente de potasio de la adición de $1 \mu\text{M}$ TRH a la solución externa. Se muestran las corrientes generadas durante pulsos de 20 ms a 10 (A) y 40 mV (B). (C) relación corriente-voltaje para la corriente de potasio en la misma neurona. Los círculos corresponden a solución control y los cuadrados a TRH. Soluciones: Na·Tris//estándar.

aplicación de 1 μM TRH a la solución externa al estimular la célula con pulsos de 20 ms a 10 (A) y 40 mV (B). La aplicación del pulso genera en primer lugar la corriente rápida de sodio, a la que sigue la corriente de potasio con cinética de activación lenta. La aplicación de la hormona a la solución externa produjo un aumento en la amplitud de la corriente de potasio sin afectar a la corriente de sodio. Este efecto fue reversible, como puede observarse en los registros obtenidos aproximadamente dos minutos después de volver a la solución control (lavado).

En la parte C de la figura se representa la relación corriente-voltaje para la corriente de potasio en esta misma neurona antes y durante la aplicación a la solución externa de TRH. Con círculos se representa la amplitud de la corriente de potasio en solución Na·Tris, y con cuadrados la amplitud en presencia de la hormona. Puede observarse que la amplitud de la corriente de potasio es mayor cuando la hormona se encuentra presente en la solución externa. Este efecto de la TRH posiblemente se debe a que en estas células la hormona induce liberación de Ca^{2+} de almacenes intracelulares con la consiguiente activación del componente de corriente de potasio activado por Ca^{2+} (ver "Discusión").

7.4. Efecto de LHRH Sobre las Corrientes Iónicas de Neuronas Septales.

La Hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH) es un decapeptido que se encuentra estructuralmente relacionado con la TRH ya que los dos primeros aminoácidos situados en el extremo carboxilo son idénticos (pGlu-His-). Asimismo, existen datos de la existencia de terminaciones nerviosas en las que se libera LHRH en la región septal (Reubi y col., 1987; Schwanzel-Fukuda y Pfaff, 1989).

En algunas células en las que previamente se había observado una reducción en la amplitud de la corriente de sodio al aplicar TRH_a a la solución externa, se llevó a cabo una posterior exposición a la misma concentración (2-3 μM) de LHRH. En la Fig. 50 se muestra el efecto sobre la corriente de sodio de la adición de 3 μM TRH (A) y LHRH (B) a la solución externa. En todas las células estudiadas hasta el momento (n=4) se observó durante la aplicación de LHRH una disminución de la amplitud de la corriente de sodio, aunque siempre de menor magnitud que la producida previamente por TRH_a . El tanto por ciento de reducción de la corriente de sodio en esta célula por la acción de LHRH fue del 11%, mientras que la exposición previa a TRH redujo la corriente en un 31%.

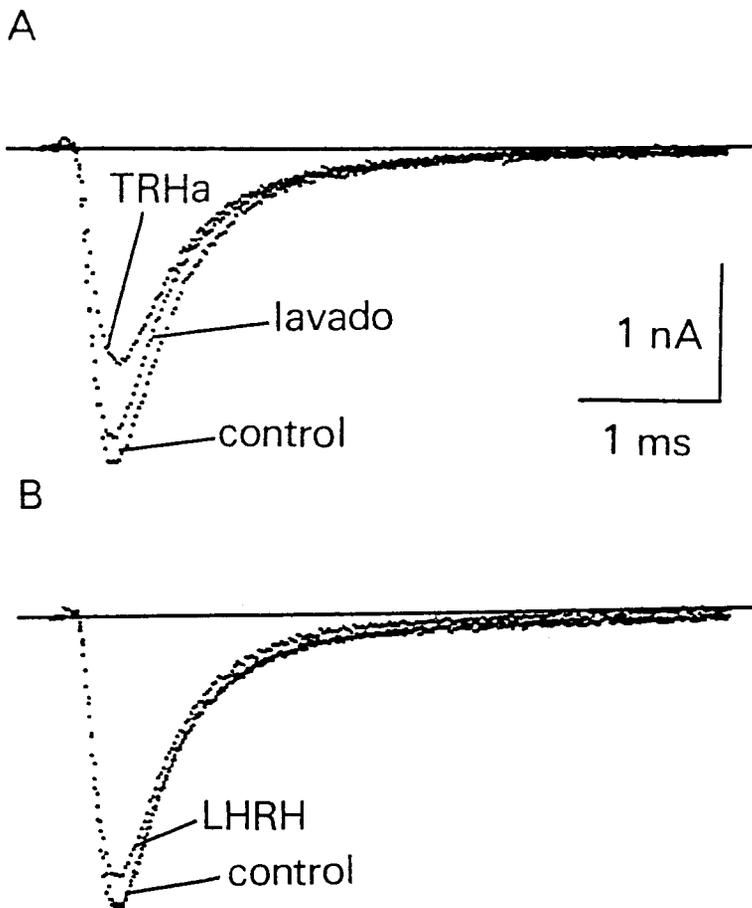


Figura 50. Efecto de la aplicación de $3 \mu\text{M}$ TRH y LHRH a la solución externa. La aplicación de TRH produce una reducción de la corriente de sodio de un 31% (A). Después de esperar a la reversión del efecto, la aplicación de LHRH produce una nueva disminución de la amplitud de la corriente, aunque de menor magnitud (11%). Soluciones: Na-Tris//130 Cs.

En ningún caso se ha estudiado el efecto producido por la aplicación de LHRH en primer lugar. No se descarta la posibilidad de que el mecanismo responsable para ambas hormonas sea el mismo y que se encuentre ya previamente desensibilizado en las células estudiadas, ya que anteriormente han sido expuestas a TRH_a (ver Apartado "Discusión"). Estos datos son preliminares y, por el momento, no se ha estudiado la acción de la LHRH sobre otras corrientes iónicas de neuronas del septum.

DISCUSION

El presente trabajo trata sobre el estudio de los canales iónicos dependientes del potencial de membrana de neuronas septales disociadas y mantenidas en cultivo, utilizando la configuración de "whole-cell " de la técnica de "patch-clamp" (Hamill y col., 1981). Se han estudiado las propiedades cinéticas de las corrientes de sodio, calcio y potasio de forma individualizada y, dentro de algunos de estos canales, se han caracterizado subtipos distintos. Además de estos datos electrofisiológicos cuantitativos, que son de importancia crítica para comprender a nivel celular la fisiología de neuronas centrales, se ha investigado también el efecto modulador de dos neuropéptidos (TRH y LHRH) sobre las corrientes iónicas de neuronas del septum. Los resultados muestran un claro efecto modulador de la TRH sobre los canales de sodio, lo cual es una observación de gran interés ya que no se conocía ningún modulador fisiológico de este tipo de canales iónicos.

1. LAS NEURONAS SEPTALES EN CULTIVO MANTIENEN INTACTAS SUS PROPIEDADES ELECTROFISIOLOGICAS.

Nuestro trabajo pone de manifiesto que la preparación de neuronas centrales en cultivo es útil para el estudio electrofisiológico cuantitativo ya que las células mantienen prácticamente intactas sus propiedades biofísicas. Las neuronas septales tras la dispersión son excitables y generan potenciales de acción de características similares a los que se registran en secciones de septum *in vitro* (López-Barneo y col., 1985; Alvarez de Toledo y López-Barneo, 1988). Estas células tienen, al menos durante las primeras horas de cultivo,

una forma esférica lo que permite un control adecuado del potencial de membrana y la aplicación con fiabilidad de las técnicas de "voltage-clamp" (Hodgkin y col., 1952; Hamill y col., 1981). Las neuronas septales en cultivo tienen además una membrana suficientemente regular como para permitir la obtención de sellos de alta resistencia entre la micropipeta de registro y la célula, y una densidad alta de canales iónicos funcionales. Estas propiedades permiten el registro con calidad de corrientes de sodio y de calcio de varios nA de amplitud.

Como se ha mencionado anteriormente las neuronas septales dispersas tienen forma esférica y están desprovistas de prolongaciones. Es muy posible, por lo tanto, que la membrana de las células aisladas pertenezca en su mayor parte al soma y, en una proporción apreciable, a las dendritas proximales. Las dendritas distales quedan posiblemente fuera de la membrana objeto de estudio. Este hecho limita los resultados desde el punto de vista de la influencia de la geometría en la fisiología neuronal, ya que se sabe que parte de la complejidad de la conducta electrofisiológica de las neuronas del SNC reside en la distribución diferencial de las conductancias iónicas a lo largo de la membrana del soma y las dendritas y en la comunicación electrotónica entre ambas (Llinás, 1984; Llinás y Yarom, 1981). Nuestra preparación si es útil, por el contrario, para establecer qué conductancias iónicas existen en el soma, o en las inmediaciones, y para analizar las variaciones de estas conductancias entre células distintas.

2. LA EXCITABILIDAD DE NEURONAS SEPTALES DEPENDE DE VARIOS TIPOS Y SUBTIPOS DE CANALES IONICOS.

En todas las neuronas septales estudiadas se registraron una corriente de sodio, uno o dos tipos de corrientes de calcio y, al menos, dos tipos de corrientes de potasio. La utilización de soluciones adecuadas y la aplicación de bloqueantes específicos ha permitido aislar cada tipo de corriente y analizarla desde un punto de vista cuantitativo.

