

VCH-FC
LIC-B
N 378

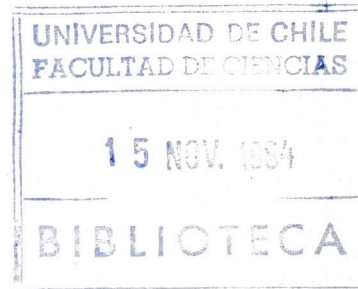
ACTIVIDAD CROMATICA EN LA RETINA EXTERNA DE LA CARPA (*C. carpio*)
REGISTRO DE CELULAS HORIZONTALES *in vivo*

Tesis
Entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al Grado de
Licenciado en Ciencias con mención en Biología
Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas

por

ALAN NEELY DELGUEIL

1984



PROF. GUIA: Orlando Gutiérrez C.

A mi padre y a mis hijos, Rodrigo y Daniel.

AGRADECIMIENTOS

Solo puedo expresar mis mas sinceros agradecimientos a Orlando Gutierrez, mi tutor y guía; a Rodolfo Salinas, con quien compartí penas y glorias de la presente tesis; y en especial a Jorge Arroyo; quien me brindò una ayuda sistemática y su apoyo como amigo en momentos de flaqueza. Tambièn deseo agradecer a todos los miembros de esta Facultad que en alguna forma incidieron en mi formación.

INDICE DE MATERIAS

RESUMEN	vi
SUMMARY	viii
INTRODUCCION	1
Antecedentes	1
Objetivos	10
A Objetivo general	10
B Objetivos específicos	10
MATERIALES Y METODOS	12
Preparación	12
Sistema de registro	15
Sistema de estimulación	18
Adquisición de datos y control en línea	20
DIAGNOSTICO DE LOS DIFERENTES TIPOS CELULARES	23
Antecedentes	23
Secuencia de diagnóstico y actividad fásica	23
Cambios de polaridad y variabilidad en horizontales de tipo-C	29
Conclusiones	32
MECANISMOS ANTAGONICOS Y COLOR OPONENCIA	37
Antecedentes	37
Dominio de actividad de las horizontales cromáticas	39
Comportamiento frente a sumas de colores	45
Mecanismos iónicos	48

Conclusiones	51
ACTIVIDAD MONOFASICA	54
Antecedentes	54
Comportamiento espectral	55
Experimentos de inducción	60
Conclusiones	73
DISCUSION	75
Variabilidad de las células cromáticas	76
Origen de la actividad cromática	77
Acerca del rol funcional de células horizontales de tipo-L	79
Problemas y adaptaciones de la visión subacuática	81
Rango dinámico y detección	82
Comentarios finales.....	85
BIBLIOGRAFIA	88

R E S U M E N

Los potenciales-S corresponden a las respuestas evocadas por estímulos luminosos en las células horizontales, las que junto con los fotorreceptores, constituyen la retina distal de los vertebrados. Los potenciales-S son accesibles solo a microelectrodos intracelulares y lo mismo que los potenciales de los fotorreceptores, tienen el carácter de graduados y sostenidos.

Prácticamente toda la información disponible proviene de registros obtenidos de retinas u ojos aislados de peces, anfibios y reptiles. Limitaciones propias de la preparación, así como la necesidad de intercambiar resultados usualmente no concordantes, provenientes de otras taxas, parecen haberse erigido en barreras que dificultan una ordenación conceptual de esta información. De acuerdo con tal interpretación se ha desarrollado una técnica que permite registros de células horizontales de retinas intactas en peces vivos. Los resultados obtenidos de la carpa común (*C. carpio*) permiten concluir:

- 1.- Las respuestas muestran consistentemente rasgos novedosos, principalmente el despliegue de componentes fásicos, que permite una reclasificación de las células horizontales según criterios funcionales

coherentes.

2.- Las células horizontales de respuesta bifásica o cromáticas parecen corresponder a no más de dos tipos con espectros de acción notablemente variables. Su comportamiento ante ciertas combinaciones espectrales señala que ninguna de sus fases deriva de procesos univariantes.

3.- Las células de respuesta monofásica en cambio presentan espectros de acción más uniformes que revelan aferencias provenientes tanto de conos rojos como verdes, en un esquema no simétrico de relaciones mutuas. El despliegue diferencial de transientes a lo largo del espectro, dependiendo de la intensidad, revela la presencia de factores cromáticos diferentes de los procedentes de receptores, lo que sugiere la participación de células horizontales cromáticas.

4.- Estos resultados permiten proponer un esquema funcional que considera a las células horizontales de actividad monofásica como únicas moduladoras directas de células bipolares, integrando tanto la acción directa de conos como la actividad cromática de células tipo-C en la generación de un entorno trivariante.

5.- Las propiedades exhibidas por las células horizontales, en relación con el rol asignado, aparecen como un claro reflejo de la adaptación a las exigencias del medio visual subacuático de la carpa.

S U M M A R Y

Photoreceptors and horizontal cells are the main components of the distal retina of vertebrates. The intracellularly recorded activity of horizontal cells, generically called S-potentials consist, like that of photoreceptors, of slow and graduated responses.

Most of the presently available information on S-potentials has been obtained from either isolated retinas or isolated optic cups of cold-blooded vertebrates: fishes, amphibians and reptiles. Such circumstances pose serious limitations to the scope and easy interchange of data, a necessary requisite for their conceptual generalization. In order to surpass some of these limitations a technique has been developed permitting to record from horizontal cells of intact retinas of live fish. Results thus obtained from the common carp (C. carpio) lead to the following conclusions:

1.- S-potentials recorded in situ reveal the presence of selectively distributed phasic components, on which new functional criteria for the classification of horizontal cells may be based.

2.- According of this, only two kinds of chromatic horizontal cells can be described, even though the action spectra of their biphasic responses are widely

variable. Their behavior under complex stimulus configurations shows that none of those responses derive from univariant processes.

3.- Monophasic cells are of a single kind. The uniform action spectra of their responses reveal inputs from both red and green cones, in a non symmetrical disposition. The intensity dependent differential display of transients along the spectrum, also reveals the influence of chromatic inputs other than those from receptors, which suggests contributions from biphasic horizontal cells.

4.- From these results a new functional model emerges, according to which monophasic horizontal cells integrate the activity from both cones and chromatic horizontal cells into a single trivariant surround. Their modulation of the cone input to bipolar cells generate the color-opponent receptive fields of the bipolar cells.

5.- The described properties of the horizontal cells of the carp retina are shown to respond adequately to the adaptative pressures of its underwater visual universe.

I N T R O D U C C I O N

Antecedentes

Las células horizontales de la retina de los vertebrados han sido objeto de un intenso e ininterrumpido estudio desde sus primeros registros (Svaetichin, 1953) hasta la actualidad. Con la aplicación iontoforética de tinciones vitales, se ha determinado que la actividad asociada a estas unidades es la de los llamados potenciales-S (Werblin & Dowling, 1969; Kaneko, 1970; Hashimoto et al., 1976). Consisten en un cambio gradual y sostenido del potencial de la membrana, que se mantiene mientras dura el estímulo, variando en amplitud con la intensidad y composición espectral de la luz incidente.

Luego de los resultados de una serie inicial de estudios sobre los potenciales-S en diferentes especies de peces tropicales (Svaetichin & Mac Nichol, 1958), se ha sugerido la participación de estas respuestas en un proceso de codificación cromática en pares oponentes. Esto, en gran parte debido a su coincidencia histórica con los trabajos de Jameson & Hurvich (1955) en humanos, donde por primera vez se llegó a cuantificar en términos psicofísicos, las funciones de pares oponentes. En efecto, las analogías entre los espectros de acción de los diferentes tipos de potenciales-S y las curvas de pares oponentes obtenidas de humanos son notables. Las funciones de Jameson & Hurvich describen una curva

monofásica asociada a un sistema sensible a la luminosidad y dos curvas bifásicas que configuran los pares oponentes R-G (rojo-verde) e Y-B (amarillo-azul). Por su parte, los potenciales-S de luminosidad o de tipo-L son hiperpolarizaciones sostenidas para todo el espectro, variando sólo en amplitud, mientras que los potenciales cromáticos o de tipo-C son bifásicos, con zonas del espectro en que las respuestas son depolarizaciones sostenidas; según la distribución espectral de estas zonas de depolarización, se habla asimismo de células R/G o Y/B.

Tales curvas de respuestas neurofisiológicas no son exclusividad de las células horizontales de peces; también se las ha obtenido de unidades del geniculado lateral en primates (De Valois et al., 1958), de células ganglionares (Gouras, 1968; Marroco, 1972) y de corteza estriada de primates (Michael, 1976). La actividad color oponente aparece pues en los diferentes relevos de la vía retino-cortical, apoyando la idea de una segregación temprana de las respuestas a luminosidad y color en el sistema visual de los vertebrados.

En la carpa, pez de visión descrita como tricromata semejante a la humana (Shefner & Levine, 1976), la situación es algo mas compleja; a las células horizontales L, R/G e Y/B, Tomita (1965) ha agregado un cuarto tipo, RYB o trifásico, que muestra una zona de depolarización en el amarillo, entre regiones de hiperpolarización en el rojo y en el azul. Sin embargo, se ha demostrado que es posible invertir la polaridad

de las respuestas cromáticas, actuando sobre la intensidad del estímulo luminoso (Gutierrez et al., 1981). Una observación similar ha sido descrita en un pez de retina dicrómata (Burkardt & Hassin, 1978). Estos antecedentes no sólo ilustran sobre posibles ambigüedades en la clasificación de unidades cromáticas de la carpa, sino que afectan al concepto de una actividad de luminosidad segregada de la actividad de pares oponentes, puesto que la dependencia del signo de las respuestas con la intensidad del estímulo hacen que, en determinadas condiciones, dos bandas de respuestas espectrales inicialmente opuestas pasen a ser del mismo signo.

La existencia de curvas de respuestas bifásicas o trifásicas, puede explicarse suponiendo acciones antagónicas entre las diferentes poblaciones de conos (Naka & Rushton, 1966a,b), pero la naturaleza de este antagonismo permanece confusa. Stell et al. (1975) han propuesto un esquema explicativo basado en minuciosos estudios morfológicos realizados en el pez dorado, según el cual las interacciones antagónicas son mediadas por las células horizontales, que serían presinápticas a los conos en los procesos laterales dentro de la triada y postsinápticas en los de ubicación central. La estructuración en pares oponentes es explicable por la ordenación de estas interacciones respecto a los espectros de acción de los fotorreceptores. En este modelo, la actividad monofásica de las células tipo-L resulta de la acción exclusiva de conos rojos y sería presináptica a los demás tipos de

fotorreceptores, mientras que en la actividad bifásica de las células de tipo-C, la acción mediadas por conos verdes o azules, según sean R/G o RYB, es inhibida por horizontales de luminosidad, generando respuestas de depolarización para la zona del espectro en que la sensibilidad del cono es baja.

La existencia de realimentación desde células horizontales hacia conos parece bien probada en el caso de la tortuga (Baylor et al., 1971; O'Bryan, 1973), a juzgar por el antagonismo centro-periferia que presentan los campos receptivos de conos. Sin embargo, en la carpa no se ha encontrado, ningún tipo de dependencia de las respuestas de conos con el área de estimulación (Tomita, 1965). Para resolver este conflicto, se ha propuesto la existencia de una realimentación puramente eléctrica capaz de inducir, por razones geométricas, variaciones locales del potencial (Byzov et al., 1977). Por otra parte, en un trabajo reciente (Shaeffer et al., 1982), a pesar de la depurada metodología usada, no se logró encontrar las especializaciones propias de membranas presinápticas en los contactos de horizontales con conos, lo que reafirmaría la naturaleza eléctrica de la realimentación. En el pezagato (*I. Punctatus*) este punto aparece aclarado por el reciente hallazgo, fuera de la tríada, de sinapsis químicas entre conos y horizontales, en las que la horizontal es presináptica, a juzgar por la acumulación de vesículas (Sakai & Naka, 1983). Estas nuevas evidencias están de acuerdo con las mediciones de latencias, que muestran variaciones de más de

20 ms entre respuestas según sea el color del estímulo (Shigematzu et al., 1978), sugiriendo la intervención de sinapsis químicas.

De todas maneras, las interacciones mediadas exclusivamente a través de vías de realimentación resultan ser insuficientes para dar cuenta de la actividad de las células cromáticas (Fuortes & Simon, 1974; Burkhardt & Hassin, 1978). Este problema está aún vigente, aunque ha sido enfrentado con los métodos más diversos: adaptaciones selectivas (Naka & Rushton, 1966a,b), mediciones de funciones de transferencia para estímulos de luz modulada (Spekreijse & Norton, 1970), organización de campos receptivos (Negishi, 1971), estudios de conductancia (Marshall & Werblin, 1978) y análisis con ruido blanco (Wheeler & Naka, 1977), por citar algunos.

El sustrato sináptico en que operan las células horizontales, tanto en sus aspectos morfológicos como farmacológicos, ofrece un panorama aún ambiguo. Se sabe que generalmente en la tríada, las células horizontales forman los elementos laterales mientras una célula bipolar ocupa la posición central (Stell, 1967; Witkovsky & Dowling, 1969), pero también hay casos en que el elemento central es un proceso de horizontal (Stell et al., 1975). En la retina de la carpa, se ha descrito que las células horizontales participan en sinapsis convencionales entre sí (Witkovsky & Dowling, 1969), pero estudios posteriores en Carassius auratus asocian

estas estructuras sinápticas a contactos con células interplexiformes (Dowling & Ehinger, 1978). Por otra parte, la identificación de los neurotransmisores responsables de la actividad cromática parece resistirse al análisis farmacológico con los métodos tradicionales (Hedden & Dowling, 1978; Negishi & Drujan, 1978, 1979a). Se debe mencionar sin embargo la abolición de las depolarizaciones provocadas por luz roja en células horizontales de tipo-C, por aplicación de GABA (Negishi & Drujan, 1979b). Este efecto, aunque no es sistemático, concuerda con la reciente identificación de mecanismos de síntesis, liberación y recaptación de GABA en horizontales aisladas (Lam & Ayoub, 1983).