La corriente de sodio se activa de forma rápida y se inactiva en pocos milisegundos, es sensible al bloqueo por TTX y muestra características (ver apartado 3) que cualitativamente la hacen similar a la descrita por Hodgkin y Huxley en el axón gigante de calamar (Hodgkin y Huxley, 1952).

El bloqueo de los canales de sodio por la aplicación externa de TTX y la sustitución de los iones potasio por

cesio en la solución interna, permite el aislamiento de la corriente de calcio. Esta corriente es sensible al bloqueo por cationes divalentes actuando desde la cara externa de la membrana, y tiene mayor amplitud cuando el Ba^{2+} es el ión portador de carga. En función de sus diferentes características biofísicas (ver apartado 3) en neuronas del septum se han identificado dos tipos de corrientes de calcio: corriente a través de canales con cinética de deactivación rápida, denominados FD y a través de canales con cinética de deactivación lenta o SD. Esta es, en nuestra opinión, una de las principales contribuciones de este trabajo, ya que hasta ahora la mayoría de los estudios en los que se describen dos tipos de conductancias para el calcio en neuronas del SNC se han realizado con registro intracelular, y en los escasos trabajos realizados con "voltage-clamp" no se llevó a cabo un análisis biofísico cuantitativo.

La contribución relativa de cada tipo de corriente de calcio a la corriente total en neuronas del septum varía de célula a célula. La práctica totalidad de las neuronas poseen canales de calcio FD, mientras que tan sólo un cierto número tienen, además, canales SD (véase la Fig. 31). La contribución de los canales FD a la corriente total es, generalmente, mayor que la de los canales SD. Esta variabilidad es de gran importancia fisiológica ya que, como se discutirá más adelante (apartado 4), es una de las bases de la distinta electrofisiología observada en los diferentes tipos neuronales del septum (Alvarez de Toledo y López-Barneo, 1988).

Las neuronas septales, además de tener corrientes de sodio y calcio, pueden generar, al menos, dos tipos de corrientes de potasio. Todas las células al ser despolarizadas producen una corriente dirigida hacia el exterior que se activa de forma lenta, alcanza un máximo de amplitud y se inactiva, en proporción variable, con pulsos de larga duración. Esta corriente desaparece al sustituir los iones K^+ del interior de la pipeta por Cs^+ y se debe a la actividad de los canales de potasio dependientes de voltaje (I_K) y, en menor medida, a los canales de potasio activados por Ca^{2+} ($I_{K(Ca)}$).

Además de la corriente de potasio con cinética de activación lenta, en el 27% de las neuronas estudiadas se registró una corriente dirigida hacia el exterior con cinéticas de activación e inactivación rápidas (I_t). El hecho de que esta corriente se genere tan sólo en una proporción de las neuronas septales aisladas es de gran importancia y, como se discutirá más adelante es, al igual que ocurre con los distintos tipos de corrientes de calcio, base de la diversidad electrofisiológica observada en neuronas de diferentes zonas del septum (Alvarez de Toledo y López-Barneo, 1988).

En neuronas intactas se ha sugerido que la distribución de los distintos tipos de canales iónicos a lo largo de la membrana somatodendrítica tiene gran importancia en la determinación del patrón de disparo. En relación a los canales de calcio, algunos autores sugieren que las conductancias responsables de los potenciales de acción de calcio de bajo y alto umbral de neuronas del SNC de mamíferos, además de tener distintos umbrales de activación y distinta cinética, se encuentran distribuidos de forma diferente a lo largo de la membrana de las células. Se piensa que las espigas de calcio de bajo umbral se generan en el soma, mientras que las de alto umbral se originan en las dendritas (Llinás y Yarom, 1981; Jahnsen y Llinás, 1984; Yaari y col., 1987).

En neuronas disociadas y desprovistas de arborizaciones dendríticas del núcleo geniculado lateral (Hernández-Cruz y Pape, 1989) se han identificado canales de calcio con diferentes umbrales de activación. En estas mismas células, registros con "current-clamp" muestran espigas de calcio de alto y bajo umbral. En nuestros experimentos, se han registrado corrientes de calcio a través de canales SD y FD, siendo generalmente mayor la contribución relativa de los canales FD que la SD a la corriente total. Como se indicó anteriormente, las neuronas disociadas del septum tienen una morfología aproximadamente esférica y se encuentran totalmente desprovistas de prolongaciones. La membrana de las células posiblemente pertenece, en su mayor parte, al soma y a las dendritas proximales. Estos datos sugieren que al menos un porcentaje de ambos tipos de canales se encuentran localizados en el soma o muy cercano a él. Este hecho apoya la idea de que la diferencia en los umbrales de activación de ambos tipos de espigas de calcio observado en neuronas disociadas del núcleo geniculado lateral (Hernández-Cruz y Pape, 1989) puede estar relacionada con un distinto rango de activación de las corrientes responsables, independientemente de la diferente distribución espacial.

Esta conclusión no está necesariamente en contra de las sugerencias sobre los distintos lugares de origen para cada tipo de espiga en neuronas intactas. Si se asume que los canales SD se encuentran restringidos al soma, y que los FD están distribuidos homogéneamente a lo largo de toda la membrana, la contribución de los canales localizados en las dendritas a la respuesta electrofisiológica podría ser determinante, debido a la mayor superficie de las dendritas en aquellas neuronas en las que están electrotónicamente bien acopladas al soma. Alternativamente, es posible que los canales FD se encuentren localizados predominantemente, aunque no de forma exclusiva, en las dendritas.

3. CARACTERISTICAS CINETICAS Y COMPARACION DE LAS CORRIENTES IONICAS DE NEURONAS SEPTALES CON LAS DE OTRAS PREPARACIONES

En este apartado se comentan las características biofísicas más importantes de las corrientes iónicas de neuronas septales y se comparan con las de otros tipos de neuronas del SNC de mamíferos y, en algunos casos, con las de otras preparaciones de vertebrados.

Corriente de sodio

Como se indicó anteriormente, la corriente de sodio de neuronas septales es cualitativamente similar a la I_{Na} del axón gigante de calamar (Hodgkin y Huxley, 1952). La corriente tiene una cinética de activación y de inactivación muy rápida, se bloquea completamente con concentraciones μM de TTX y es muy selectiva para los iones Na^+ . La amplitud máxima se alcanza en 0,4-0,5 ms a 0 mV. Esta cinética de activación es similar a la de la corriente de sodio de motoneuronas de gato (Barret y Crill, 1980), y algo más rápida que la observada en neuronas del área CA1 de hipocampo (Sah y col., 1988a) y en otros tipos celulares (Ureña y col., 1989a; Matteson y Armstrong, 1984). Al analizar la relación I-V se observa que la amplitud máxima de la corriente se obtiene a un potencial de membrana alrededor de -10 mV, valor muy parecido al obtenido en neuronas neocorticales (Huguenard y col., 1988) y células de hipocampo (Sah y col., 1988a).

La relación corriente-voltaje para la corriente de sodio se ha analizado en diferentes condiciones experimentales (variando la concentración de Na^+ a ambos lados de la membrana). En ausencia de Na^+ en la solución interna y utilizando soluciones externas con 130 y 80 mM Na^+ , las relaciones corriente-voltaje son prácticamente superponibles. El umbral de activación es el mismo en ambas condiciones y la amplitud máxima de la corriente se obtiene al mismo valor de V_M . Este hecho confirma la existencia de un buen control del potencial de membrana aplicado a la célula, sin aparentes problemas debidos a la existencia de resistencias en serie a la entrada del convertidor corriente-voltaje, ya que diferencias de más de 2 nA en la amplitud de la corriente (entre una y otra situación), utilizando electrodos con resistencia comprendida entre 1,5 y 2 Mohm, no producen cambios en la relación I-V.

En aquellos experimentos en los que se ha utilizado solución interna con 40 mM Na se comprobó que la diálisis de la fase acuosa del medio intracelular es rápida y total. En registros obtenidos entre 15 y 30 segundos después del establecimiento de la configuración

"whole-cell", la corriente de sodio cambia de dirección a un potencial de membrana muy parecido al calculado teóricamente. El potencial de equilibrio teórico para el Na^+ en estas condiciones experimentales y el observado se diferenciaron en tan sólo 0,5-1 mV. Este resultado también da idea de la alta selectividad de estos canales para los iones Na^+ en relación a los demás iones.

El umbral de activación de la corriente de sodio en neuronas septales se encuentra situado entre -45 y -40 mV, mientras que en hipocampo (Sah y col., 1988a) la corriente se activa a -60 mV y en neuronas neocorticales (Huguenard y col., 1988) alrededor de -55 mV, valores ambos más negativos. En nuestros experimentos el 50% de la conductancia máxima se obtiene a un potencial de membrana de -35 mV. Este valor es similar al observado en neuronas neocorticales (-30 mV; Huguenard y col., 1988) y células de hipocampo (-30 mV; Sah y col., 1988a). La conductancia máxima para el sodio en neuronas septales tiene un valor medio de 90,6 nS. Asumiendo una conductancia de 18 pS para cada canal (Sigworth y Neher, 1980; Stühmer y col., 1987) y siendo la capacidad media de las células de 7,9 pF, se obtiene un valor de 6,1 canales por μm^2 . Valores muy similares se han obtenido en neuronas del área CA1 de hipocampo (Sah y col., 1988), donde se calcula una densidad de 5-10 canales por μm^2 . Esta densidad de canales, por el contrario, es muy diferente a la observada en el nodo de Ranvier de las fibras nerviosas (Hille, 1984).

La corriente de sodio, al igual que ocurre en el axón gigante de calamar y en otras preparaciones, también se inactiva. Sin embargo, existen algunas diferencias cuantitativas en este proceso entre los distintos tipos celulares. En nuestra preparación la deinactivación de la totalidad de los canales de sodio se obtiene alrededor de -100 mV, mientras que el 50% de los mismos están inactivados a un potencial de membrana de -48 mV. En neuronas neocorticales el 100% de los canales están inactivados a -90 mV, y el 50% a -60 mV (Huguenard y col., 1988). Estos valores son muy distintos a los observados en neuronas del área CA1 de hipocampo donde la deinactivación total se obtiene a -120 mV, y el 50% de inactivación a -89,5 mV (Sah y col., 1988a).

El curso temporal de la inactivación de la corriente de sodio en nuestra preparación puede ser ajustado mediante una única función exponencial, al contrario de lo que ocurre en neuronas del neocortex (Huguenard y col., 1988) en las que es necesaria la suma de dos exponenciales, y en neuronas de hipocampo (Sah y col., 1988a) en las que, si bien a potenciales de membrana negativos el ajuste se realiza con una única función, a potenciales más despolarizados se necesitan dos funciones

exponenciales para realizar el ajuste. Una vez inactivada la corriente, la recuperación total de la inactivación en neuronas septales se obtiene aproximadamente en 50 ms a un potencial de membrana de -120 mV, 250 ms a -100 mV y 500 ms a -80 mV. Estos valores son superiores a los obtenidos en neocortex (12 ms a -120 mV; Huguenard y col., 1988) y parecidos a los observados en hipocampo (Sah y col., 1988a) donde a -120 mV la recuperación total se produce en 50 ms, aunque a -80 mV se obtiene en algo más de 100 ms.

En algunas células sometidas a "patch-clamp" se han observado cambios en la dependencia del potencial de membrana de la corriente de sodio (Fenwick y col., 1982; Fernández y col., 1984) y potasio (Tabares y col., 1989) a medida que transcurre el tiempo desde el comienzo de la diálisis del citosol. Este cambio también ha sido observado en nuestra preparación. En neuronas septales, la relación corriente-voltaje para la corriente de sodio se desplaza entre 10 y 15 mV hacia potenciales negativos en los primeros 15-20 minutos después del comienzo del experimento. Durante la diálisis intracelular se han observado cambios dependientes del tiempo en la corriente de calcio, los cuales se deben a procesos enzimáticos activados por calcio. Estos cambios se retardan por la adición de nucleótidos exógenos (Forscher y Oxford, 1985; Cota, 1986). En neuronas septales la adición de 3 mM ATP-Mg produce un retraso en el desplazamiento de la curva I-V, aunque no logra impedirlo. Este fenómeno no ha sido estudiado con mayor detalle en el presente trabajo.

En resumen, la corriente de sodio dependiente del potencial de membrana de neuronas septales es cualitativamente similar a la observada en otras preparaciones de neuronas del SNC, aunque existen diferencias en algunos de los parámetros biofísicos que la definen.

Corrientes de calcio

Las neuronas septales generan corrientes de calcio que se deben a la actividad de dos tipos distintos de canales cuya contribución relativa varía de célula a célula. Estos datos corroboran evidencias obtenidas en los últimos 3-4 años sobre la existencia de más de un tipo de canal de calcio en distintas preparaciones celulares de vertebrados. Entre éstas se encuentran células secretoras (Cota, 1986; Matteson y Armstrong, 1986; Hiriart y Matteson, 1988; Tabares y col., 1989), células musculares (Bean, 1985) y neuronas (Carbone y Lux, 1984; Fox y col., 1987; Yaari y col., 1987; Meyers y Barker, 1989; Ffrench-Müllen y col., 1989, Hernández-Cruz y Pape, 1989). En células de la pars intermedia de la hipófisis (Cota, 1986), β -pancreáticas (Hiriart y Matteson, 1988) y



adrenocorticales (Tabares y col., 1989) se han distinguido dos tipos de canales de calcio (SD o tipo T y FD o L) en función de sus diferentes cinéticas de cierre, curso temporal y umbral de activación. En neuronas del ganglio de la raíz dorsal (Nowycky y col., 1985) se ha postulado, por el contrario, la existencia de tres tipos distintos de canales de calcio, los dos anteriormente citados y un tercero denominado tipo N y que tiene características intermedias entre los dos anteriores.

Los trabajos con "voltage-clamp" sobre corrientes de calcio en neuronas de SNC de mamíferos son, por ahora, escasos. En neuronas de hipocampo (Yaari y col., 1987; Meyers y Barker, 1989) y del núcleo geniculado lateral (Hernández-Cruz y Pape, 1989) se han identificado dos tipos distintos de canales de calcio, que se corresponden con los tipos T y L. En células del área CA1 de hipocampo (Ffrench-Müllen, 1989) se han identificado dos subtipos de canales de calcio de alto umbral, y no se ha detectado la presencia de canales tipo T. En neuronas de neocortex (Hamill y col., 1987) existen diferencias entre distintos tipos celulares; las células no-piramidales poseen tan sólo canales de alto umbral (FD), mientras que las piramidales poseen tanto canales SD como FD, pero en ninguna de ellas se han detectado canales tipo N. Tan sólo en neuronas del área CA3 de hipocampo se han identificado tres tipos de canales de calcio (Madison y col., 1987). En la mayoría de estos trabajos no se ha realizado un estudio cuantitativo de la corriente, lo que impide la comparación detallada con nuestros datos. En los párrafos siguientes se comparan, no obstante, los parámetros de los canales de calcio de neuronas septales con los de canales identificados en otras preparaciones no neuronales.

El curso temporal de la corriente "total" de calcio de neuronas septales es similar al que se observa en otras células de vertebrados; la corriente se activa en 2-3 ms y, con pulsos de corta duración, no se inactiva. La amplitud máxima se obtiene a un potencial de membrana entre 10 y 20 mV, al igual que ocurre en células de pituitaria (Cota, 1986) y en neuronas del ganglio de la raíz dorsal (Nowycky y col., 1985), pero a un nivel aproximadamente 20 mV más positivo que el observado en neuronas de hipocampo (Yaari y col., 1987; Meyers y Barker, 1989), neuronas del núcleo geniculado lateral (Hernández-Cruz y Pape, 1989) y células adrenocorticales (Tabares y col., 1989).

En neuronas septales los dos tipos de canales de calcio tienen características que los hacen semejantes a las de los canales denominados SD y FD. En nuestros experimentos, los canales SD se activan a un potencial de membrana alrededor de -40 mV, al igual que ocurre en células de la pars intermedia de la glándula pituitaria

(Cota, 1986) y en células GH3 (Matteson y Armstrong, 1986). Este valor es más positivo que el descrito en neuronas de hipocampo (Yaari y col., 1987; Meyers y Barker, 1989) y del núcleo geniculado lateral (Hernández-Cruz y Pape, 1989). La constante de tiempo de la deactivación de los canales SD varió entre 1,9 y 2,3 ms, valores muy similares a los obtenidos en pars intermedia (Cota, 1986), células GH3 (Matteson y Armstrong, 1986) y células adrenocorticales (Tabares y col., 1989). La aplicación de pulsos de larga duración produce la inactivación de los canales SD; al final de un pulso de 100 ms la corriente que pasa a través de estos canales es sólo el 30% de la corriente máxima inicial. Este hecho también ha sido constatado en células secretoras (Cota, 1986; Matteson y Armstrong, 1986; Tabares y col., 1989) y neuronas (Yaari y col., 1987; Meyers y Barker, 1989; Hernández-Cruz y Pape, 1989).

Los canales FD de neuronas septales se activan a un potencial de membrana alrededor de -20 mV, valor similar al que se observa en otras preparaciones neuronales (Yaari y col., 1987; Meyers y Barker, 1989; Hernández-Cruz y Pape, 1989). Estos canales se activan en 1-2 ms y apenas se inactivan, ya que al final de un pulso de 100 ms la amplitud del componente rápido de la corriente de cierre es el 90% del valor máximo. En neuronas del núcleo geniculado lateral (Hernández-Cruz y Pape, 1989) la activación de la corriente es más lenta, ya que la amplitud máxima se alcanza en 6 ms a 35 mV. La constante de tiempo de la deactivación de estos canales es de aproximadamente 0,150 ms, muy similar a lo calculado en otras preparaciones (Cota, 1986; Matteson y Armstrong, 1986; Tabares y col., 1989; Ureña y col., 1989a).