Si bien el origen de las respuestas de depolarización de células horizontales de tipo-C es motivo de permanente revisión, la cadena de eventos que subyace a las hiperpolarizaciones de los diferentes elementos de la plexiforme externa, parece bien establecida. Los segmentos distales de los fotorreceptores presentan en oscuridad una alta conductancia al sodio que los mantiene depolarizados; en presencia de luz ésta disminuye, como resultado del proceso de degradación del fotorpigmento, produciendo una hiperpolarización (Tomita, 1970) con la probable intervención del Ca^{++} como mensajero interno (Baylor & Fuortes, 1970; Hagins & Yoshikami, 1975). Estos cambios de potencial se propagan hacia los contactos sinápticos con procesos de células horizontales y bipolares. Se ha examinado el comportamiento de estas neuronas de segundo orden

frente a la aplicación de iones bivalentes, concluyéndose que las hiperpolarizaciones resultan del cese de la liberación del neurotransmisor de los fotorreceptores durante la exposición a la luz (Dowling & Ripps, 1973; Cervetto & Piccolino, 1975; Toyoda et al., 1977). Este neurotransmisor, liberado en forma tónica en oscuridad, sería de acción depolarizante, probablemente modulando la conductancia al Na^+ (Waloga & Pack, 1979). Los candidatos más probables son glutamato y aspartato (Cervetto & Mac Nichol, 1972; Wu & Dowling, 1978), aunque referencias recientes se inclinan por el primero (Lasater & Dowling, 1982).

Por otra parte, los estudios de conductancia revelan importantes fenómenos de rectificación en las células horizontales y sugieren una separación funcional entre membranas subsináptica y no sináptica (Trifonov et al., 1974; Werblin, 1975), puesto que sólo la segunda muestra dependencias del voltaje. Estas observaciones han sido confirmadas y ampliadas gracias al desarrollo de técnicas de registros en células horizontales aisladas (Johnston & Lam, 1981; Tachibana, 1981), los que demuestran (a) la existencia de corrientes regenerativas de Ca^{++} , (b) conductancia de K^+ voltaje-dependiente y (c) una escasa participación de Na^+ , sugiriendo que este último adquiere importancia sólo en la membrana subsináptica.

Por último, es preciso mencionar la existencia de acoplamientos eléctricos entre horizontales de un mismo tipo

(Kaneko, 1971; Raviola & Gigula, 1975), mediando una integración lineal sobre extensas áreas de la retina (Naka & Rushton, 1967; Marmarelis & Naka, 1973; Naka, 1982). Estos acoplamientos parecen ser dependiente de Na^+ (Miller, 1978) y son modulado por dopamina (Teranishi et al., 1983), con la intervención de neuronas interplexiformes. Para completar este cuadro, se debe agregar que las células horizontales ejercen una acción inhibitoria sobre las bipolares (Werblin, 1977).

Esta breve, aunque densa revisión, resume los resultados de treinta años de actividad mantenida en torno a las células horizontales de la retina de vertebrados. Tres factores estrechamente ligados entre sí, persistentemente presentes desde el comienzo de estos trabajos, han contribuido a configurar un estilo experimental en un ambiente conceptual muy propio de este tema. Tales factores, que han permitido aportes novedosos incluso a la neurobiología general, aparecen paradójicamente como un obstáculo para el desarrollo de las investigaciones tendientes a clarificar la naturaleza y el alcance de la participación de las células horizontales en la función visual.

Estos factores son:

- 1.- El uso generalizado de preparaciones in vitro como material experimental, sean éstas retina, copa o incluso células aisladas, a pesar de las frecuentes alusiones implícitas o explícitas a alteraciones en las respuestas, derivadas del deterioro fisiológico (Kaneko,

1970; Ruddock & Svaetichin, 1974; Bukhardt & Hassin, 1978). Preciso es reconocer que estos tejidos, ya en el momento de ser separados del animal, han empezado a morir. Esto es particularmente serio en experimentos farmacológicos, que exigen una mayor estabilidad metabólica de la preparación. La persistencia de esta metodología está ligada a dificultades técnicas difíciles de soslayar.

2.- Por las mismas circunstancias señaladas, la abrumadora mayoría de los trabajos se refiere a heterotermos: peces, anfibios y reptiles. Pese a esta preferencia, fijada por consideraciones técnicas, los esquemas conceptuales contienen referencias a elementos propio de la fisiología visual de primates, lo que oscurece una interpretación funcional. Los recientes avances en ecología visual de peces (Loew & Lithgoe, 1978), no parecen incidir aún en una mejor interpretación de los resultados provenientes de esta taxa.

3.-Aunque un objetivo común sea llegar a configurar modelos con el carácter de generales, no siempre se considera que los resultados han sido obtenidos de especies particulares, adaptadas a ambientes igualmente particulares. Es frecuente seleccionar especies con rasgos sobresalientes porque implican ciertas ventajas técnicas, olvidándose que tales ventajas resultan de adaptaciones divergentes. En las referencias a resultados obtenidos de otras especies es común desconocer la filogenia y las

condiciones de habitat y conducta, las que indudablemente influyen en especializaciones adaptativas, muchas veces divergentes, que son fuente de importantes confusiones.

Objetivos

Los objetivos de la presente tesis se formulan como sigue:

A Objetivo general:

Contribuir al conocimiento de la fisiología de la retina de los vertebrados con el estudio de la actividad de células horizontales de la carpa (*C. carpio*), haciendo uso de las ventajas únicas que ofrece la preparación de retina in situ desarrollada en el laboratorio, la que ha revelado sistemáticas divergencias con respecto a resultados anteriormente descritos.

B Objetivos específicos:

1.- Establecer criterios que permitan una clasificación funcional de las células horizontales, basados en propiedades de las respuestas obtenidas de retinas in situ.

2.- Estudiar la actividad cromática de células horizontales de tipo-C, utilizando estimulación isotrópica con combinaciones de luces espectrales en diferentes configuraciones temporales, con miras a establecer la naturaleza de las aferencias que la generan.

3.- Caracterizar con las mismas herramientas experimentales, la actividad monofásica, con el propósito fundamental de precisar la situación de las células horizontales de tipo-L en el complejo contexto anatómico y funcional que se les atribuye.

4.- Incorporar los resultados a una proposición funcional que considere la revisión crítica del concepto de codificación cromática en pares oponentes a nivel de la retina externa.

MATERIALES Y METODOS

Preparación

Los experimentos fueron realizados en ejemplares de carpa común, Cyprinus carpio y Carassius auratus indistintamente, pues existe un alto grado de hibridización entre ambas especies (Scott & Grossman, 1973). A lo largo de toda la serie experimental se llevó, sin embargo, una relación de la especie, discriminando entre ambas por la presencia de barbas en el mandíbula superior, que es una característica de Cyprinus carpio. Los resultados no presentan ninguna diferencia ente ambas especies. Estos peces cohabitan frecuentemente y proliferan con facilidad en aguas continentales, desplazando a otras especies menos resistentes a la anoxia que acompaña al proceso de eutrofización.

Los ejemplares fueron capturados en una primera etapa en el estero de Lampa (Región metropolitana) y posteriormente en la Laguna de Aculeo (VI Región). Se les mantuvo en una pileta al aire libre por periodos de varios meses, trasladándolos al interior del laboratorio por lo menos 24 horas antes del experimento.

Los peces fueron inmovilizados con una inyección intramuscular de D-Tubocurarina en dosis inicial de 3.5 mg/kg de peso, completada con otra media dosis a los 20 minutos, en caso de no obtenerse una buena paralización. Posteriormente y sólo en contadas ocasiones se llegó a repetir aplicaciones de

un tercio de la dosis. En general, una vez alcanzada la paralización del animal, ésta se mantenía durante todo el experimento, si bien persistían en algún grado movimientos operculares.

Un mejor control de los movimientos operculares se logró con el sistema de sujeción (fig.1) donde el pez iba dispuesto en decúbito lateral. Este consistía en una caja con un cepo cerrado sobre el cuerpo del pez, inmediatamente detrás de las branquias, aislando el cráneo de los movimientos del resto cuerpo. Un tubo introducido en la cavidad bucal, sirvió de apoyo al globo ocular en registro. El opérculo expuesto, se inmovilizaba tensando una cinta transversal autoadhesiva pegada a cada lado de la caja. En ésta, el pez se apoyaba sobre esponjas embebidas de agua, las que también lo cubrían para evitar el resecamiento, cuidando de que no hubiera flotación del animal.

La respiración era mantenida por un flujo forzado de agua a través del tubo de sujeción y una manguera adicional que entraba en el opérculo expuesto para asegurar las condiciones fisiológicas de ambas branquias. El agua se recirculaba con una bomba autocebante y era burbujeada con la mezcla de O₂ (95%) / CO₂ (5%).

Para permitir el acceso del microelectrodo hasta la retina in situ, se extraía la cornea y el cristalino, cuidando de no dañar el iris para evitar el sangramiento. En cuanto al vitreo, sólo se limpiaba la superficie, para eliminar una

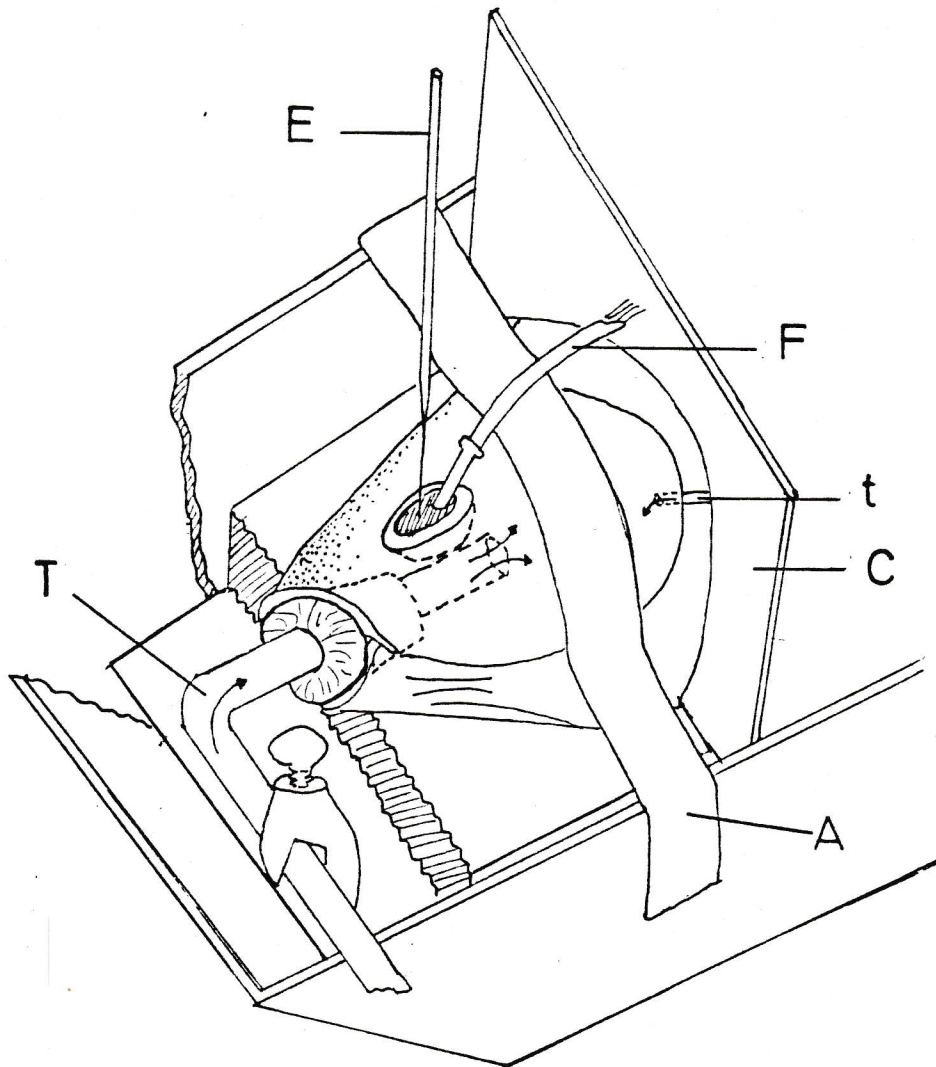


Fig. 1: Sistema de sujeción del pez. A Cinta autoadhesiva transversal para disminuir movimientos operculares. C Cepo de sujeción. E Microelectrodo. F Fibra óptica. T Tubo de respiración que también sirve de soporte al globo ocular. t Tubo adicional para irrigación de la branquia expuesta.

película rígida, formada por resecamiento, que solía producir la ruptura de la punta del microcapilar. Esta operación se repetía con cada cambio de microelectrodo. La fibra óptica de fotoestimulación, solidaria con el electrodo de referencia, era sumergida en el vitreo. El microelectrodo se montaba sobre un micromanipulador hidráulico de control remoto (Narishige Sci. Inst. Lab., MD-10) asociado a su vez con otro mecánico (Narishige Sci. Inst. Lab., MM-3).

En estas condiciones, las sesiones experimentales se pudieron prolongar por más de ocho horas sin deterioro de la retina ni del pez, lo que constituye un gran avance respecto de los tiempos logrados con las preparaciones in vitro.

Sistema de registro

Los registros intracelulares fueron obtenidos a través de microelectrodos contruidos a partir de capilares de vidrio (1.3 mm D.E., 0.5 mm D.I., WP. Instr. U.S.A.), con un estimador de pipetas horizontal de dos etapas (T.S.A. Inc. N.Y., M1 modificado); en esta forma se lograban sistemáticamente puntas de tamaño inferior al límite de resolución del microscopio óptico ($<1\mu$ m). Estas micropipetas llevaban una fibra de vidrio en su interior para permitir su llenado por capilaridad, éste se desarrollaba en tres etapas: primero se sumergían en alcohol de 95% hasta llenar el capilar; luego, por difusión, se remplazaba el contenido de éste por agua destilada y

finalmente por KCL 2 Molar. De esta forma se obtuvieron impedancias de 50 a 300 Mohms y respuestas de frecuencia sin atenuación hasta 100 hz.

Para la referencia intravitral, así como para el contacto con la micropipeta se utilizaron electrodos de plata clorurados en HCl al 10% con una corriente de 30 μ A por 15 a 18 hrs. Ambos electrodos fueron conectados a un preamplificador DC de alta impedancia con compensación de capacidad (Grass P-16), a través de cables coaxiales con blindaje activo para reducir los efectos capacitivos. La preparación era llevada a tierra a través de un electrodo de nicrom incluido en el cepo de sujeción.

La señal preamplificada era registrada en un polígrafo (Gilson Med.Elec., ICH-8) a través de uno de sus módulos IC-MP, cuya salida estaba conectada a un osciloscopio monitor (Tektronix, 502-A) y a un sistema de adquisición de datos diseñado en el laboratorio. En un canal paralelo se desplegaba las señales de los estímulos, en una escala logarítmica de intensidad (fig.2).