Una de las características que se observa en los canales FD y que no se aprecia en los SD es la pérdida de actividad a lo largo del experimento. La amplitud de la corriente a través de los canales FD disminuye a medida que transcurre el tiempo desde el establecimiento de la configuración "whole-cell", mientras que la corriente a través de los canales SD permanece intacta (ver Fig. 30). Este fenómeno se debe a una disminución del número de canales funcionales, cuya causa parece ser la defosforilación de un sitio regulador asociado al canal debido a la disminución de la actividad de proteína-quinasa durante el proceso de diálisis (Kostyuk, 1984), y se ha observado en todas las preparaciones en las que existen canales de calcio tipo FD. La adición de ATP-Mg a la solución interna retrasa este proceso de lavado, aunque no logra impedirlo totalmente (Cota, 1986; Ureña y col., 1989a; Rodríguez-Benot y col., 1989).

En resumen, las neuronas septales tienen dos tipos de canales de calcio cuyas características generales son

similares a las de los canales denominados SD, tipo T o de bajo umbral y FD, tipo L o de alto umbral de neuronas y células secretoras. En nuestros experimentos no se apreciaron evidencias de la presencia de canales tipo N.

Corrientes de potasio

El curso temporal de la corriente de potasio de neuronas septales es, generalmente, complejo, lo cual sugiere la existencia de más de un componente. La aplicación de diferentes protocolos experimentales permite separar dos tipos de corrientes de potasio dependientes del potencial de membrana: una corriente con cinética de activación lenta y que apenas se inactiva, a la que se denomina I_K , y una corriente que se activa e inactiva de forma rápida, denominada I_t .

El protocolo experimental utilizado para el estudio de la I_t ha sido el método de sustracción, usado anteriormente en otras preparaciones celulares (Segal y Barker, 1984; Castellano y col., 1989). En neuronas septales, este método permite aislar la corriente I_t sin afectar a otras corrientes de potasio, debido a que, como se observa en los registros de la Fig. 35, la corriente de potasio lenta apenas se inactiva cuando el potencial de reposo varía entre -110 y -50 mV.

La corriente rápida y transitoria de potasio I_t se registró en aproximadamente el 30% de las células estudiadas. El umbral de activación de esta corriente se encuentra situado a un potencial de membrana algo más positivo de -50 mV. A 40 mV la corriente alcanza la amplitud máxima en 4-5 ms y se inactiva con un curso temporal exponencial en menos de 50 ms. La cinética de la I_t es similar a la observada en otras preparaciones de neuronas de SNC de mamíferos. En neuronas de hipocampo (Segal y Barker, 1986) la corriente transitoria de potasio, a la que se denomina I_A , se activa en 3-5 ms y se inactiva en aproximadamente 30 ms. En neuronas del área CA3 de hipocampo (Zbicz y Weight, 1985) se han descrito dos tipos distintos de corrientes transitorias de potasio, una denominada I_A y que es más parecida a la corriente transitoria (corriente "A") descrita en neuronas de moluscos (Connors y Stevens, 1971) y otra corriente denominada "fast transient current", la cual es dependiente de calcio, y cuyas características generales (activación, inactivación y umbral) son muy similares a las observadas en nuestros experimentos. En células del área CA1 de hipocampo (Halliwell y col., 1986) se ha identificado una corriente transitoria que se activa rápidamente con un umbral situado a -55 mV y se inactiva con una constante de tiempo de 50 ms.

La corriente rápida y transitoria de potasio que se genera en neuronas del septum se encuentra totalmente inactivada a potenciales de membrana más positivos de -50 mV, al igual que ocurre en hipocampo (Segal y Barker, 1984). En células del área CA1 de hipocampo, a potenciales más positivos de -60 mV se encuentran inactivados el 100% de los canales (Halliwell y col., 1986). En nuestros experimentos el 50% de los canales se encuentran inactivados a un potencial de membrana de -67 mV. Este valor es muy similar al descrito en neuronas de hipocampo (entre -70 y -65 mV, Segal y Barker, 1984), y algo más positivo que el obtenido en células del área CA1 (-75 mV; Halliwell y col., 1986). Una vez inactivada la corriente, la recuperación de la inactivación de la I_t se produce en aproximadamente 300 ms a -110 mV, y en alrededor de un segundo a -80 mV. Estos resultados contrastan con los obtenidos en neuronas de hipocampo, donde tan sólo se necesitan 50 ms a -80 mV para deinactivar el 95% de los canales. En estas células a -90 mV se encuentran deinactivados el 100% de los canales, mientras que en neuronas septales, la deinactivación total se obtiene a un potencial de membrana de -110 mV. En células del área CA1 (Halliwell y col., 1986) el 100% de los canales se deinactivan a -95 mV.

La corriente de potasio con cinética de activación lenta (I_K) se registró en todas las neuronas septales estudiadas. Un porcentaje de esta corriente parece deberse a la actividad de los canales de potasio activados por calcio. Sin embargo, debido a la rapidez con que se produce el lavado de los canales de calcio en esta preparación, este estudio se ha centrado en el análisis de la corriente de potasio I_K dependiente de voltaje e independiente de los niveles de calcio intracelular.

La I_K de neuronas septales se activa a potenciales de membrana alrededor de -30 mV, y alcanza su amplitud máxima en 15-20 ms. Una corriente similar se ha descrito en neuronas de hipocampo de rata (Segal y Barker, 1984) y de cobaya (Sah y col., 1988b). En los experimentos realizados por Segal y Barker (1984), la corriente se activa a un potencial de membrana alrededor de -45 mV y alcanza el valor máximo de amplitud en aproximadamente 200 ms. Por el contrario, en neuronas de hipocampo de cobaya (Sah y col., 1988b) el umbral para la activación de la corriente se encuentra situado a -40 mV, y se alcanza la amplitud máxima en 10 ms. La corriente de potasio I_K se inactiva, sólo parcialmente y en proporción variable, de forma lenta. En nuestra preparación el 100% de los canales se encuentran deinactivados a un V_M de -80 mV, siendo necesaria una despolarización a potenciales más positivos de -60 mV para producir cierto grado de inactivación. A -50 mV tan sólo el 5% de los canales se encuentran inactivados, mientras que a -10 mV este porcentaje es tan

sólo del 25%. Por el contrario, en neuronas de hipocampo de rata (Segal y Barker, 1984) la inactivación se hace apreciable a niveles más positivos de -70 mV, y el 100% de los canales están inactivados a -42 mV.

Por lo tanto, la corriente de potasio con cinética de activación lenta de neuronas septales tiene características muy similares a las de la I_K de otras preparaciones de neuronas del SNC y, cualitativamente, es parecida a la descrita por Hodgkin y Huxley (1952) en axón gigante de calamar, aunque con curso temporal más lento.

4. POSIBLE PARTICIPACION DE LOS DIFERENTES CANALES IONICOS EN LA ELECTROFISIOLOGIA DE NEURONAS SEPTALES.

Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio han mostrado la existencia de varios tipos celulares en la región septal. Cada tipo de célula tiene un patrón electrofisiológico distinto, debido a la diferente dotación y distribución de canales iónicos en su membrana. En el presente trabajo se ha estudiado la región septal completa y se ha observado, desde el punto de vista electrofisiológico, la existencia de una gran variabilidad en la población celular. Todas las células estudiadas tenían una corriente rápida de sodio (I_{Na}), una lenta de potasio (I_K), una de potasio dependiente de calcio ($I_K(Ca)$) y una de calcio de alto umbral ó FD ($I_{Ca}(FD)$). Sin embargo, otras subpoblaciones de canales iónicos variaron de célula a célula.

Como se indicó anteriormente, prácticamente la totalidad de las neuronas septales tienen canales de calcio FD en mayor o menor proporción, en cambio, no todas las células tenían canales de calcio de bajo umbral o SD. Este hecho está en consonancia con los resultados obtenidos con registro intracelular (Alvarez de Toledo y López-Barneo, 1988), donde se observó que sólo las neuronas del septum intermedio generan espigas de calcio de bajo umbral. Estas células cambian de un patrón de disparo tónico a un disparo en brotes cuando se mantienen a un potencial de membrana hiperpolarizado. Este tipo de respuesta se debe a la génesis de espigas lentas de calcio de bajo umbral. Dichas espigas posiblemente reflejan la actividad de canales de calcio SD que se activan a un potencial de membrana alrededor de -40 mV (bajo umbral), y se inactivan de forma rápida al mantener el potencial de membrana despolarizado. Al activarse esta corriente, se produce una onda lenta sobre la cual se generan brotes de potenciales de acción rápidos de sodio y calcio. Los canales FD, que se encuentran en casi todas las neuronas septales disociadas, son casi con seguridad los

responsables de la génesis de las espigas de calcio de alto umbral que se registran en todos los tipos celulares del septum tras bloquear la conductancia al sodio con TTX (López-Barneo y col., 1985; Alvarez de Toledo y López-Barneo, 1988).