Con esta preparación no era posible controlar en forma visual la penetración del microelectrodo más allá del vitreo, por lo que el contacto con la retina era detectado por la aparición de una espiga de origen mecánico y un cambio del potencial basal de 3 a 5 mV. Dentro del tejido retiniano, se avanzaba con la ayuda de un martinete electromecánico (Gutiérrez & Salinas, 1984), cuya activación era acompañada

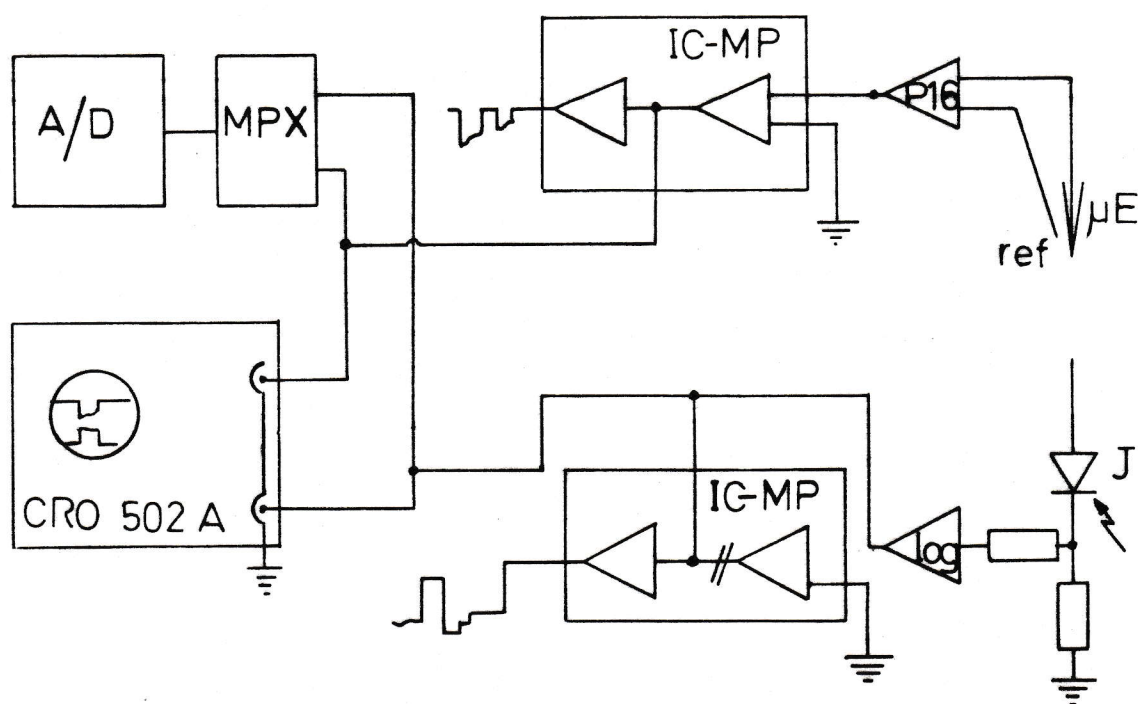


Fig. 2: Sistema de registro. A/D Conversor análogo digital. MPX Multiplexor para entrada de dos canales. IC-MP Módulos de polígrafo en los que se muestra un primer paso de preamplificación para la entrada del canal de registro desde P16 y que no es utilizado por el de estimulación desde el amplificador logarítmico (LOG). J Fotodiodo calibrado. E Microelectrodo. ref Electrodo de referencia intravital.

por saltos bruscos de potencial, a los que ocasionalmente seguía el registro de actividad espicular propia de células ganglionares. Entre 100 y 300 micrones de profundidad, regularmente se penetraba alguna unidad de actividad sostenida con las características típicas de los potenciales-S.

Sistema de estimulación

Se construyó un fotoestimulador de dos canales con fuentes independientes, cuyas salidas convergen sobre un haz incoherente de fibras ópticas para llevar el estímulo hasta el ojo, consiguiéndose una estimulación de luz difusa de la retina (fig.3). Ambos canales permitían intercalar filtros de interferencias de diferentes longitudes de onda, con un ancho de banda de 8 a 12 nm (Balzer o Edmund Scientific Company). La intensidad del estímulo era controlada variando la corriente de cada fuente (Tungsteno-Halógena 50 W), de acuerdo con las respuestas de un fotodiodo calibrado, desplegadas en el polígrafo en escala logarítmica (1.0 ul/cm). El rango que permitía abarcar este sistema, para la longitud de onda de mayor radiancia (620 nm), iba desde 3.1×10^3 fotones. $\mu\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ hasta 1.5×10^6 fotones. $\mu\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, lo que coincide con las energías utilizadas por otros autores en el estudio de los potenciales-S (Tomita et al., 1967; Spekrijse & Norton, 1970; Hedden & Dowling, 1978). Para las longitudes de ondas mayores que 540 nm, la potencia del fotoestimulador permitía evocar respuestas saturadas, en cambio en el azul (480 nm), las

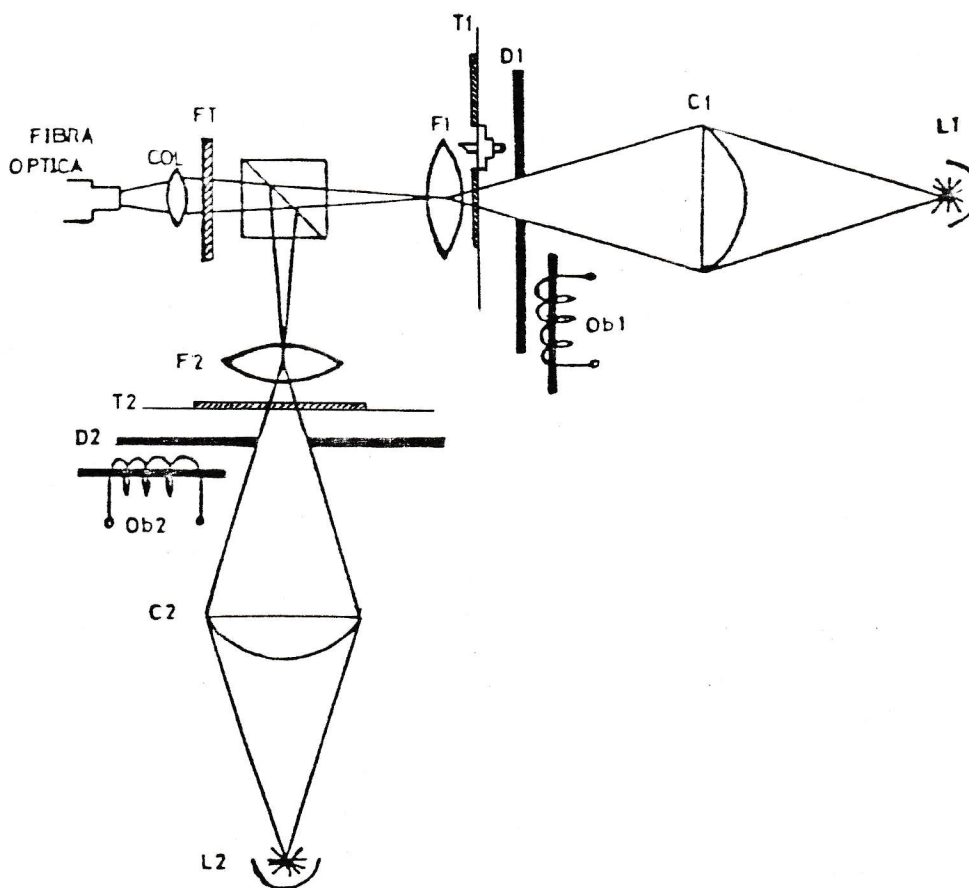


Fig. 3: Dispositivo óptico del fotoestimulador. C Lentes condensadores. D Diafragmas. F Colimadores. FT Filtro de calor. COL Objetiva. L Ampolletas de tungsteno halogenas como fuente. T Filtros de interferencia; para el canal 1, un juego de 10 filtros va montado sobre una rueda que gira por control manual.

características de la fuente sólo permitían llegar hasta 1.5×10^5 fotones $\mu\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, insuficientes para obtener respuestas máximas en células de tipo-L. Las respuestas del fotodiodo fueron referidas a una termopila (The Eppley Lab. Inc. U.S.A.) calibrada con una fuente de referencia.

El paso de luz de cada canal era controlado con obturadores electromecánicos, cuyos tiempos de respuestas eran de 22 ms para la apertura y 18 ms para el cierre. Cada patrón de estimulación era generado por un secuenciador que entregaba un serie recurrente de ocho estados. La duración de cada uno de estos estados era definida en pasos discretos por contadores digitales, entre 30 ms y 1600 ms. Tanto la secuencia como las corrientes de ambas fuentes podían ser controlados en forma manual o desde el computador.

Adquisición de datos y control en línea

Bien saben los investigadores que trabajan con registros unitarios en el sistema nervioso, lo difícil que resulta estimar a priori el tipo de actividad que se va a obtener, además de los problemas de estabilidad que reducen la duración de los registros. Por otra parte, las dificultades propias del método, obligan a estar preparados para rescatar cualquier registro estable, sobre todo si se trata de unidades poco estudiadas por su escasez o tamaño. En gran medida, estos imponderables son cubiertos por la versatilidad del sistema de

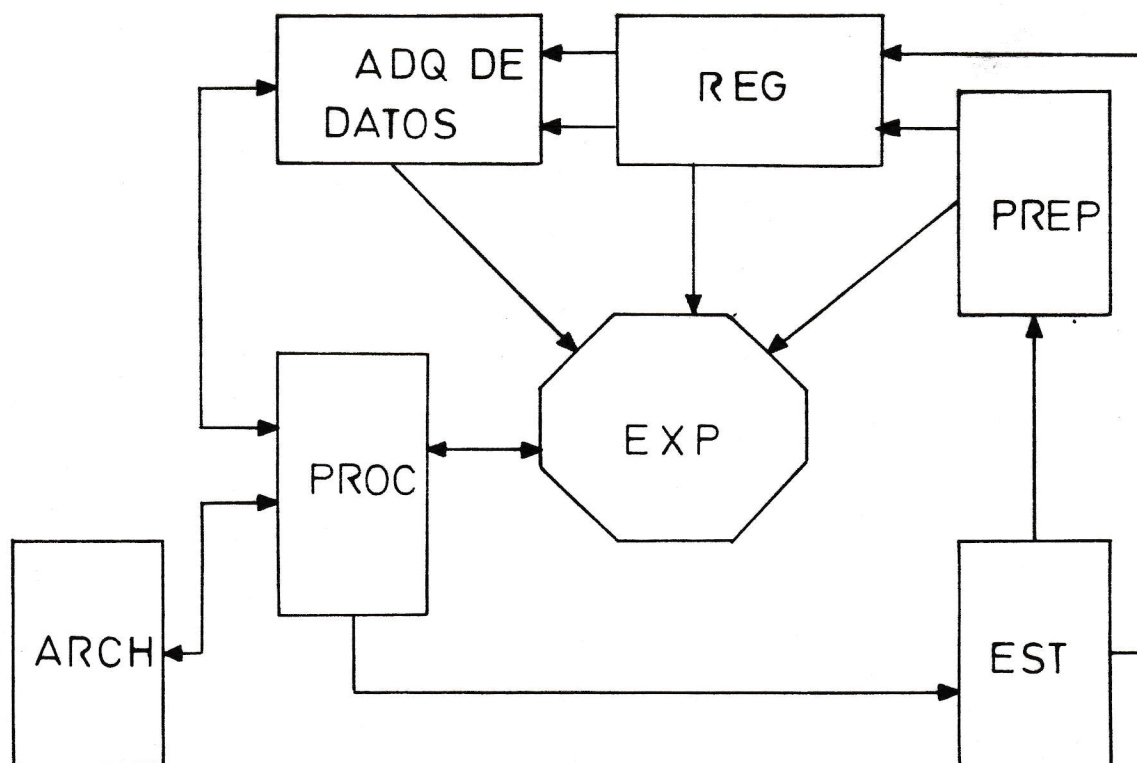


Fig. 4: Diagrama operacional del sistema para control en línea del experimento. EST Estimulador. PREP Preparación biológica. REG Sistema de registro. ADQ DE DATOS Corresponde a los conversores y subrutinas de muestreo. PROC Unidad de procesamiento con su programa principal. ARCH Sistema de archivo en disco y EXP experimentador.

estimulación y su agilidad de control; para obtener la mayor información posible de los registros, en su mayoría breves fue desarrollado además, un sistema de control en línea del experimento.

El sistema completo se descompone en siete unidades operacionales (fig.4), de las cuales tres ya han sido descritas (preparación, registro y estimulación). La cuarta es el sistema de adquisición de datos, que considera los conversores digitales/análogos, análogos/digitales y las subrutinas de muestreo. La unidad central es el computador, con el programa principal que controla el flujo de información desde y hacia las otras, incluyendo la unidad de almacenamiento en discos magnéticos. El experimentador, a partir de los diferentes despliegues, puede modificar en cualquier momento el curso del programa principal o incluir la lectura de parámetros adicionales, en una interacción con restricciones jerarquizadas por el computador, protegiendo la coherencia interna de los archivos.

Esta configuración permite cambiar las secuencias de estimulación de acuerdo con el tipo de actividad que se está registrando, abortar respuestas defectuosas o parar una serie cuando se pierde una penetración o hay ruptura del microelectrodo; todo esto, sin alterar el archivo.

DIAGNOSTICO DE LOS DIFERENTES TIPOS CELULARES

Antecedentes

Las células horizontales se subdividen en dos clases, a saber: las de tipo-L o de luminosidad, en las que sólo se registra hiperpolarizaciones y las de tipo-C o cromáticas, que presentan depolarizaciones frente a ciertas composiciones espectrales del estímulo. Variando las condiciones de adaptación a la luz, es posible discriminar entre los potenciales de luminosidad un subtipo escotópico asociado a la actividad de bastones (Kaneko & Yamada 1972). Las horizontales de tipo-L fotópicas, también se podrían subdividir, en algunas especies de teleosteos, de acuerdo con sus curvas de respuestas espectrales (Laufer et al., 1971; Ruddock & Svaetichin, 1974; Djamgoz et al., 1981). Para una especie de tortuga (Simon, 1973) y una de salamandra (Marshall & Werblin, 1978) se separan en LI y LII de acuerdo con los tamaños de sus campos receptivos. En el caso específico de Carasius auratus y de Cyprinus carpio se ha descrito un único tipo de potenciales L fotópicos, además de los escotópicos que sólo se obtienen con condiciones extremas de adaptación a la oscuridad (Witkowsky, 1967).

Las células cromáticas también son clasificadas en varios subtipos, de acuerdo con la distribución de hiperpolarizaciones y depolarizaciones que presentan a lo largo del espectro, existiendo una gran variabilidad interespecífica

(Svaetichin & Mac Nichol, 1958). En la carpa, desde su primera caracterización (Tomita, 1965), se reconocen dos tipos: bifásicas o R/G y trifásicas o RYB, aunque también se menciona la existencia de un tercero (G/B), semejante a RYB en la región verde azul pero que, a diferencia de éste, no mostraría hiperpolarizaciones en el extremo rojo (Shigematzu et al., 1978).