Cada tipo de canal de calcio, además de participar de manera distinta en los fenómenos de integración neuronal, puede desempeñar un papel independiente en la fisiología de la célula. Los canales FD, debido a su umbral de activación (20-30 mV más positivo que los SD), pueden estar implicados en la regulación de la frecuencia de disparo. La apertura de estos canales durante un potencial de acción de sodio produce un incremento en los niveles de calcio intracelular que activa los canales de potasio dependientes de Ca^{2+} . Ya que estos canales apenas se inactivan, pueden producir un incremento sustancial en la concentración de Ca^{2+} en el interior de la célula, pudiendo servir como mecanismo de acoplamiento entre fenómenos de membrana y procesos metabólicos. El umbral de activación de los canales SD sugiere su implicación en la determinación de la respuesta de las neuronas en el rango de voltaje cercano al potencial de reposo, ya que a este nivel, la mayor parte de las conductancias dependientes de voltaje están sin activar.

Se ha indicado más arriba que en un porcentaje de las neuronas estudiadas se registró, además de la corriente de potasio con cinética de activación lenta (I_K), la corriente rápida y transitoria de potasio I_t . Esta corriente es posiblemente exclusiva de las células del septum medial y responsable de su patrón de disparo característico (Alvarez de Toledo y López-Barneo, 1988). Estas neuronas producen brotes de potenciales de acción (2-6) de 20-25 ms de duración los cuales progresivamente disminuyen de amplitud y aumentan de duración. Después de estos brotes las células permanecen silentes aunque se mantenga el estímulo. Al final del pulso de estimulación se produce una posthiperpolarización que determina un periodo de excitabilidad inferior a la normal. De esta forma, ante la llegada de nuevos estímulos excitadores las células son incapaces de volver a generar un nuevo potencial de acción hasta que no ha transcurrido un tiempo determinado. La génesis del brote podría deberse a la activación de la I_t , que limitaría la excitabilidad de las células y sería la responsable de la posthiperpolarización.

Aquellas células en las cuales no se han detectado canales I_t e $I_{Ca(SD)}$, probablemente se correspondan con neuronas del septum dorsolateral. Las características más notables de estas neuronas son una transición de un patrón de disparo rápido a otro lento, y la restricción de la frecuencia de disparo. Esta excitabilidad limitada se debe

a la inactivación de la corriente de sodio, activación de una corriente de calcio, y activación de una corriente de potasio activada por calcio. En nuestros experimentos la corriente de sodio se inactiva en 3-4 ms, mientras que la de calcio de alto umbral apenas se inactiva, por lo que se puede producir el disparo repetitivo de potenciales de acción, de mayor duración y menor amplitud, cuyos responsables son los canales de calcio de alto umbral. Una vez que la entrada de calcio produce un incremento en la concentración de calcio en el citoplasma, la activación de la conductancia para el potasio dependiente de calcio restringe la excitabilidad de la célula.

Por tanto, la variabilidad y las características biofísicas de los canales iónicos de las neuronas septales en cultivo explican los distintos patrones de disparo observados en experimentos realizados con registro intracelular en secciones de septum. Estos canales determinan la forma en que cada tipo celular integra la información aferente y además pueden ser las estructuras, a nivel molecular, implicadas en la modulación de su actividad fisiológica.

5. MODULACION DE LAS CORRIENTES IONICAS POR LOS NEUROPEPTIDOS TRH Y LHRH.

Uno de los aspectos de mayor interés de nuestro trabajo ha sido el estudio de los efectos de la aplicación externa de TRH y LHRH sobre las corrientes iónicas dependientes del potencial de membrana de neuronas septales. La TRH (pGlu-His-Pro amida) es una hormona hipotalámica que se encuentra ampliamente distribuida en el SNC de mamíferos. Concretamente en el septum se han identificado gran cantidad de receptores para este neuropéptido (Simasko y Horita, 1984). Además de su efecto en células de la hipófisis (Dubinsky y Oxford, 1985), en algunas preparaciones neuronales la TRH produce modificaciones electrofisiológicas. En neuronas de la raíz dorsal de la médula espinal produce cambios en la excitabilidad (Jackson y White, 1988), y en motoneuronas espinales (Takahashi, 1985) el tripéptido induce un potencial postsináptico excitador. Los efectos de este péptido sobre neuronas centrales son, sin embargo, desconocidos.

Nuestros resultados muestran que la adición de TRH y sus derivados a la solución externa produce, en un porcentaje de las neuronas septales estudiadas, cambios en la amplitud de las corrientes de sodio y potasio sin afectar, al menos aparentemente, a la corriente de calcio. La exposición a TRH produce un aumento en la amplitud de

la corriente de potasio con cinética de activación lenta, mientras que el resto de las corrientes iónicas parecen no afectarse. Este hecho está en consonancia con lo que se observa en una línea celular de pituitaria de rata, donde la hormona produce una disminución en la amplitud de la corriente de potasio I_K y un incremento en la amplitud de la corriente de potasio activada por calcio ($I_K(Ca)$) (Kaczorowski y col., 1983; Dubinsky y Oxford, 1985). El efecto sobre esta última corriente se produjo a través de un aumento de los niveles de calcio intracelular (Dubinsky y Oxford, 1985; Epanó y col., 1989). Por lo tanto, en neuronas septales el aumento de amplitud observado en la corriente de potasio está, posiblemente, mediado por un mecanismo similar. La hormona induciría la liberación de Ca^{2+} de almacenes intracelulares, con el consiguiente incremento de la concentración de calcio en el citoplasma, lo cual produce la activación del componente de corriente de potasio activado por calcio.

Estudios realizados con registro intra y extracelular muestran que la TRH produce cambios en la excitabilidad de células secretoras y neuronales. En células de pituitaria secretoras de prolactina y TSH la aplicación externa de TRH produce cambios en la excitabilidad de las células (Dufy y col., 1988). Este efecto se manifiesta en dos fases; en la primera se produce una hiperpolarización del potencial de membrana de 10-20 mV asociado con una disminución de la resistencia de entrada; posteriormente se produce una onda lenta despolarizante sobre la cual, a veces, se producen varios potenciales de acción de Ca^{2+} . Por otro lado, en el área septo-hipocámpica (Lamour y col., 1989) la TRH produce un aumento de la excitabilidad en unas células y una disminución en otras. La acción de la TRH sobre la corriente de potasio dependiente de calcio en neuronas septales puede producir, por lo tanto, una disminución de la excitabilidad celular.

En gran parte de nuestros experimentos se han estudiado los efectos de la forma ácida de la hormona (pGlu-His-Pro) sobre las corrientes iónicas. La aplicación externa de TRH_a produce, en algunas de las células estudiadas, una disminución en la amplitud de la corriente de sodio, sin afectar, al menos aparentemente, a las corrientes de potasio y calcio (el efecto sobre esta última no se ha estudiado en detalle). El porcentaje de disminución de la corriente de sodio en las distintas células fué muy variable, oscilando entre un 10 y un 50% del valor control en presencia de 2,75 μ M TRH. Durante el tiempo de aplicación de la hormona, tanto la cinética de activación como la de inactivación de la corriente de sodio permanecen inalterables, afectandose tan solo la amplitud de la corriente.

El posible papel fisiológico que puede tener la reducción de la amplitud de la corriente de sodio por la TRH_a es, por el momento, incierto. En el caso de que se produjeran niveles apreciables de TRH_a en el medio extracelular, se produciría una disminución en la excitabilidad de las células, ya que, en el rango de voltaje cercano al umbral de disparo, un bloqueo de los canales de sodio puede provocar un enlentecimiento en la generación de potenciales de acción. En este sentido sería necesaria la realización de experimentos en secciones de encéfalo con registro intracelular para comprobar este efecto.

El hecho de que la aplicación de TRH y TRH_a a la solución externa produzca efecto en tan solo algunas neuronas, demuestra que la acción del tripéptido no es inespecífica, sino que probablemente sea necesaria la existencia de receptores específicos para la hormona localizados en la membrana de estas células. El curso temporal del efecto (comienza a observarse a los 30-50 segundos) induce a pensar en la mediación de un segundo mensajero intracelular, el cual actuaría directa o indirectamente sobre la molécula del canal modificando su probabilidad de apertura. La idea de un bloqueo directo del canal, por parte de la hormona, es poco probable. El que en aquellas neuronas en las que se ha llevado a cabo una segunda exposición a la hormona (TRH_a) se observe un efecto menor, apoya esta misma idea. Igualmente, este hecho puede suponer una desensibilización del mecanismo de transducción, o bien un "lavado" de los componentes intracelulares necesarios para que se produzca el efecto, debido a la diálisis del medio intracelular.

Además de los efectos producidos por la TRH, en el presente trabajo se ha estudiado, aunque con menor detalle, la acción de la LHRH sobre las corrientes iónicas dependientes de voltaje de neuronas septales. La LHRH es un decapeptido relacionado estructuralmente con la TRH, que se ha detectado en gran cantidad en el área septo-hipocámpica (Reubi y col., 1985; Schwanzel-Fukuda y Pfaff, 1989).