Las particulares ventajas de una preparación viva en la preservación de las interacciones sinápticas, nos ha llevado a considerar con mayor detención componentes fásicos no obtenidos in vitro. Estos, además de constituir antecedentes adicionales de diagnóstico, tendrían su propia relevancia fisiológica, ya que en los potenciales-S, por ser respuestas sostenidas, no regenerativas, los componentes menores pueden interpretarse como una manifestación de la existencia de interacciones con diferentes retardos. Así, la presencia de transientes con dependencia espectral marcada indican la participación de tal o cual pigmento a través de una conectividad específica, lo que constituiría una mejor base para una clasificación que tenga relevancia funcional.

Secuencia de diagnóstico y actividad fásica

Considerando inicialmente la descripción de Tomita (1965), donde las R/G serían las que depolarizan desde el rojo cercano (600 a 620 nm) hasta el extremo visible (740 nm),

y las RYB las que lo hacen desde los 550 nm hasta los 650 nm, con hiperpolarizaciones en el rojo lejano, se ha establecido una secuencia de estimulación que consiste en dos estímulos monocromáticos de 621 nm y 550 nm y un tercero formado por la suma de éstos, con el fin de identificar los diferentes tipos de potenciales-S. La posible confusión con otras unidades retinianas de repuestas sostenidas se resuelve a partir de índices adicionales como los de profundidad, establecidos en una serie experimental previa de electrorretinografía local, y teniendo en cuenta que la penetración de fotorreceptores o bipolares es altamente improbable por su disposición radial, paralela al eje de desplazamiento del microelectrodo. Las amacrinas de respuesta sostenida, registradas en carpa (Kaneko & Hashimoto, 1969) y descritas como tal posteriormente en peje gato (Chan & Naka, 1976), presentan actividad oscilatoria al inicio o al cese, la que no aparece en nuestros registros.

En la figura 5a aparecen los registros de penetración y actividad de los tres tipos de células horizontales. En ella se observa que las respuestas evocadas con luz roja son de depolarización para ambos tipos cromáticos y de hiperpolarización para L. Frente al estímulo verde, tanto la de luminosidad como la de tipo-R/G muestran una hiperpolarización sostenida, mientras que en el registro de la unidad RYB se observa actividad sólo transiente. Este comportamiento para los diferentes tipos de respuestas, está de acuerdo con las

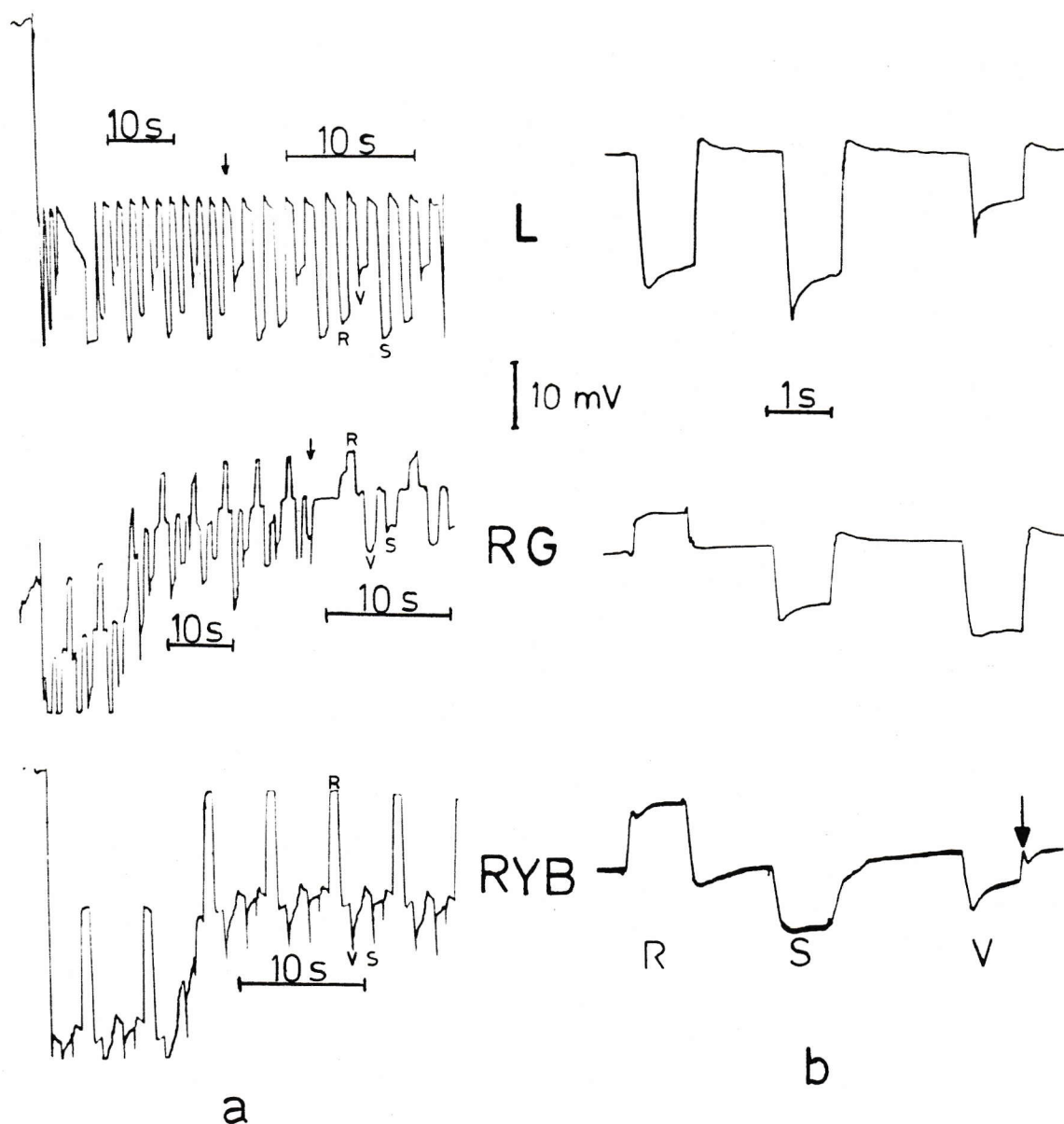


Fig. 5: a Penetración y respuestas de los tres de tipos de potenciales-S frente a una secuencia de 3 estímulos de 1 seg de duración, R (621 nm), V (550 nm) y S que corresponde a la suma de los anteriores. Las barras horizontales indican las diferentes calibraciones de tiempo y las flechas el cambio de velocidad de despliegue dentro del registro.

b corresponde a registros de respuestas de un mismo animal frente a condiciones de estimulación similares que en a, con un despliegue a mayor velocidad (cal de 1s). La flecha indica un componente fásico destacado en el texto.

observaciones de Tomita, para potenciales-S registrados en retina aislada de carpa. En la figura 5b se muestran registros de los tres tipos de unidades, obtenidas de una misma retina in situ. En estos despliegues, a mayor velocidad, se mantiene la consistencia tanto para la de tipo-L como para la de tipo-R/G, mientras que la RYB presenta un comportamiento divergente respecto a su homóloga desplegada a menor velocidad que presenta transientes de hiperpolarización tanto al inicio como al cese del estímulo de suma (fig.5a). Esta clasificación responde a la presencia de un componente fásico adicional, al cese de la hiperpolarización al verde en la unidad RYB de la figura 5b (flecha).

Las células de tipo-L, frente a un estímulo verde, responden con un pico inicial de hiperpolarización, mientras que con 621 nm este componente, cuando aparece, está muy atenuado y, en el rojo más extremo (680 nm), toda actividad transiente desaparece, observándose sólo una hiperpolarización lenta y gradual que aún al cese no llega a su nivel máximo (fig.6b). En las células R/G, en cambio, las respuestas al verde son las más pobres en actividad fásica (fig.6a). En el rojo, esta unidad cromática, para intensidades bajas muestra una respuesta de depolarización. Pero con estímulos más intensos se obtiene una hiperpolarización, lo que es propio de células de tipo-L, aunque presenta un importante transiente de inicio y otro de depolarización al cese que la distingue (fig.6a, flechas). Así, aunque su fase sostenida sea del mismo

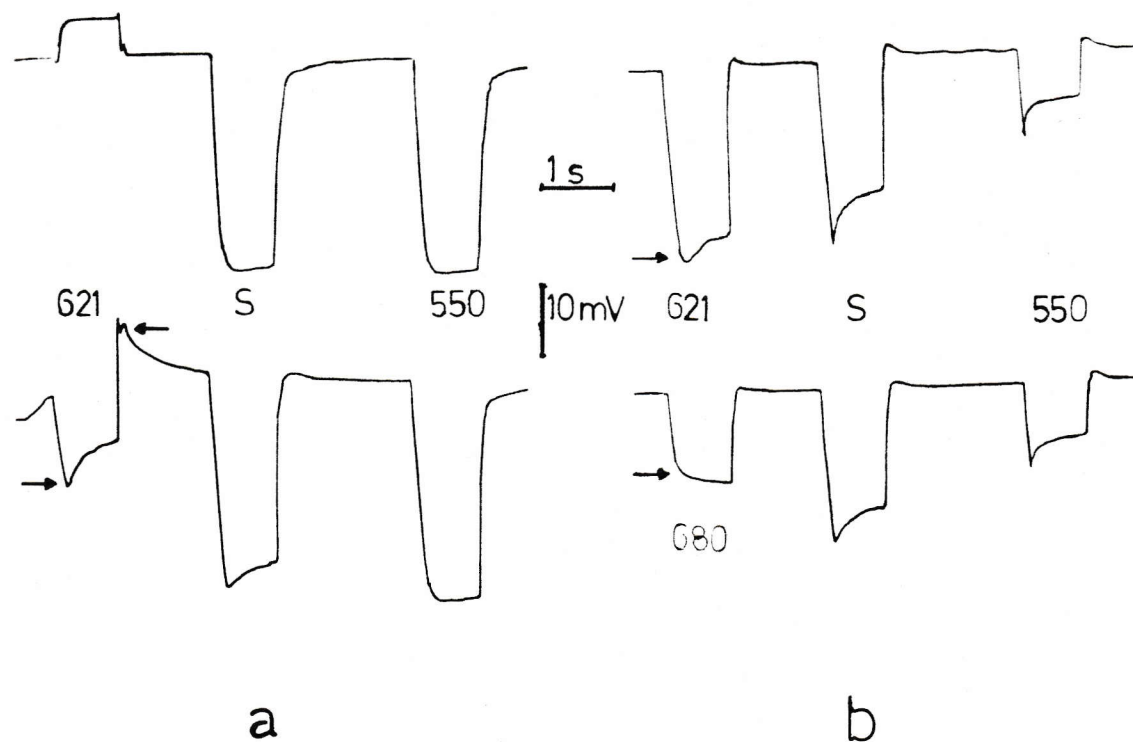


Fig. 6: a La misma unidad R/G de la figura 5b frente a dos intensidades de rojo (621 nm) muestra un cambio de polaridad en que la hiperpolarización presenta transiente de inicio y cese (flechas)

b La célula tipo-L de la figura 5b frente a un cambio de la longitud de onda del estímulo rojo, de 621 nm a 680 nm. Desaparece el transiente de hiperpolarización al inicio (flechas), también está atenuado en la respuesta a la suma con verde (550 nm).

signo que para una L, su desarrollo temporal permite clasificarla aparte.

Cambios de polaridad y variabilidad en horizontales de tipo-C

Desde los primeros registros, se pudo observar un cambio en la polaridad de las respuestas cromáticas, con el aumento de la intensidad del estímulo (Gutierrez et al., 1981). En la literatura clásica, que incluye estudios cuantitativos rigurosos de unidades cromáticas, tanto en el dominio espectral como en el eje de las intensidades (Naka & Rushton, 1966a,b), no aparece mención alguna a este hecho. Sólo una referencia (Burkhardt & Hassin, 1978), relativamente moderna en relación con nuestras primeras observaciones, describe una dependencia en la polaridad de respuestas cromáticas con la intensidad. Este fenómeno fue descrito en *Stizostedion vitreum* y *Stizostedion canadense*, dos especies de perca que poseen sólo dos poblaciones de conos y un único tipo de unidades cromáticas. Posteriormente, los mismos autores (Burkhardt & Hassin, 1983) demuestran una gran dispersión de los espectros de acción de células identificadas como R/G que podría ser explicada por la dispersión en los pesos relativos con que actuarían ambas poblaciones de conos, incluso dando cuenta, para algunos casos extremos, de curvas espectrales trifásicas en retinas dicrómatas.

Estas observaciones vienen a reafirmar la necesidad de considerar elementos adicionales de diagnóstico en la caracterización de los diferentes tipos de unidades. Las

curvas de respuestas obtenidas con un único valor de intensidad, pueden llevar a una clasificación artificiosa, en que unidades funcionalmente homólogas son referidas a tipos diferentes.