Por el momento tan sólo se han analizado los efectos de la aplicación de LHRH en aquellas neuronas en las que previamente se había observado un efecto de la TRH_a sobre la corriente de sodio. En estas células, la exposición a LHRH produjo una disminución de la amplitud de la corriente de sodio de menor proporción que el observado en presencia de TRH. La magnitud del efecto es, sin embargo, similar a la observada en aquellas células en las que se realizó una segunda exposición a TRH. En función de estos resultados, no se puede excluir la posibilidad de que ambas hormonas estén actuando a través de un mismo mecanismo y que, debido a esta circunstancia, el efecto

observado con la adición de LHRH sea siempre menor. La reducción de la amplitud de la corriente de sodio producido por la LHRH puede producir, al igual que se postula para la TRH una disminución en la excitabilidad en aquellas neuronas que posean receptores para la hormona.

En los últimos años ha quedado patente que la actividad de los canales de calcio y potasio de neuronas y otros tipos celulares pueden ser modulados por neurotransmisores y neuropéptidos. En cambio, generalmente se asume que los canales de sodio no son afectados por este tipo de ligandos, sino que son únicamente responsables de la generación y transmisión del potencial de acción. Una idea muy extendida es que los canales de calcio y potasio están directamente implicados en los mecanismos de integración neuronal y de respuestas a cambios en el medio extracelular, mientras que los canales de sodio están especializados en la generación de corrientes rápidas necesarias para la transmisión eléctrica, y son por tanto menos susceptibles de ser modulados. En este trabajo se muestran datos inequívocos de que los péptidos TRH y LHRH producen una disminución reversible de la amplitud de la corriente de sodio en neuronas del septum. Por tanto, esta es la primera vez que se observa modulación de corrientes de sodio por neuropéptidos, lo que, en nuestra opinión, representa una de las aportaciones más novedosas y de mayor interés del presente trabajo.

CONCLUSIONES

1. En este trabajo se ha puesto a punto una preparación de neuronas del SNC de mamíferos adecuada para la realización de un estudio biofísico cuantitativo utilizando la configuración de registro en "célula completa" ("whole-cell") de la técnica de "patch-clamp".
2. Las neuronas septales dispersas son excitables y mantienen funcionales, y aparentemente inalterados, los canales iónicos dependientes del potencial de membrana.
3. En todas las células la despolarización induce la génesis de una corriente de sodio. Esta corriente alcanza la amplitud máxima en 0,4-0,5 ms a 0 mV y se inactiva de forma rápida en pocos milisegundos. La corriente de sodio es la responsable de la génesis de los potenciales de acción rápidos de neuronas septales y es muy parecida a la descrita por Hodgkin y Huxley en el axón gigante de calamar.
4. Las neuronas septales poseen, al menos, dos tipos de corrientes de calcio: una mediada por canales con cinética de deactivación lenta o SD y otra que se debe a la actividad de canales con cinética de deactivación rápida o FD. La contribución relativa a la corriente "total" de cada tipo de canal iónico varía de célula a célula. Es, sin embargo, importante destacar que los canales FD se observan, en mayor o menor medida, en todas las células, mientras que más del 20% de las neuronas no tienen canales SD.
5. Los canales SD, tipo T o de bajo umbral, se activan a un potencial de membrana cercano a -40 mV y se inactivan con pulsos de larga duración. La corriente producida por la actividad de estos canales, aunque en todos los

casos de menor amplitud que la mediada por los canales FD, es posiblemente la que genera las "espigas de calcio de bajo umbral" típica de las neuronas del septum intermedio y responsable del cambio del patrón de disparo tónico al fásico.

6. Los canales FD, tipo L o de alto umbral, se activan a un potencial de membrana alrededor de -20 mV, y apenas se inactivan. La corriente producida por la actividad de estos canales, que como nuestro estudio muestra se puede generar tanto en el soma como en las dendritas, es posiblemente la que produce las "espigas de calcio de alto umbral". Estas espigas de calcio se observan en todas las neuronas septales (y en general en todas las neuronas del SNC de mamíferos) tras bloquear la conductancia a los iones de sodio con TTX.
7. En el conjunto de la población de células estudiadas se han identificado tres tipos distintos de canales de potasio. Dos de estos canales (I_K y $I_{K(Ca)}$) tienen una cinética de activación lenta y sólo se inactivan parcialmente con pulsos de larga duración. El tercer tipo de canal de potasio (I_t) se activa rápidamente y se inactiva en menos de 50 ms.
8. La corriente lenta de potasio (I_K) se ha registrado en todas las células. La activación de esta corriente sigue un curso temporal sigmoideo y alcanza un máximo en unos 15-20 ms. La amplitud de la corriente lenta de potasio activada por calcio ($I_{K(Ca)}$) varía de célula a célula. Esta corriente no se ha estudiado con detalle debido a que la mayoría de los experimentos se realizaron tras el "lavado" de los canales de calcio. Ambas corrientes de potasio determinan la amplitud y duración de la posthiperpolarización que sigue a un tren de potenciales de acción y quizás contribuyan a la fase final de la repolarización de los potenciales de acción.
9. La corriente de potasio rápida y transitoria (I_t), se ha observado solamente en el 27% de las neuronas septales. Esta corriente se activa en 3-4 ms y a -80 mV el 17% de los canales responsables de ella se encuentran inactivados. Los canales que producen la corriente I_t son posiblemente característicos de las neuronas del septum medial y al limitar la excitabilidad de la membrana, quizás sean los mayores responsables del disparo fásico típico de estas células.
10. La configuración "whole-cell" de la técnica de "patch-clamp" aplicada a neuronas septales permite el registro de forma estable de corrientes iónicas durante más de 30 min. Sin embargo, tanto en los canales de sodio como en los canales de calcio del tipo FD se observan modificaciones producidas por la diálisis del medio

intracelular. En el caso de los canales de sodio la alteración más aparente es un desplazamiento de 5-10 mV hacia potenciales más negativos en la relación corriente-voltaje. La corriente debida a la actividad de canales de calcio FD decrece en amplitud a lo largo del tiempo, aunque no se modifican sus características cinéticas. La aparición de ambos fenómenos se retarda por la adición de ATP al medio intracelular.

11. La hormona liberadora de la Tirotropina (TRH) produce, en un porcentaje de células, un aumento reversible en la amplitud de la corriente de potasio con cinética de activación lenta. Este incremento se debe a la activación de la corriente de potasio dependiente de calcio producido a través de un incremento en los niveles de Ca^{2+} intracelular.
12. La forma ácida de la TRH produce, en el 35% de las neuronas estudiadas, una disminución reversible de la amplitud de la corriente de sodio. El porcentaje medio de reducción de la amplitud máxima de la corriente de sodio en presencia de $2,75 \mu M$ TRH es del 22,8 % del valor control. Un efecto similar al de la TRH_a lo produce la adición al medio externo de hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH) a concentraciones micromolares.
13. La observación de los efectos de la TRH y LHRH solamente en un porcentaje de células sugiere que su mecanismo de acción implica la unión de las hormonas a receptores específicos. De hecho, la exposición repetida a TRH_a produce un efecto menor, lo que podría explicarse por "desensibilización" del receptor o de algunos de los procesos que acoplan el receptor a los canales de sodio.
14. La inhibición reversible de la corriente de sodio por TRH y LHRH es una observación sin precedentes en la literatura. Esta bien demostrado que los canales de potasio y calcio pueden ser modulados por neurotransmisores y hormonas, sin embargo se ha asumido tradicionalmente que los canales de sodio dependientes del potencial de membrana son solamente sensibles a cambios en el campo eléctrico y por lo tanto no susceptibles de modulación.

REFERENCIAS

Adams, P.R. y Halliwell, J.V. "A hyperpolarization-induced inward current in hippocampal pyramidal cells". *Journal of Physiology* 324:62-63P, 1982.

Aguayo, L.G. y Weight, F.F. "Characterization of membrane currents in dissociated adult rat pineal cells". *Journal of Physiology* 405:397-419, 1988.

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

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

Barret, J.N. y Crill, W.E. "Voltage clamp of motoneuron somata: Properties of the fast inward current". *Journal of Physiology* 304:231-249, 1980.

Bezanilla, F. y Armstrong, C.M. "Negative conductance caused by entry of sodium and cesium ions into the potassium channels of squid axons". *The Journal of General Physiology* 60:588-608, 1972.

Bezanilla, F. y Armstrong, C.M. "Inactivation of the sodium channel. I. Sodium current experiments". *The Journal of General Physiology* 70:549-566, 1977.