En la figura 7 se presenta un claro ejemplo de estas posible confusiones. En ella se muestran registros de respuestas cromáticas frente a estímulos monocromáticos (621nm) de intensidad creciente, las que fueron obtenidas de diferentes experimentos donde, si bien los valores absolutos de energía no son exactamente los mismos, los rangos de variación se han mantenido idénticos. Estos cuatro registros difieren tanto en el signo como en la pendiente de la relación intensidad respuesta, al mismo tiempo que presentan cursos temporales desiguales. El primero (fig.7a) muestra para los estímulos de menor intensidad, sólo respuestas transientes y luego, un marcado aumento en la amplitud de respuestas depolarizantes, con un prominente transiente del mismo signo al inicio. En (b), ya con los primeros estímulos se despliegan respuestas cercanas a la saturación, carentes de todo transiente, y a intensidades mayores, se inserta una inflexión en la fase de ascendente (flechas). Los dos registros inferiores (fig.7c,d) presentan sólo actividad transiente para los primeros estímulos y posteriormente muestran respuestas sostenidas de hiperpolarización, pero en (c) se puede distinguir la presencia de componentes menores al inicio de cada hiperpolarización (flechas), lo que permitiría diferenciarlo de (d) y

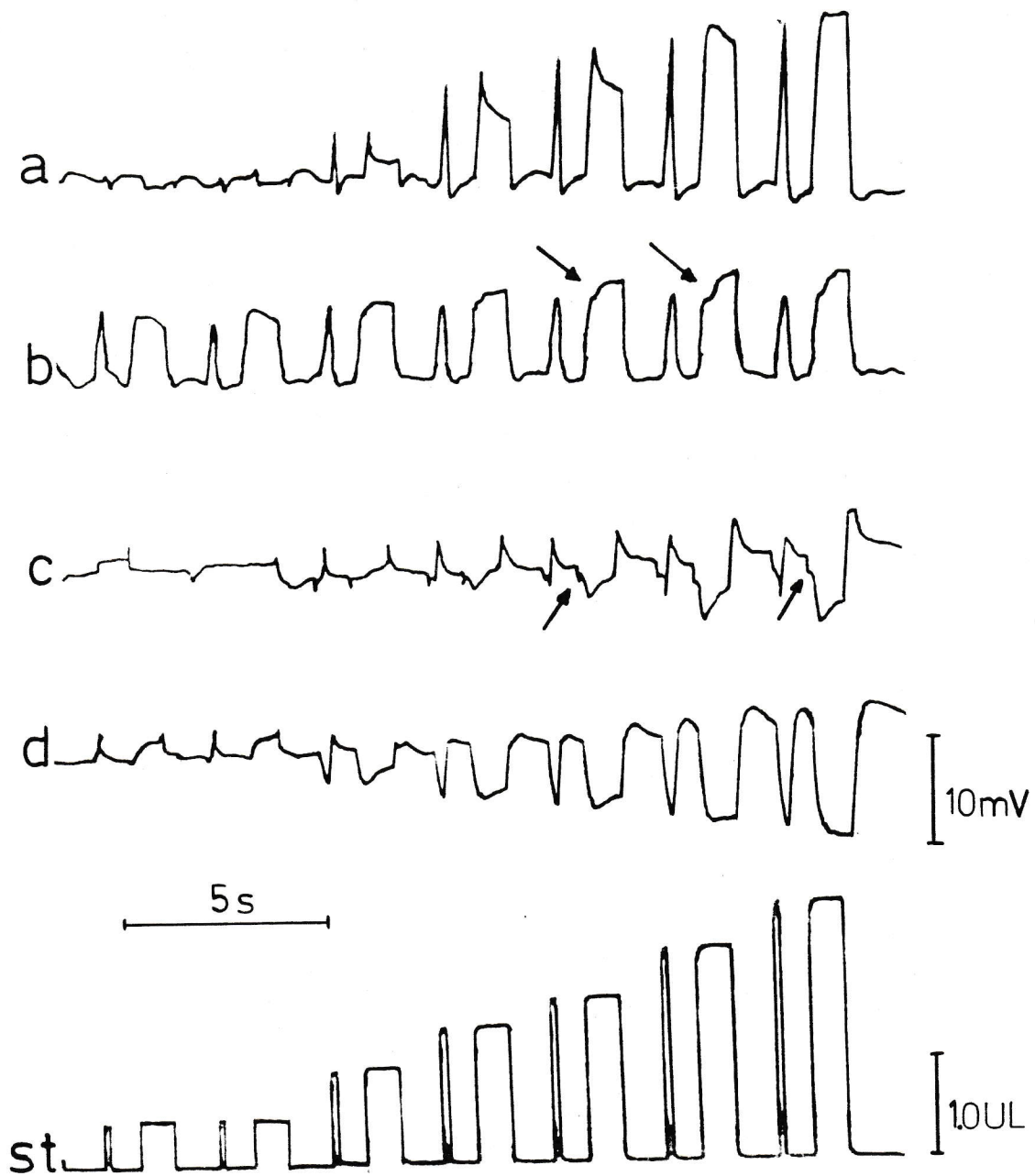


Fig. 7: Respuestas de cuatro unidades cromáticas (a, b, c, d) frente a una barrida de estímulos de intensidad creciente (st) con 621 nm. Las flechas indican componentes menores destacados en el texto.

de (d) y ubicarlo en una clase aparte.

La figura 7 sólo ilustra una parte de cada registro, éstos abarcan exploraciones más completas a lo largo del espectro. Con 574 nm se observan otras diferencias: sólo la unidad representada en (d) muestra hiperpolarizaciones para todo el rango de intensidad explorado con este color, mientras que tanto (a) como (c), empiezan con respuestas transientes y luego, con más luz, aparecen deflexiones sostenidas y positivas del potencial, con marcados picos de inicio. Para la segunda unidad (b), sólo se obtienen depolarizaciones sin transientes, de aspecto muy similar a las evocadas con 621 nm.

Estos registros muestran claramente la dificultad que existe para reconocer tipos celulares cromáticos por sus relaciones de sensibilidad espectral. En rigor, por sus espectros de acción se podría discernir un número mucho mayor de tipos celulares que los normalmente descritos para una retina tricrómata, pero en una clasificación de escasa significación funcional.

Conclusiones

Los antecedentes reunidos en el presente capítulo vienen a demostrar la necesidad de revisar los criterios de clasificación normalmente utilizados y le confieren una importancia prioritaria a los componentes fásicos, consistentemente evocados sólo en preparaciones vivas; éstos se correlacionan

con una conectividad específica, constituyendo una mejor base para una clasificación con validez funcional.

Esta clasificación se puede establecer a partir de la secuencia de estimulación inicialmente descrita. Esta consistía en dos estímulos monocromáticos, uno para la región verde del espectro (550 nm) y el otro en el rojo (621 nm), más uno que resulta de la suma de ambos. Mayores antecedentes se obtienen variando la intensidad de los estímulos; esto afecta los componentes físicos de las respuestas de acuerdo con el tipo de unidad.

Los criterios para esta nueva clasificación se resumen como sigue:

Tipo-L.- Respuestas de hiperpolarización sostenida frente a ambas longitudes de onda (550 nm. y 621 nm.) que muestran un transiente inicial más marcado al verde. La amplitud máxima de respuestas al rojo es siempre menor que la que se puede evocar con verde, además presentan un desarrollo temporal más lento con una fase de recuperación que se hace más larga con incrementos en la intensidad del estímulo. Las depolarizaciones transitorias al cese de respuestas al rojo, son pequeñas y desaparecen con luces intensas.

Tipo-C.- Respuestas de hiperpolarización sostenida o transiente al verde que saturan rápidamente con incrementos de intensidad, mostrando al cese un comportamiento similar al resumido para respuestas al rojo de

tipo-L. Con luz débil de 621 nm se obtienen depolarizaciones sostenidas o bien actividad sólo transiente, mientras que con intensidades mayores se puede llegar a evocar hiperpolarizaciones tónicas, pero siempre persiste una depolarización transitoria de amplitud significativa, al cese

La discriminación entre células R/G y RYB se basa en el mayor despliegue de transientes por parte de esta última, lo que parece un reflejo razonable de la participación adicional de conos azules. Desgraciadamente la actividad fásica es muy lábil y depende de las condiciones fisiológicas en que se encuentra el pez en registro. Cualquier deterioro afecta su magnitud, con lo que la calificación de este tipo de componentes debe ser sólo relativa a una misma sesión, considerando cualquier evolución sistemática a lo largo de ésta. Esto dificulta seriamente la distinción entre unidades cromáticas cuando sólo se obtiene un único registro. En los pocos casos en que se han logrado penetraciones exitosas de más de una célula de tipo-C, es posible reconocer la existencia de componentes temporales adicionales que permiten separar RYB.

Con estos criterios se ha discriminado en forma sistemática entre tipo-L y tipo-C, lograndose reconocer una mayor coherencia y uniformidad en la actividad de luminosidad, a la vez que una gran variabilidad para la cromática.

A modo de ejemplo, se muestra en la figura 8 el comportamiento de dos unidades frente a una barrida espectral

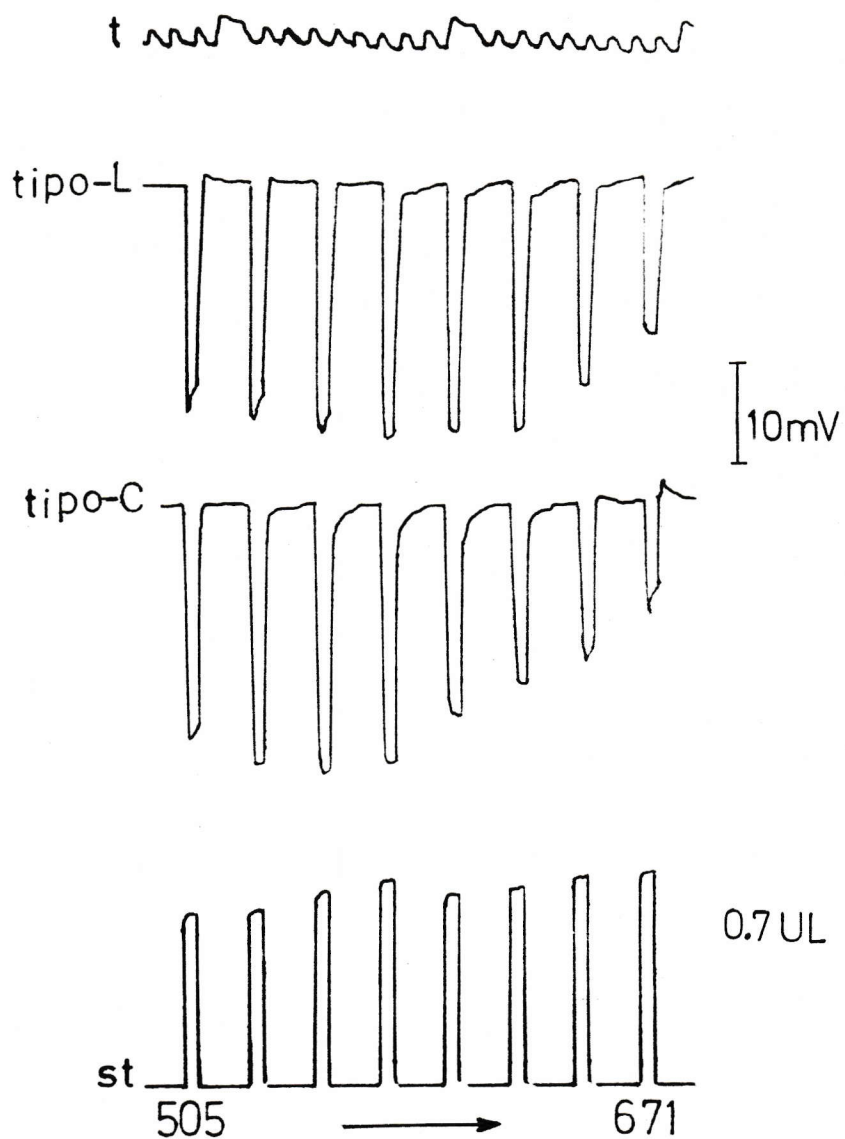


Fig. 8: Respuestas de una unidad tipo-L y una de tipo-C frente a una serie de estímulos espectrales de igual energía (0.7 ul) desde los 505 nm hasta los 671 nm. t Marca de tiempo de un ciclo por segundo.

de igual intensidad. Ambas muestran sólo hiperpolarizaciones, pero difieren en la distribución de transientes a lo largo del espectro. La del extremo superior en la figura los presenta sólo en la región del verde y al rojo, muestra un retorno lento sin depolarización transitoria, lo que nos hace reconocerla como de tipo-L. En cambio, la segunda muestra marcados transientes frente a los 671 nm y esta vez si aparecen depolarizaciones al cese, por lo que la definimos como de tipo-C.

Llevado el análisis de una célula similar hacia el extremo rojo, se pudo comprobar una transición a depolarización mas allá de los 680 nm. A través de la caracterización de curvas de respuestas, habríamos dicho que ambas son de luminosidad pero encontraríamos comportamientos divergentes frente a otras pruebas de estimulación. Djamgoz et al. (1981) describen en un ciprínido, una nueva célula tipo-L que denominan GB (verde-azul); según nuestros criterios, se trataría de una célula cromática como la recién analizada.

MECANISMOS ANTAGONICOS Y COLOR OPONENCIA

Antecedentes

Desde las primeras descripciones, los Potenciales-S han sido insistentemente asociados a un proceso temprano de codificación cromáticas en pares oponentes (Mac Nichol & Svaetichin, 1958). Pero no se ha logrado establecer la conectividad que los genera, ni cuáles son las poblaciones de conos que actúan sobre los diferentes tipos de células horizontales, aunque en las especies poiquilothermas estudiadas, es posible reconocer algunos rasgos comunes. Tanto en retina de peces como de tortuga con pigmentos visuales múltiples, la actividad de las células horizontales de tipo-L aparece dominada por la acción de conos rojos (Witkovsky, 1967; Naka & Rushton, 1966c). Las respuestas de depolarización de las células de tipo-C muestran también una sensibilidad mayor para luces de longitudes de onda larga, lo que sugiere que éstas dependen de la acción de unidades de tipo-L (Fuortes & Simon, 1974), posiblemente a través de una vía de realimentación inhibitoria sobre conos. Una vía así sólo ha sido caracterizada en la retina de tortuga (Baylor et al., 1971).

Aunque las células de tipo-C han sido un tema de interés permanente, las dificultades metodológicas y la variabilidad intrínseca de su actividad redundan en una escasez de estudios cuantitativos, y el complejo comportamiento que exhiben frente a estímulos intensos, ha circunscrito los análisis

publicados a un rango de actividad cuasi lineal (Naka & Rushton, 1966a,b; Fuortes & Simon, 1974; Burkhardt & Hassin, 1983). Con luces espectrales débiles se obtiene curvas de respuestas que pueden ser explicadas por relaciones algebraicas simples entre procesos univariantes, es decir, dependientes de un solo pigmento. Sólo en la última referencia, para un pez de retina dicrómata, se establece que las dos poblaciones de conos, convergen sobre células cromáticas con signos opuestos, en un proceso de sumación lineal. Para retinas más complejas (tricrómatas), este esquema resulta ser insuficiente para dar cuenta de respuestas R/G y R/YB, postulándose interacciones adicionales entre neuronas de segundo orden que involucran a más de dos tipos de fotorreceptores (Fuortes & Simon, 1974). En el caso específico de la carpa, los estudios sistemáticos de la actividad de células horizontales cromáticas sólo se refieren a mediciones de latencia para las hiperpolarizaciones y las depolarizaciones en las diferentes clases de horizontales, siempre restringidas al rango de intensidades en que éstas muestran un comportamiento lineal (Spekreijse & Norton, 1970; Shigematzu et al., 1978).

Dominio de actividad de las horizontales cromáticas

Más de cincuenta sesiones exitosas de registros in vivo, incluyendo algunas exploraciones sistemáticas, tanto a lo largo del espectro como en intensidad, han permitido reconocer algunas particularidades del dominio de actividad de las unidades cromáticas.

Las respuestas de hiperpolarización que se registran en este tipo celular (fig.9), como ya se discutió, presentan desarrollos temporales lentos comparados con la actividad de luminosidad, reconociéndose si una analogía con las respuestas al rojo de las células horizontales de tipo-L; ambos casos se destacan por la pobreza de transientes.

Frente a estímulos de longitud de onda larga, las células cromáticas presentan en cambio, características de gran complejidad y variabilidad. Con estímulos débiles de luz roja se obtiene depolarizaciones sostenidas que crecen con la intensidad hasta alcanzar amplitudes máximas. Incrementos posteriores ya no evocan un potencial sostenido; sólo se observa un incremento gradual hasta el cese del estímulo, donde se inserta un transiente positivo que decae hasta el potencial de oscuridad, siguiendo un curso temporal exponencial. Con valores aún mayores de la energía del estímulo, aparece una hiperpolarización, transiente al principio, que luego se hace sostenida arrastrando la acción antagónica por debajo del potencial de oscuridad. Entonces la depolarización se reduce a un transiente al cese.

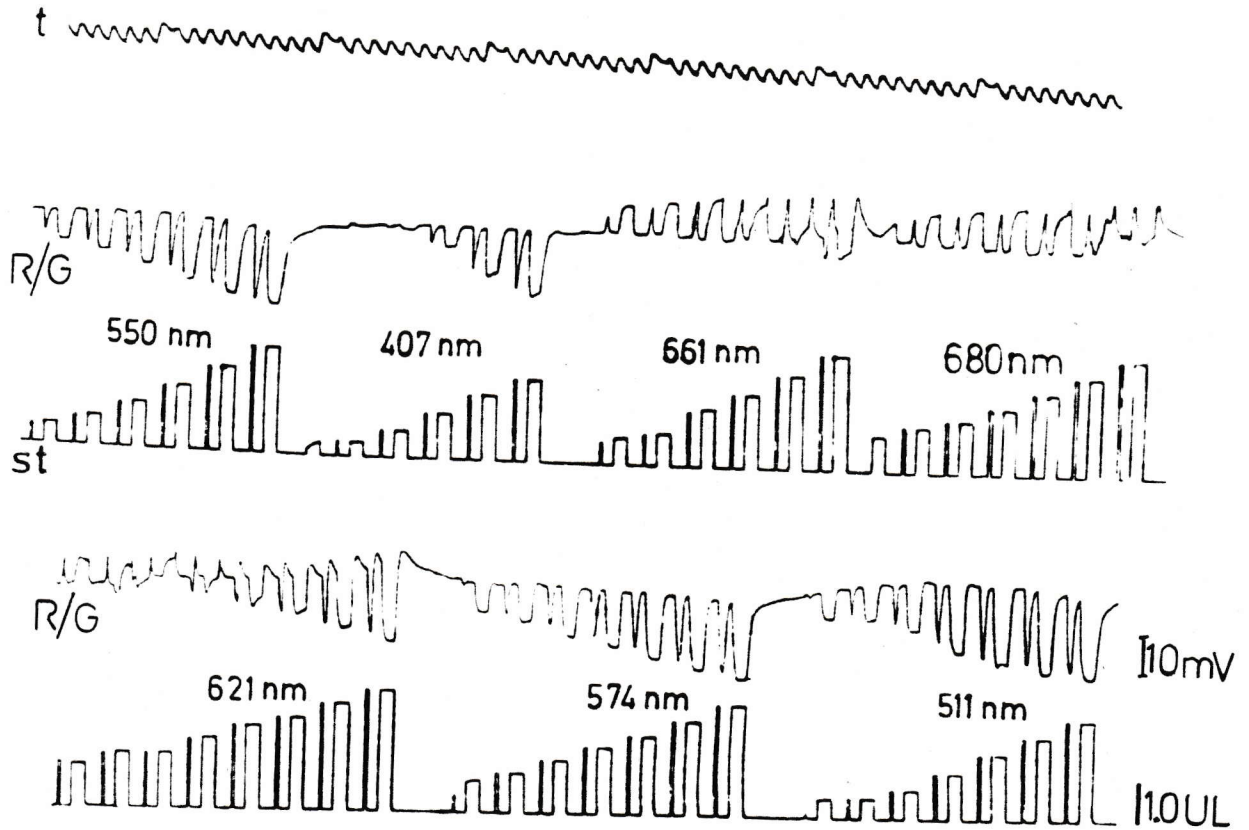


Fig. 9: Respuestas de una célula de tipo-R/G frente a una serie de estímulos (st) de intensidad creciente a diferentes longitudes de onda. Marca de tiempo igual a la figura anterior.

Esta particular evolución del cambio de polaridad en las respuestas cromáticas, indica que los procesos de acción depolarizante actúan con un retardo considerable, de modo que en respuestas dominadas por la acción hiperpolarizante, el mecanismo antagónico se manifiesta al cese en forma transiente. En la figura 9 se puede ver que las depolarizaciones desaparecen en el amarillo (574 nm), lo que sugiere una pobre participación del mecanismo depolarizante en esta región del espectro. Esta observación se contrapone a una acción directa por parte de células de tipo-L o conos rojos, ya que ambos presentan sensibilidades altas para esta región del espectro. Por otra parte, se puede observar en la figura 9, que la amplitud máxima de las depolarizaciones evocadas en el rojo cercano (621 nm), es menor que las alcanzadas con longitudes de onda más largas (661 nm y 680 nm). Este hecho no es fácil de conciliar con la participación de una población única de fotorreceptores; la saturación de su actividad se manifiesta en una hiperpolarización máxima que no depende de la composición espectral de la luz incidente sino de limitaciones biofísicas de la membrana.

Mayores antecedentes se obtienen de las curvas de intensidad versus amplitud de respuestas (I-R, fig.10a) y de sensibilidad espectral (fig.10b), para la misma unidad de la figura 9. Los valores de amplitud corresponden a la diferencia entre el potencial al inicio del estímulo y el alcanzado al cese. La sensibilidad es el valor inverso de la intensidad

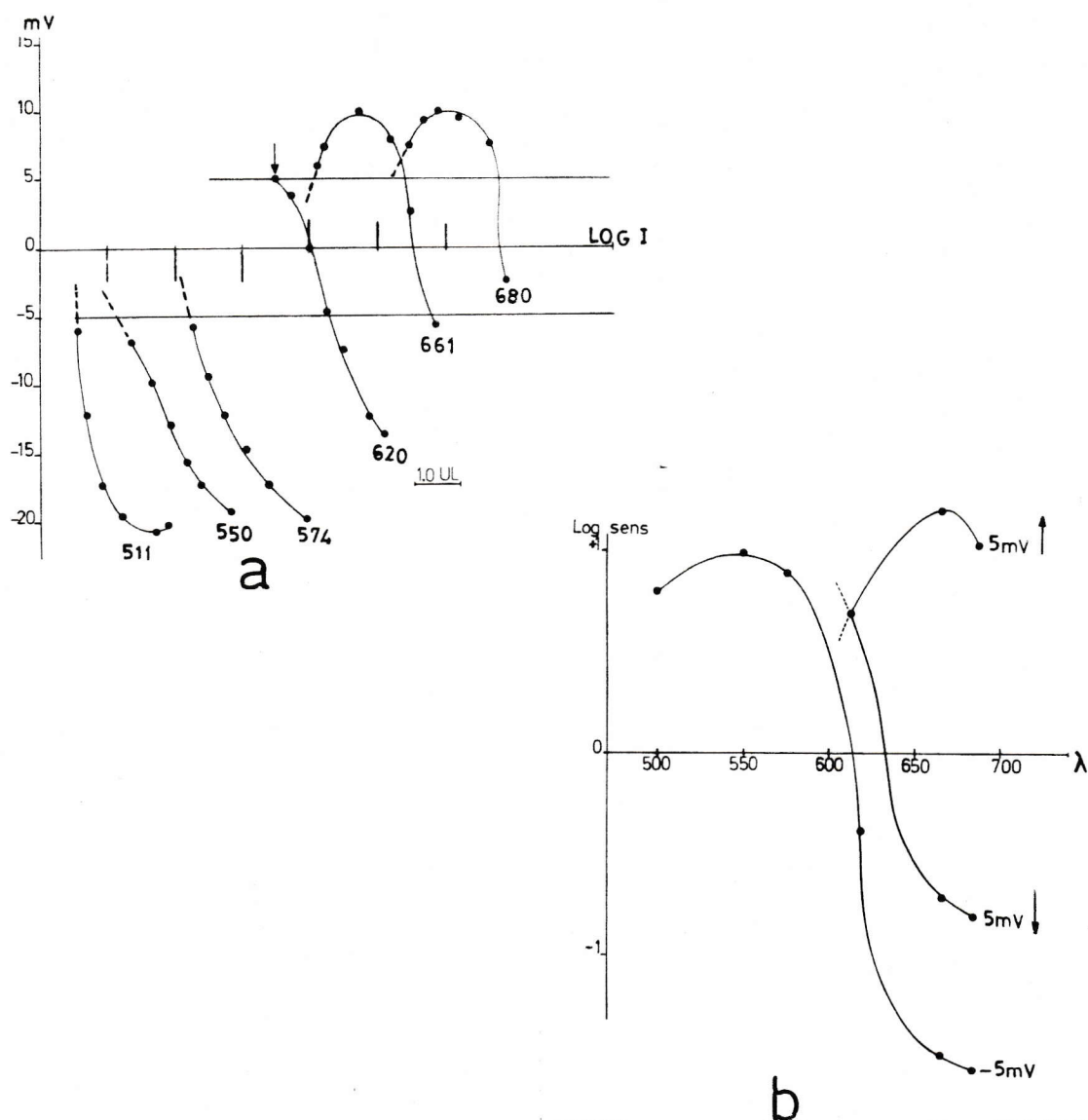


Fig. 10: a Curvas I-R para una célula R/G (fig.9). Cada curva corresponde a una longitud de onda y está desfasada en la abscisa (LOG I) para mayor claridad. Los orígenes (0 ul) en la abscisa están marcados para cada valor de longitud de onda. La ordenada corresponde a las amplitudes de las respuestas medidas en mV.

b Curvas de sensibilidad derivadas de (a) para las amplitudes marcadas por trazos horizontales en I-R (5 mV y -5 mV). El sentido de las flechas indica si la sensibilidad fue medida en la fase ascendente (↑5 mV) o descendente (↓5 mV) en las curvas I-R obtenidas con luz roja (621, 661, 680).

necesaria para evocar una respuesta de amplitud dada, que es evaluada por interpolación gráfica en la figura 10a. La escala logarítmica de energía, en la abscisa, está referida a la calibración absoluta del sistema de medición. Las intensidades máximas utilizadas alcanzan a saturar tanto las hiperpolarizaciones al verde como las depolarizaciones al rojo, lo que permite aportar antecedentes acerca del comportamiento de células tipo-C mas allá de los rangos comunmente estudiados.

Las curvas intensidad-respuesta (fig.10a) para longitudes de onda largas, muestran que los primeros estímulos evocan depolarizaciones máximas y luego, cuando éstos son mas intensos, se observa una disminución de amplitud hasta cambiar de signo, formando una función bifásica. Así, frente a una luz monocromática se encuentra respuestas de igual tamaño para dos intensidades distintas. En la figura 10b aparecen los valores de sensibilidad para una amplitud que coincide con el máximo para 621 nm (flecha en 10a) y que corta en dos puntos las curvas I-R de 661 nm y de 680 nm. Las sensibilidades de la fase creciente son mayores hacia el extremo rojo, mientras que para la fase decreciente se obtiene una curva aproximadamente paralela a la que corresponde para una hiperpolarización de -5 mV de amplitud. En estas curvas se observa que la acción depolarizante tiene una sensibilidad máxima al rojo extremo, contraponiéndose a la caída de los espectros de acción de conos (Tomita et al., 1967) y de células tipo-L para estas longitudes de onda (fig.14c,d).

Estas observaciones se concilian con las de Naka & Rushton (1966a), en que encuentran, mediante técnicas de adaptación, un proceso con sensibilidad máxima a los 680 nm y anormalmente baja en el verde-amarillo, en la generación de las depolarizaciones de células de tipo-C. Un pigmento con estas características espectrales no ha sido nunca descrito por experimentos espectrofotométricos, ni teóricamente parece que pueda existir (Blatz & Liebman, 1973). Una posible explicación surge de los fenómenos de pseudopigmentos que, aunque resultan de interacciones entre pigmentos reales, muestran las características de invariancia propias de un pigmento real, dando cuenta de una actividad monofásica circunscrita al extremo rojo (Sirovich & Abramov, 1977). La naturaleza de estas interacciones es desconocida y no se manifiestan en forma pura en ningún compartimiento accesible al microelectrodo.

Una explicación alternativa es la posible existencia de un fenómeno de oclusión, donde la acción presináptica en el circuito de realimentación a conos, es ocluida por la hiperpolarización del fotorreceptor (Gershenfeld et al., 1980). De acuerdo con la proposición de Fuortes & Simon (1974), para Pseudeis scripta, la acción depolarizante resultaría de la facilitación presináptica de conos verde mediada por horizontales de luminosidad; frente a longitudes de onda media y corta esta población de conos se hiperpolariza, bloqueando la acción antagónica (Piccolino et al., 1980), de esta manera,

las depolarizaciones quedarían circunscritas al rojo.

Comportamiento frente a sumas de colores

Un antecedente más directo de la posible existencia de un mecanismo de oclusión, es a través de experimentos con sumas de colores en diferentes combinaciones temporales. Esto permite estudiar el comportamiento de la acción depolarizante en presencia y ausencia de una hiperpolarización.