- Brown, D.A. y Griffith, W.H. "Calcium-activated outward current in voltage-clamped hippocampal neurones of the guinea-pig". *Journal of Physiology* 337:287-301, 1983.
- Castellano, A. López-Barneo, J. y Armstrong, C.M. "Potassium currents in dissociated cells of the rat pineal gland". *Pflügers Archiv, European Journal of Physiology* 413:644-650, 1989.
- Cole, K.S. "Membranes, ions and impulses: a chapter of classical biophysics". University of California Press, Berkeley, pp 569, 1968.
- Connors, B.W., Gutnick, M.J. y Prince, D.A. "Electrophysiological properties of neocortical neurons in vitro". *Journal of Neurophysiology* 48:1302-1320, 1982.
- Connors, J.A. y Stevens, C.F. "Voltage clamp studies of a transient outward membrane current in gastropod neural somata". *Journal of Physiology* 213:21-30, 1971.
- Constanti, A. y Brown, D.A. "M-currents in voltage clamped mammalian sympathetic neurons". *Neuroscience Letters* 24:289-294, 1981.
- Constanti, A. y Galvan, M. "Fast inward-rectifying current accounts for anomalous rectification in olfactory cortex neurons". *Journal of Physiology* 385:153-178, 1983.
- Cota, G. "Calcium channel currents in Pars Intermedia cells of the rat pituitary gland". *The Journal of General Physiology* 88:83-105, 1986.
- Dolphin, A.C. y Scott, R.H. "Calcium channel currents and their inhibition by (-)baclofen in rat sensory neurones: modulation by guanine nucleotides". *Journal of Physiology* 386:1-17, 1987.
- Dubinsky, J.M. y Oxford, G.S. "Dual modulation of K channels by thyrotropin-releasing hormone in clonal pituitary cells". *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 82:4282-4286, 1985.
- Dufy, B., Mollard, P., Dufy-Barbe, L., Manciet, G., Guerin, J. y Roger, P. "The electrophysiological effects of thyrotropin-releasing hormone are similar in human TSH- and prolactin-secreting pituitary cells". *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 67:1178-1185, 1988.
- Epand, R.M., Stafford, A.R. y Orlowski, R.C. "Calcitonin inhibits the rise of intracellular calcium induced by thyrotropin-releasing hormone in GH₃ cells". *Cell Calcium* 10:145-149, 1989.

- Fenwick, E.M., Marty, A. y Neher, E. "Sodium and calcium channels in bovine chromaffin cells". *Journal of Physiology* 331, 599-635, 1982.
- Fernández, J.M., Fox, A.P. y Krasne, S. "Membrane patches and whole-cell membranes: a comparison of electrical properties in rat clonal pituitary (GH₃) cells". *Journal of Physiology* 356:565-585, 1984.
- Ffrench-Mullen, J.M.H., Slater, N.T. y Barker, J.L. "Pharmacology of calcium currents in enzymatically dissociated guinea-pig CA1 hippocampal neurons". *Biophysical Journal* 55:309a, 1989.
- Forscher, P. y Oxford, G.S. "Modulation of calcium channels by norepinephrine in internally dialyzed avian sensory neurons". *The Journal of General Physiology* 85:743-763, 1985.
- Fox, A.P., Nowycky, M.C. y Tsien, R.W. "Kinetic and pharmacological properties distinguishing three types of calcium currents in chick sensory neurons". *Journal of Physiology* 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". *Journal of Physiology* 394:173-200, 1987b.
- French, C.R. y Gage, P.W. "A threshold sodium current in pyramidal cells in rat hippocampus". *Neuroscience Letters* 56:289-293, 1985.
- Gray, R.A. y Johnston, D. "Multiple types of calcium channels in acutely exposed neurones from the adult guinea-pig hippocampus". *The Journal of General Physiology* 88:25a, 1986.
- Gray, R. y Johnston, D. "Noradrenaline and β -adrenoceptor agonists increase activity of voltage-dependent calcium channels in hippocampal neurons". *Nature* 327:620-622, 1987.
- Gustafsson, B., Galvan, M., Grafe, P. y Wigstrom, H. "Transient outward current in a mammalian central neurone blocked by 4-aminopyridine". *Nature* 299:252-254, 1982.
- Hagiwara, S., Ozawa, S. y Sand, O. "Voltage clamp analysis of two inward current mechanisms in the egg cell membrane of a starfish". *The Journal of General Physiology* 65:617-644, 1975.
- Halliwel, J.V. "Caesium-loading reveals two distinct Ca-currents in voltage-clamped guinea-pig hippocampal

neurones in vitro". *Journal of Physiology* 341:10P-11P, 1983.

Halliwel, J.V. y Adams, P.R. "Voltage clamp analysis of muscarinic excitation in hippocampal neurons". *Brain Research* 250:71-92, 1982.

Halliwel, J.V., Othman, I.B., Pelchen-Matthews, A. y Dolly, J.O. "Central action of dendrotoxin selective reduction of a transient K-conductance in hippocampus and binding to localized acceptors". *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 83:493-497, 1986.

Hamill, O.P., Bormann, J. y Sakmann, B. "Activation of multiple-conductance state chloride channels in spinal neurones by glicine and GABA". *Nature* 305:805-808, 1983.

Hamill, O.P., Huguenard, J.R. y Prince, D.A. "Selective calcium channel expression in pyramidal and nonpyramidal cells of the rat neocortex". *Biophysical Journal* 51:223a, 1987.

Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakman, B. y Sigworth, F.J. "Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches". *Pflügers Archiv, European Journal of Physiology* 391:85-100, 1981.

Hernández-Cruz A. y Pape, H.C. "Identification of two calcium currents in acutely dissociated neurons from the rat lateral geniculate nucleus". *Journal of Neurophysiology* 61:1270-1283, 1989.

Hille, B. "Ionic channels of excitable membranes". *Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts*, 1984.

Hiriart, M y Matteson, D.R. "Na channels and two types of Ca channels in rat pancreatic B cells identified with the reverse hemolytic plaque assay". *The Journal of General Physiology* 91:617-639, 1988.

Hodgkin, A.L. y Huxley, A.F. "A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve". *Journal of Physiology* 117:500-544, 1952.

Hodgkin, A.L., Huxley, A.F. y Katz, B. "Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of loligo". *Journal of Physiology* 116:424-448.

Huguenard, J. R., Hamill, O.P. y Prince, D.A. "Developmental changes in Na⁺ conductances in rat neocortical neurons: appearance of a slowly inactivating component". *Journal of Neurophysiology* 59:778-795, 1988.

- Hugues, M., Romey, G., Duval, D., Vincent, J.P. y Lazdunski, M. "Apamin as a selective blocker of the Ca-dependent K channel in neuroblastoma cells. Voltage-clamp and biochemical characterization". Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A. 79:1308-1312, 1982.
- Jackson, D.A. y White, S.R. "Thyrotropin releasing hormone (TRH) modifies excitability of spinal cord dorsal horn cells". Neuroscience Letters 92:171-176, 1988.
- Jahnsen, H. y Llinás, R. "Electrophysiological properties of guinea-pig thalamic neurons: an *in vitro* study". Journal of Physiology 349:205-226, 1984.
- Kaczorowski, G.J., Vandlen, R.L., Katz, G.M. y Reuben, J.P. "Regulation of excitation-secretion coupling by thyrotropin-releasing hormone (TRH): evidence for TRH receptor-ion channel coupling in cultured pituitary cells". The Journal of Membrane Biology 71:109-118, 1983.
- Kay, A.R. y Wong, R.K.S. "Calcium current activation kinetics in isolated pyramidal neurones of the CA1 region of the mature guinea-pig hippocampus". Journal of Physiology 392:603-616, 1987.
- Kohlhardt, M., Bauer, M., Krause, H. y Fleckenstein, A. "Differentiation of the transmembrane Na and Ca channels in mammalian cardiac fibres by the use of specific inhibitors". Pflügers Archiv, European Journal of Physiology 335:309-322, 1972.
- Kostyuk, P.G. "Metabolic control of ionic channels in the neuronal membrane". Neuroscience 13:983-989, 1984.
- Lamour, Y. Dutar, P y Jobert, A. "Septo-hippocampal and other medial septum-diagonal band neurones: electrophysiological and pharmacological properties". Brain Research. 309:227-239, 1984.
- Lamour, Y., Senut, M.C., Dutar, P. y Bassant, M.H. "Neuropeptides and septo-hippocampal neurons: electrophysiological effects and distributions of immunoreactivity". Peptides 9:1351-1359, 1989.
- Lancaster, B. y Adams, P.R. "Calcium-dependent current generating the afterhyperpolarization of hippocampal neurons". Journal of Neurophysiology 55:1268-1282, 1986.
- Lebrun, C.J. y Poulain, D.A. "The role of the septum in the control of milk ejection reflex in the rat: effects of lesions and electrical stimulation". Journal of Physiology 339:17-32, 1983.

- Levitan, I.B. "Modulation of ion channels in neurons and other cells". *Annual Review of Neuroscience* 11:119-136, 1988.
- Lipscombe, D. Madison, D.V., Poenie, M. Reuter, H., Tsien, R.Y. y Tsien, R.W. "Spatial distribution of calcium channels and cytosolic calcium transients in growth cones and cell bodies of sympathetic neurons". *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 85:2398-2402, 1988.
- López-Barneo, J., Alvarez de Toledo, G. y Yarom, Y. "Electrophysiological properties of guinea-pig septal neurons *in vitro*". *Brain Research* 347:358-362, 1985.
- López-Barneo, J., López-López, J.R., Ureña, J. y Gonzalez, C. "Chemotransduction in the carotid body: K current modulated by pO_2 in type I chemoreceptor cells". *Science* 241:580-582, 1988.
- López-Barneo, J. y Llinás, R. "Electrophysiology of mammalian tectal neurons *in vitro*. I. Transient ionic conductances". *Journal of Neurophysiology* 60:853-868, 1988.
- Llinás, R. "Comparative electrobiology of mammalian central neurons". En *Brain Slices*, Ed. Dingledine, R. pp 83-94. Plenum Press. Nueva York, 1984.
- Llinás, R. y Jahnsen, H. "Electrophysiology of mammalian thalamic neurones *in vitro*". *Nature* 297:406-408, 1982.
- Llinás, R. y Sugimori, M. "Electrophysiological properties of *in vitro* Purkinje cell somata in mammalian cerebellar slices". *Journal of Physiology* 305:171-195, 1980a.
- Llinás, R. y Sugimori, M. "Electrophysiological properties of *in vitro* Purkinje cell dendrites in mammalian cerebellar slices". *Journal of Physiology* 305:197-213, 1980b.
- Llinás, R. y Yarom, Y. "Properties and distribution of ionic conductances generating electroresponsiveness of mammalian inferior olivary neurons *in vitro*". *Journal of Physiology* 315:569-584, 1981.
- Madison, D.V. , Fox, A.P. y Tsien, R.W. "Adenosine reduces an inactivating component of calcium current in hippocampal CA3 neurons". *Biophysical Journal* 51:30a, 1987.
- Madison, D.V. y Nicoll, R.A. "Noradrenaline blocks accommodation of pyramidal cell discharge in the hippocampus". *Nature* 299:636-638, 1982.

- Madison, D.V. y Nicoll, R.A. "Control of repetitive discharge of rat pyramidal neurones *in vitro*". *Journal of Physiology* 354:319-331, 1984.
- Martell, A.E. y Smith, R.M. "Critical stability constants". *Amino Acids* Vol. 1. Plenum Press, New York, 1974.
- Matteson, D.R. y Armstrong, C.M. "Na and Ca channels in a transformed line of anterior pituitary cells". *The Journal of General Physiology* 83:371-394, 1984.
- Matteson, D.R. y Armstrong, C.M. "Properties of two types of calcium channels in clonal pituitary cells". *The Journal of General Physiology* 87:161-182, 1986.
- Meyers, D.E.R. y Barker, J.L. "Whole-cell patch-clamp analysis of voltage-dependent calcium conductances in cultured embryonic rat hippocampal neurons". *Journal of Neurophysiology* 61:467-477, 1989.
- Miller, C., Moczydlowski, E., Latorre, R. y Philips, M. "Charybdotoxin, a protein inhibitor of single Ca^{2+} -activated K^+ channels from mammalian skeletal muscle". *Nature* 313:316-318, 1985.
- Miller, R.J. "Multiple calcium channels and neuronal function". *Science* 235:46-52, 1987.
- Montoro, R.J., López-Barneo, J. y Jassik-Gerschenfeld, D. "Differential burst firing modes in neurons of the mammalian visual cortex *in vitro*". *Brain Research* 460:168-172, 1988.
- Narahashi, T., Moore, J.W. y Scott, W.R. "Tetrodotoxin blockage of sodium conductance on lobster giant axons". *The Journal of General Physiology* 47:965-974, 1964.
- Neher, E. "Two transient current components during voltage clamp in snail neurons". *The Journal of General Physiology* 61:385-399, 1971.
- Neher, E., Sakmann, B. y Steinbach, J.H. "The extracellular patch-clamp: A method for resolving currents through individual open channels in biological membranes". *Pflügers Archiv, European Journal of Physiology* 375:219-228, 1978.
- Nelson, P.G. y Frank, K. "Anomalous rectification in cat spinal motoneurons and effect of polarizing currents on excitatory postsynaptic potential". *Journal of Neurophysiology* 30:1097-1113, 1967.

- Nowycky, M.C., Fox, A.P. y Tsien, R.W. "Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity". *Nature* 316:440-443, 1985.
- Ramón y Cajal, S. "Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés". Tomo II (reimpreso, 1962). CSIC, Madrid. pags. 783-797, 1911.
- Regan, L.J. "Calcium channels in freshly-dissociated rat cerebellar Purkinje cells". *Society of Neuroscience Abstracts* 13:100 (Abstr.), 1987.
- Reubi, J.C., Palacios, J.M. y Maurer, R. "Specific luteinizing-hormone-releasing hormone receptor binding sites in hippocampus and pituitary: an autoradiographical study". *Neuroscience*. 21:847-856, 1987.
- Rodriguez-Benot, A., Bolaños, P. y López-Barneo, J. "Corrientes de calcio en células glómicas y su dependencia de metabolitos intracelulares". I Congreso Iberoamericano de Biofísica. Sevilla, 1989.
- Rudy, B. "Diversity and ubiquity of K channels". *Neuroscience* 25:729-749, 1988.
- Sah, P., Gibb, A.J. y Gage, P.W. "The sodium current underlying action potentials in guinea pig hippocampal neurons". *The Journal of General Physiology* 91:373-398, 1988a.
- Sah, P., Gibb, A.J. y Gage, P. W. "Potassium current activated by depolarization of dissociated neurons from adult guinea pig hippocampus". *The Journal of General Physiology* 92:263-278, 1988b.
- Schwanzel-Fukuda, M. y Pfaff, D.W. "Origin of luteinizing hormone-releasing hormone neurons". *Nature* 338:161-164, 1989.
- Segal, M. y Barker, J.L. "Rat hippocampal neurons in culture: Potassium conductances". *Journal of Neurophysiology* 51:1409-1433, 1984.
- Segal M. y Barker, J.L. "Rat hippocampal neurons in culture: Ca^{2+} and Ca^{2+} -dependent K^{+} conductances". *Journal of Neurophysiology* 55:751-766, 1986.
- Sigworth, F.J. y Neher, E. "Single Na^{+} channel currents observed in cultured rat muscle cells". *Nature* 287:447-449, 1980.
- Simasko, S.M. y Horita, A. "Localization of thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptors in the septal nucleus of the rat brain". *Brain Research* 296:393-395, 1984.

Stafstrom, C.E., Schwindt, P.C. y Crill, W.E. "Negative slope conductance due to a persistent subthreshold sodium current in cat neocortical neurons *in vitro*". Brain Research 236:221-226, 1982.

Storm, J.F. "A-current and Ca-dependent transient outward current control the initial repetitive firing in hippocampal neurons". Biophysical Journal 49, 369a, 1986.

Stühmer, W., Methfessel, C., Sakmann, B., Noda, M. y Numa, S. "Patch-clamp characterization of sodium channels expressed from rat brain cDNA". European Biophysics Journal 14:131-138, 1987.

Sutor, B. y Zieglgansberger, W. "A low-voltage activated, transient calcium current is responsible for the time-dependent depolarizing inward rectification of rat neocortical neurons *in vitro*". Pflügers Archiv, European Journal of Physiology 410:345-347, 1987.

Swandulla, D. y Armstrong, C. M. "Fast-deactivating calcium channels in chick sensory neurons". The Journal of General Physiology 92:197-218, 1988.

Tabares, L., Ureña, J. y López-Barneo, J. "Properties of calcium and potassium currents of clonal adrenocortical cells". The Journal of General Physiology 93:495-519, 1989.

Takahashi, T. "Thyrotropin-releasing hormone mimics descending slow synaptic potentials in rat spinal motoneurons". Proceedings of the Royal Society of London B 225:391-398, 1985.

Tsien, R.W. Lipscombe, D., Madison, D.V., Bley, K.R. y Fox, A.P. "Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation". Trends in NeuroSciences 11:431-437, 1988.

Ureña, J., López-López, J., Gonzalez, C. y López-Barneo, J. "Ionic currents in dispersed chemoreceptor cells of the mammalian carotid body". The Journal of General Physiology 93:979-999, 1989a.

Ureña, J., Mateos, J.C. y López-Barneo, J. "Low-cost system for automated acquisition, display, and analysis of transmembrane ionic currents". Medical and Biological Engineering and Computing 27:94-98, 1989b.

Wilson, W. y Goldner, M.A. "Voltage-clamping with a single microelectrode". Journal of Neurobiology 4:411-422, 1975.

Yaari, Y., Hamon, B. y Lux, H.D. "Development of two types of calcium channels in cultured mammalian hippocampal neurons". *Science* 235:680-682, 1987.

Zbicz, K.L. y Weight, F.F. "Transient voltage and calcium-dependent outward currents in hippocampal CA3 pyramidal neurons". *Journal of Neurophysiology* 53:1038-1058, 1985.

Zhang, L. y Krnjevic, K. "Apamin depresses selectively the after-hyperpolarization of cat spinal motoneurons". *Neuroscience Letters* 74:58-62, 1987.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

REUNION DE CALIFICACION

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de D. Antonio Gonzalo Castellano Cresco titulada *Canales iónicos de neuronas septales aisladas: Caracterización electrofisiológica y modulación por TRH y LHRH.* acordó otorgarle la calificación de **APTO "Cum Laude"**

Sevilla, 2 de Octubre 1989

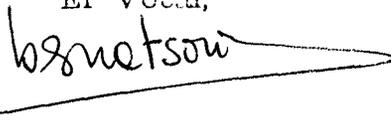
El Vocal,



El Presidente



El Vocal,



El Secretario,



El Vocal,



El Doctorado,