Contrariamente a lo esperado, en la figura 11a se muestran depolarizaciones al rojo sobre hiperpolarizaciones evocadas con verde. Aunque existiría una acción inhibitoria, ya que a intensidades menores del estímulo depolarizante, según se ve en el extremo derecho de este mismo registro, la amplitud de la depolarización es menor que la obtenida sin fondo verde. Una secuencia complementaria muestra el comportamiento de hiperpolarizaciones al verde (511 nm), tanto en presencia de rojo (621 nm), como en ausencia de él (fig. 11b). La variación de potencial evocado sobre fondo rojo es mayor que la obtenida para verde puro, lo que podría explicarse por una oclusión de la acción depolarizante durante la respuesta al verde. Pero en las respuestas adyacentes de esta misma figura, se observa que con una intensidad mayor de la luz de fondo hay una inhibición de la hiperpolarización, lo que demuestra una persistencia de la acción antagónica en presencia de verde. En la respuesta a la suma "simultánea",

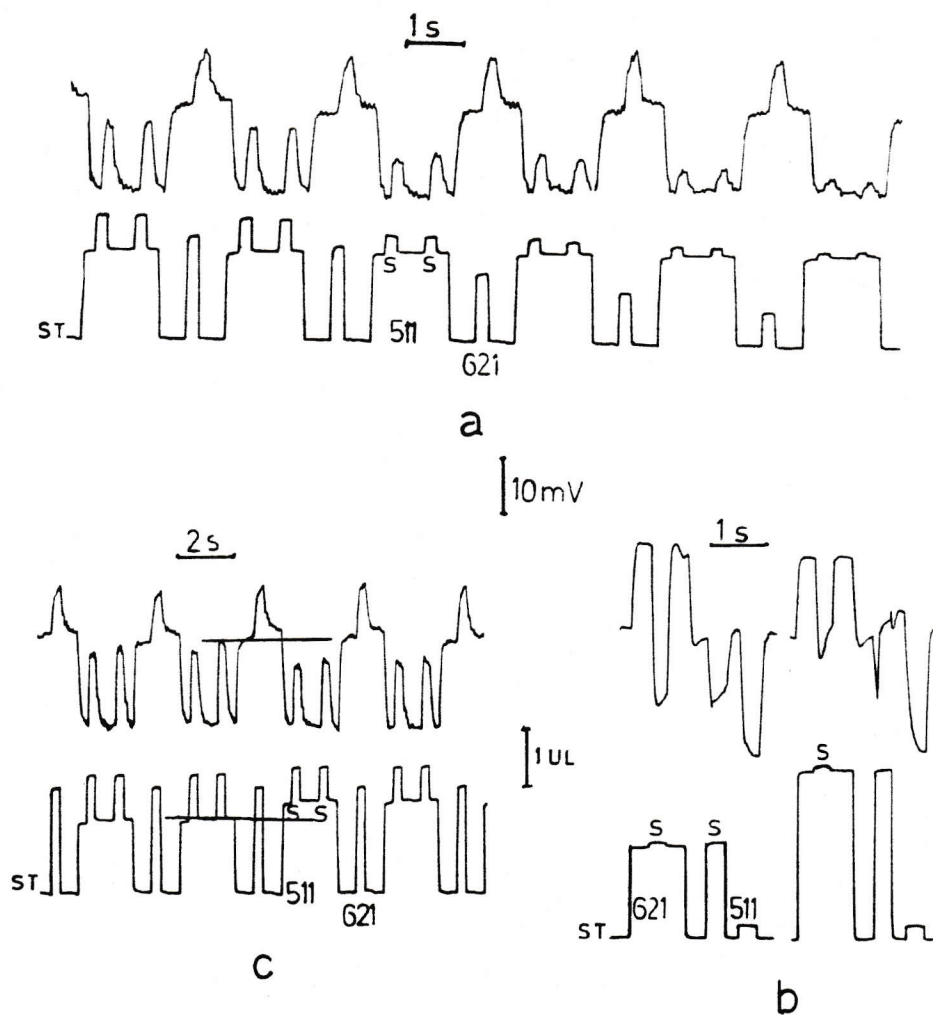


Fig. 11: Respuestas de una célula de tipo-R/G frente a diferentes combinaciones temporales de rojo (621 nm), verde (511 nm) y suma ambas (s) de acuerdo con los despliegues de estímulos en escala logarítmica (st).

a Depolarizaciones obtenidas con luz roja (621) sobre una hiperpolarización evocada con verde (511).

b Hiperpolarizaciones al verde en presencia y ausencia de una depolarización evocada con rojo. Note la inhibición de la hiperpolarización al incrementar la intensidad del rojo, la que no incide en una mayor depolarización.

c Con la misma secuencia de estímulos que en **a** se muestra que un incremento en el verde que, aún sin incidir en una mayor hiperpolarización, inhibe depolarizaciones al rojo. Los trazos horizontales permiten destacar las variaciones de intensidad del estímulos y amplitud de las depolarizaciones.

donde no hay una luz de fondo previa ni posterior, se obtiene una hiperpolarización sólo transitoria, indicando la instalación retardada de una acción depolarizante. Esto descarta la existencia de un fenómeno de oclusión en retinas de carpas registradas in vivo.

Respecto a este mismo experimento (fig.11b), se debe destacar que frente al incremento de intensidad del estímulo de fondo (612 nm), no se observa un aumento en la amplitud de la depolarización, pero si hay una fuerte inhibición de la respuesta al verde, de manera que, si bien no cambia el potencial postsináptico, hay un incremento de la acción antagonica. Esta observación viene a corroborar que la depolarización máxima no corresponde a una saturación del generador. Esto también se refleja claramente en la figura 11a, donde las amplitudes de las depolarizaciones evocadas en presencia de hiperpolarizaciones al verde, crecen con la intensidad del estímulo, aunque en ausencia de luz de fondo, las intensidades menores evocan ya una respuesta máxima. El comportamiento es similar para las amplitudes máximas de hiperpolarización: en la figura 11c se observa que un incremento en la luz de fondo (511 nm), sin incidir en una hiperpolarización mayor, ejerce una acción inhibitoria mayor sobre las depolarizaciones al rojo (s s).

De acuerdo con estos antecedentes entonces, las amplitudes máximas, tanto de hiperpolarización como de depolarización, no reflejan una saturación de los mecanismos

incide en un cambio en el potencial registrado en células horizontales cromáticas. Según se mencionó en párrafos referidos al dominio de actividad de estas unidades, las amplitudes máximas alcanzadas para respuestas de depolarización, varían con la longitud de onda, lo que es un índice razonable de que estas amplitudes tampoco dependen de limitaciones biofísicas de la membrana postsináptica.

Mecanismos iónicos

Una proposición que tiende a ser aceptada universalmente, aunque su mayor documentación se refiere a experimentos realizados en tortuga, es que las respuestas de depolarización, siempre evocadas con longitudes de onda larga, resultarían de un aumento de la liberación del neurotransmisor de conos verdes por la acción presináptica de horizontales de luminosidad, más sensibles al rojo. De esta forma, en unidades tipo-C, las variaciones de potencial evocadas con luz, serían la manifestación de los cambios de conductancia para un único ión, el Na^+ , modulados por el neurotransmisor de los conos en contacto directo.

Más allá del carácter pre- o postsináptico de las interacciones que median la actividad bifásica, los experimentos con sumas de colores permiten aportar algunos antecedentes acerca de los fenómenos iónicos involucrados. En particular, los resultados ilustrados en las figuras 12 y 13

sugieren que los procesos oponentes, en la membrana donde convergen, modulan iones distintos. En efecto, en el primero de éstos (fig.12a) se observa que un estímulo rojo (621 nm), a pesar de evocar una hiperpolarización, va acompañado de cambios que se oponen a la acción del verde (511 nm), lo que se manifiesta en la menor amplitud de la hiperpolarización obtenida con la suma de ambos estímulos (s) en relación a la de 511 nm.

De acuerdo con la literatura, en las células horizontales (Waloga & Pack, 1978) y en los fotorreceptores (Tomita, 1970), las hiperpolarizaciones evocadas con luz resultan de una disminución de la conductancia al Na^+ , desplazando el potencial de la membrana hacia el de equilibrio del K^+ (segundo ión en importancia). La respuesta de hiperpolarización obtenida con rojo (fig.12a), resultaría principalmente de este proceso que, con un retardo menor, se manifiesta mejor al inicio. Pero este proceso va seguido por la instalación tardía de un cambio opuesto, de acción depolarizante. En la respuesta a la suma, esta depolarización tardía persiste, oponiéndose al efecto de una disminución aún mayor de la conductancia al Na^+ por la presencia adicional de luz verde, de manera que la acción depolarizante involucra otros mecanismos iónicos; sea el aumento en la conductancia para un ión de potencial de equilibrio positivo o la disminución para uno de equilibrio negativo.

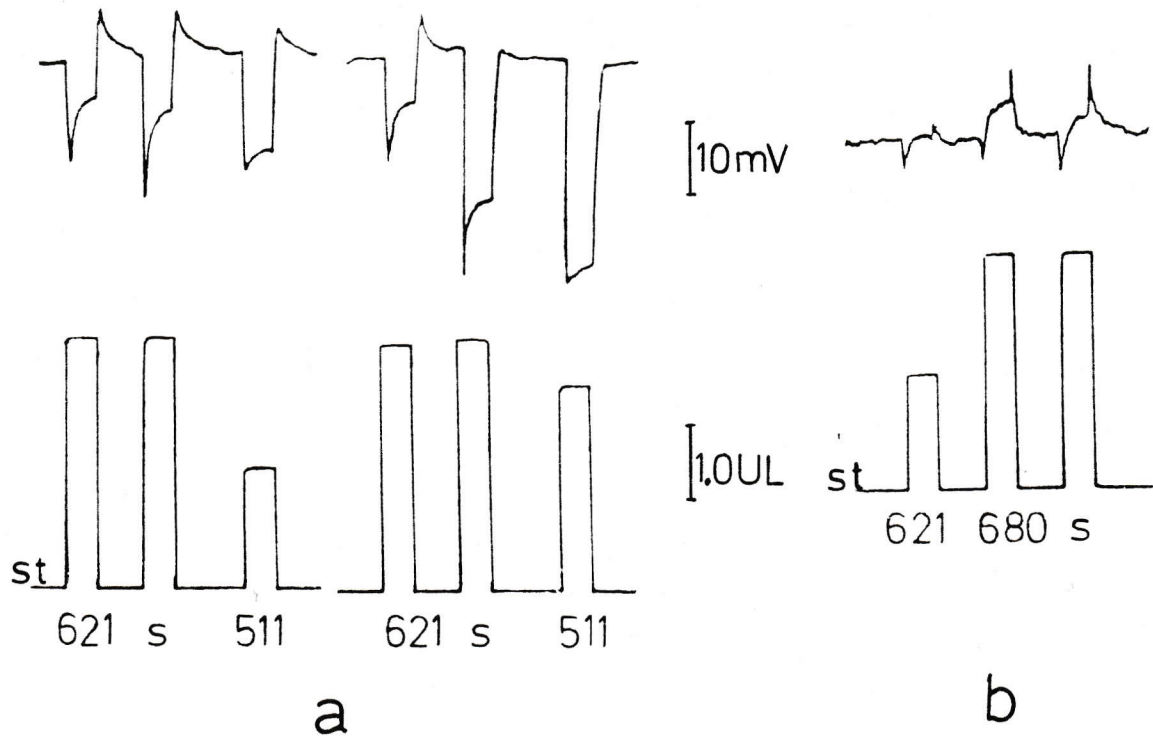


Fig. 12: Inhibición de respuestas cromáticas, tanto de hiperpolarización al verde (511 nm en a) como de depolarizaciones en el rojo profundo (680 nm en b) por la suma (s) de rojo (621 nm), independientemente del signo de la respuesta al primer estímulo. st Despliegue de estímulos en escala logarítmica.

Esta observación es reafirmada por la figura 12b donde se muestra que una depolarización evocada con rojo lejano, (680 nm) es inhibida por la suma (s) de una luz también depolarizante, pero en el rojo cercano (621 nm). Una prueba mas definitiva aparece en la figura 13, aunque es una observación única. En ella se observa que modulando la intensidad de una luz de fondo verde (511 nm), se revierte la polaridad de respuestas evocadas con rojo (621 nm), lo que muestra que este estímulo mueve la membrana a un potencial por sobre el evocado con verde (cercano al del K+) pero que, en este caso particular, también está por debajo del potencial de oscuridad (cercano al de Na+).

Conclusiones

Puntualizando las propiedades mas relevantes de las interacciones antagónicas tenemos que:

1.- La actividad depolarizante presenta un espectro de acción que no se concilia con los descritos para células de tipo-L ni conos rojos, lo que sugiere que ninguno de estos dos elementos por sí sólo es responsable de las depolarizaciones. Estas resultarían mas bien de la participación de fenómenos de pseudopigmento, los que involucran interacciones entre procesos de diferentes sensibilidades espectrales.

2.- El fenómeno de oclusión descrito para la retina de tortuga, no aparece en los experimentos con

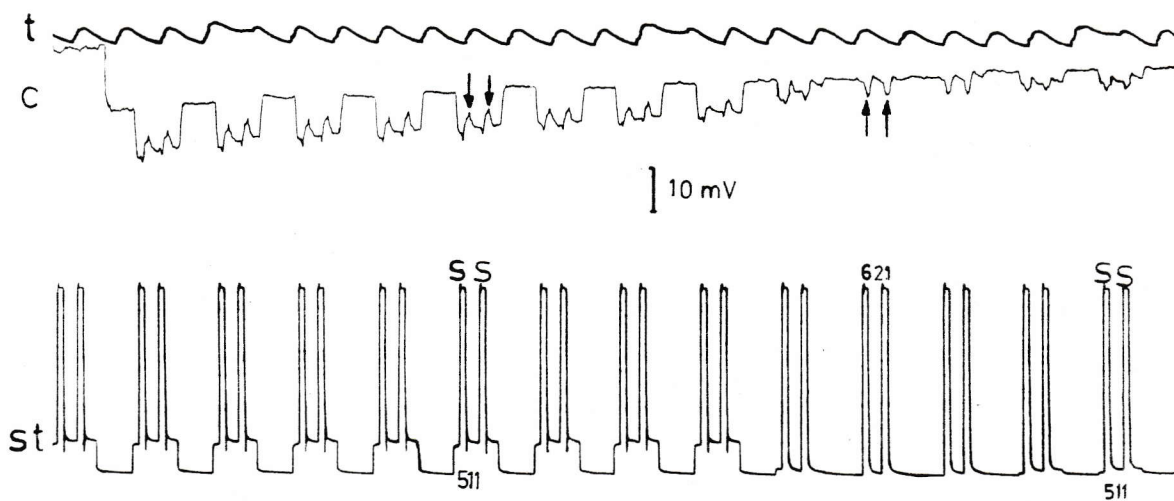


Fig. 13: Cambio de polaridad en las respuestas al rojo (621 nm) de una célula R/G modulando la intensidad de un luz superpuesta, verde (511 nm). *st* Despliegue de los estímulos en escala no calibrada. Las flechas indican depolarizaciones al rojo sobre fondo verde (*s s*) e hiperpolarizaciones para rojo puro (621).

retina de tortuga, no aparece en los experimentos con sumas de colores, demostrando que para la carpa, registrada in vivo, las interacciones color oponente a nivel de horizontales, responden a mecanismos diferentes que los de estos reptiles, de origen terrestre.

3.- Las amplitudes máximas, tanto de hiperpolarización como de depolarización, no corresponden a la saturación de los mecanismos generadores ni de las conductancia moduladas en la membrana donde convergen ambos procesos de acción opuestas, ya que persisten efectos inhibitorios recíprocos.

4.- Ambos procesos oponentes mueven conductancias diferentes en la membrana donde convergen y no siempre inciden en cambios en el potencial postsináptico. Esto permite explicar la existencia de inhibiciones recíprocas independientes del signo de las respuestas a luces monocromáticas. Por otra parte, el mayor retardo de las depolarizaciones sugieren que estas dependen de neuronas de segundo orden (horizontales y/o bipolares).

ACTIVIDAD MONOFÁSICA

Antecedentes

La actividad de las células horizontales de luminosidad se caracteriza por ser monofásica, manifestándose en respuestas de hiperpolarización cualquiera sea la composición espectral de la luz incidente. Inicialmente, experimentos de adaptación cromática en diferentes especies de peces tropicales, sugirieron la participación de un proceso único en la generación de esta actividad (Svaetichin & Mac Nichol, 1958). Posteriormente, siempre utilizando adaptaciones cromáticas, Naka & Rushton (1966c) identificaron en un ciprinido de aguas continentales (Tinca tinca), dos procesos convergentes sobre unidades de tipo-L. Esta observación fue luego corroborada directamente en la carpa (Witkovsky, 1967). En la tortuga se ha configurado un modelo tentativo donde la acción directa sobre las células L, estaría circunscrita a los conos rojos y la participación de los conos verdes, reducida a interacciones en los conos dobles (Fuortes & Simon, 1974). Esto parecería reafirmado morfológicamente en Carassius auratus, por la ubicación central de procesos de células L en la tríada de conos rojos (Stell et al., 1975). Pero las diferencias observadas en los cursos temporales de respuestas de células de tipo-L, según sean evocadas con luz roja o verde, sugieren una importante participación de conos verdes, aunque estas diferencias son sólo evidentes en regis-

tros obtenidos in vivo.

Comportamiento espectral

La figura 14 muestra registros de exploraciones sistemáticas tanto a lo largo del espectro como en intensidad; en 14a aparecen barridas espectrales con cuatro valores fijos de intensidad, mientras que en 14b se ha variado la intensidad para diferentes longitudes de ondas. En ellas se puede observar que los transientes de inicio decaen paulatinamente hacia el extremo rojo y también ante incrementos de intensidad para longitudes de onda medias. Esta variabilidad en la forma, en relación con la composición espectral, sólo puede entenderse por la participación de por lo menos dos tipos de conos con espectros de acción diferentes. Estos registros son una selección entre más de una decena de unidades para las que se obtuvo series completas de respuestas, mostrando todas el mismo fenómeno, con solo leves variaciones en la amplitud del transiente y en la extensión de su dominio.

También se puede seguir la distribución de transientes en las curvas I-R y de sensibilidad derivadas de estas mismas unidades (fig.15). En estos gráficos se tomó en cuenta la amplitud máxima que alcanza el transiente de inicio de la respuesta (línea punteada) y la que se mide al cese del estímulo (trazo continuo). En ellos podemos reconocer dos poblaciones de curvas I-R. En la región verde-azul, éstas se cifren a una relación prácticamente lineal para el rango de

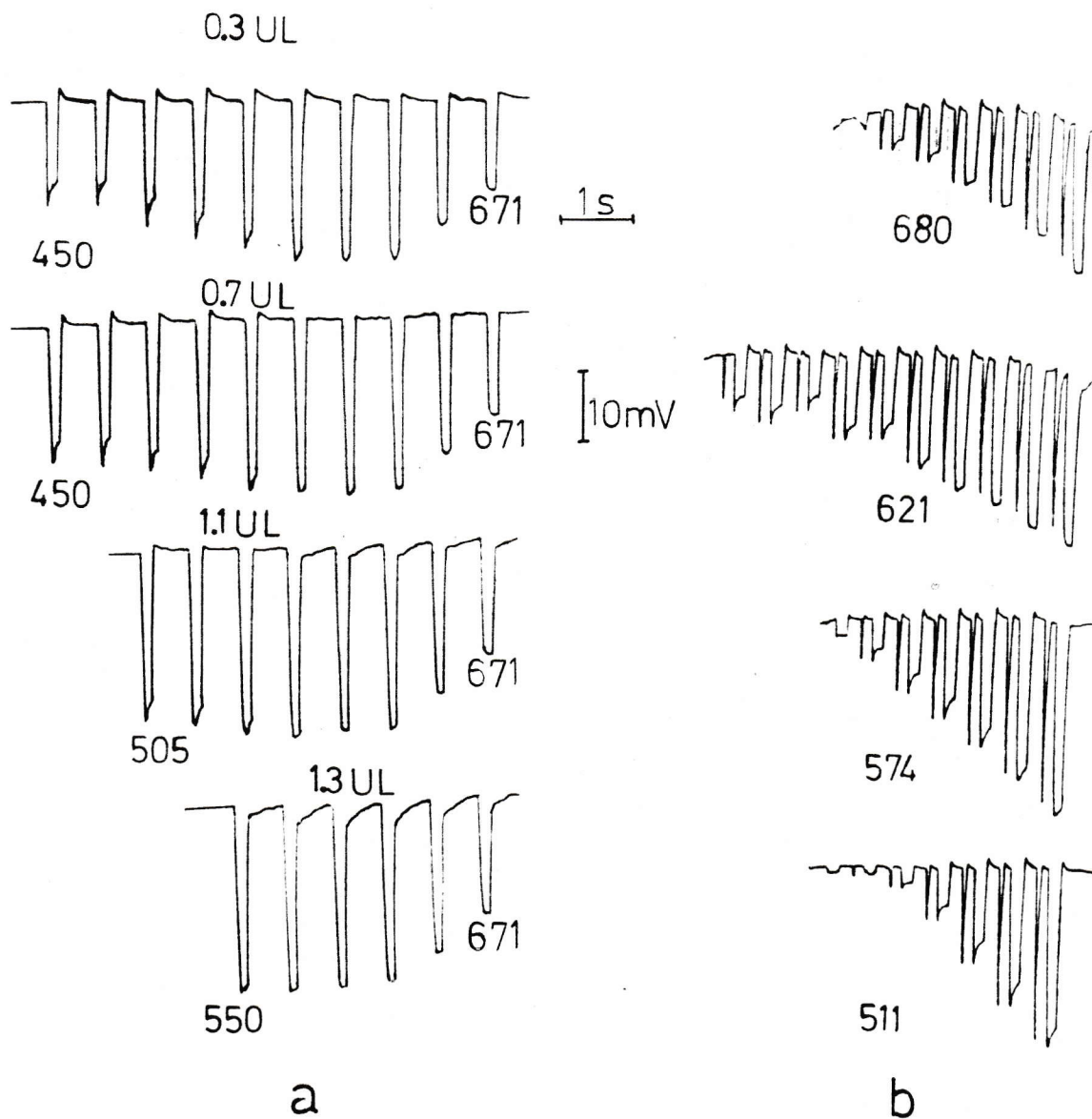


Fig. 14: Comportamiento de células tipo-L frente a barridas espectrales para cuatro intensidades fijas que van indicadas sobre las respuestas (a). Las cantidades que aparecen bajo las respuestas corresponden a la longitud de onda de los estímulos de ambos extremos de la barrida. (b) Respuestas de una célula del mismo tipo, frente a estímulos de intensidades crecientes de diferentes longitudes de onda. En esta última se tiene un estímulo breve (0.14 s) seguido por uno de mayor duración (0.9 s). La longitud de onda aparece bajo cada serie de intensidad.

intensidades exploradas, con una importante participación de la actividad transiente. Dependiendo de la célula, desde los 574 nm o 621 nm, se observa un desarrollo más complejo, con una fase temprana de saturación seguida luego por incrementos más acentuados. Las pendientes son menores en esta región del espectro, posible reflejo de una participación más exclusiva de conos rojos, en contraposición a lo que se observa en la región verde donde se sumarían las acciones de otras poblaciones de conos.

De las curvas I-R que presentan una mejor distribución de puntos en el eje de intensidades (fig.15a), fueron derivadas curvas de sensibilidad (fig.15c), esto es, el valor inverso de la intensidad necesaria para evocar una respuesta de amplitud dada. Para la interpolación continua se tuvo en cuenta las curvas obtenidas con mayor resolución espectral (fig.15c), sin máximos intermedios y más bien aplanadas hacia el violeta, con un mínimo alrededor de 480 nm. La figura 15d corresponde a tres curvas derivadas de otra unidad, en que se alcanzó respuestas de saturación en el rojo. Esta célula fue seleccionada por la nítida correspondencia que existe entre la última curva de 15c y la primera de 15d, de manera de configurar un grupo homogéneo que permite cubrir mejor el dominio de actividad de las células de tipo-L.

En esta familia de curvas se reconoce la participación de dos procesos asociados a los máximos de sensibilidad, lo que concuerda con las descritas por Naka & Rushton (1966c).

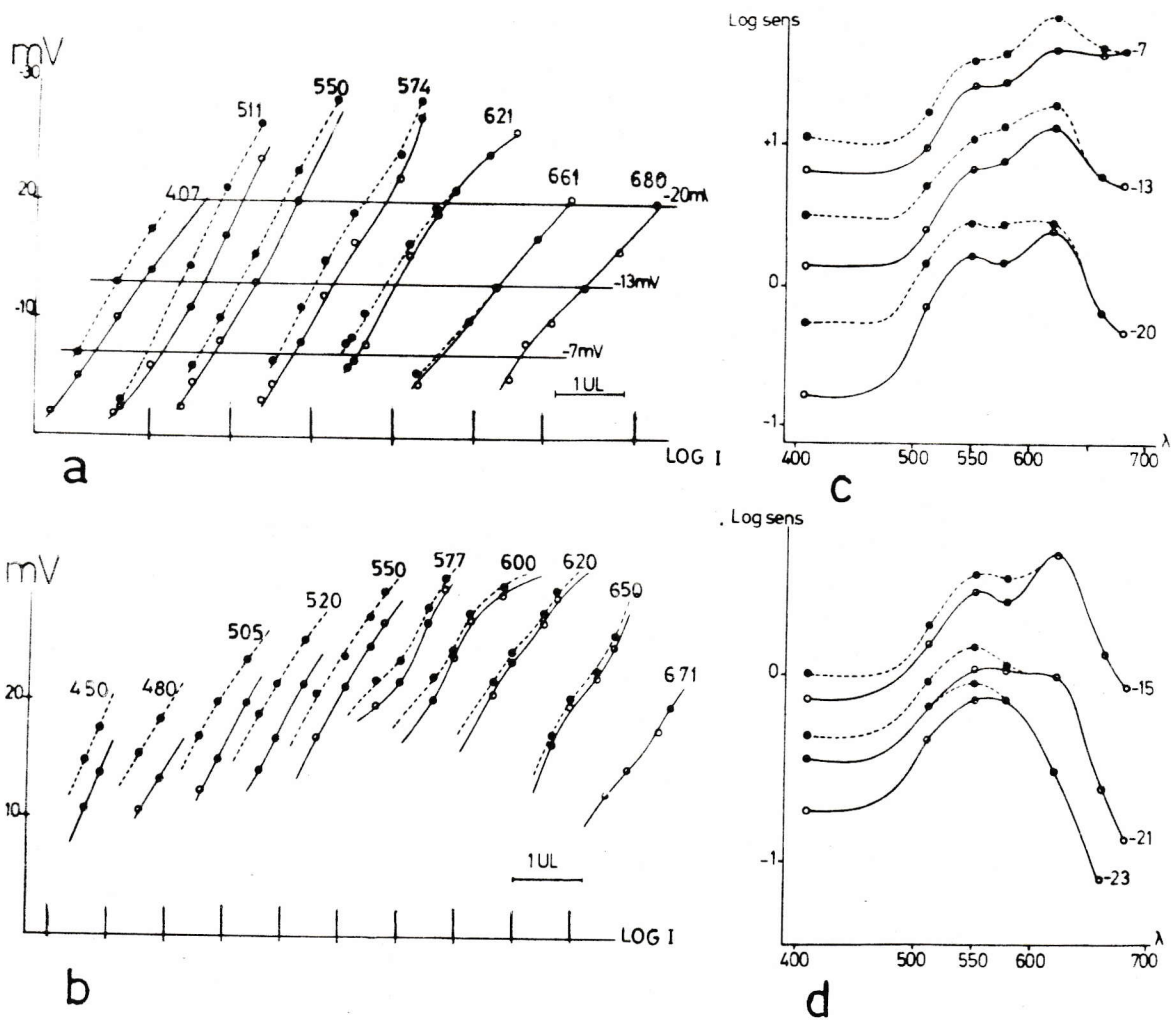


Fig. 15: a Curvas I-R para una unidad de tipo-L (de fig.14b) graficadas según lo descrito para fig.10a. Las líneas horizontales corresponden a los niveles de amplitud de las que se derivan las curvas de sensibilidad en (c). Las líneas punteadas para estos gráficos, corresponden a las amplitudes medidas en el transiente de inicio y las continuas al cese.

b Curvas I-R de fig.14a con una mejor resolución espectral.

c Curvas de sensibilidad derivadas de (a) para las que se indica el valor de amplitud seleccionado.

d Curvas de sensibilidad derivadas de otra unidad de tipo-L, para la que se alcanza respuestas de saturación en el rojo.

Aunque en esta referencia, la participación del proceso sensible al verde, fue revelada mediante adaptaciones con luz roja. Una posible justificación de esta discrepancia parcial es que en nuestros registros la actividad para esta región del espectro aparece mejor sustentada por los transientes, que sólo se manifiestan in vivo. La participación de estos procesos, varía según las amplitudes seleccionadas: para valores menores, se observa la predominancia del sistema sensible al rojo con un máximo cercano a 620 nm coincidente con el de los conos rojos de la carpa (Tomita et al., 1967). En cambio, para amplitudes mayores éste pierde importancia, desapareciendo prácticamente en la curva inferior de la figura 15d. El segundo proceso muestra un desarrollo inverso: perfilado como un pequeño hombro en las curvas derivadas para amplitudes menores, pasa luego a dominar la actividad de estas células, con un máximo que parece coincidir con el de conos verdes (530 nm) según la misma referencia anterior. La magnitud de los transientes va cambiando junto con esta transición de dominancia espectral, siendo máximos cuando el proceso sensible al rojo está aún lejos de la saturación, desapareciendo luego, cuando la banda espectral inicialmente marcada por ellos, pasa a dominar. De acuerdo con los espectros de acción de conos rojos y verdes, esta actividad física aparece donde ambos procesos convergentes presentan una sensibilidad alta, lo que sugiere que los transientes de inicio son la manifestación de complejas relaciones mutuas.

Experimentos de inducción

Una aproximación para mejor entender la naturaleza de estas interacciones es a través de experimentos de adaptación selectiva. Por el carácter transiente de la actividad que interesa manipular, se buscó mantener constante el potencial al inicio de los estímulos de prueba, evitando de esta forma los efectos de sumación y las posibles distorsiones debidas a las características no-lineales de la membrana de estas células. Se adoptó una secuencia de estimulación consistente en un estímulo inicial de preadaptación de 10 s de duración, seguido por uno de prueba de 0.96 s, separados por un intervalo de 0.3 s.

La serie experimental con secuencias de inducción aparece ilustrada en la figura 16a. En el registro (b), tanto la luz de adaptación como los estímulos de prueba son de la misma composición espectral (511 nm) y de igual intensidad. Con esta configuración no se observa diferencias entre la respuesta al estímulo que precede al pulso de larga duración y el que lo sigue; esta ausencia de efecto persiste con intensidades mayores, así como al cambiar una o ambas luces por otra de 407 nm. Estímulos inductores de longitud de onda larga, 621 nm y 680 nm provocan, en cambio una disminución de la amplitud de la respuesta al estímulo de prueba (inducida), así como la reducción del transiente a una estrecha espiga

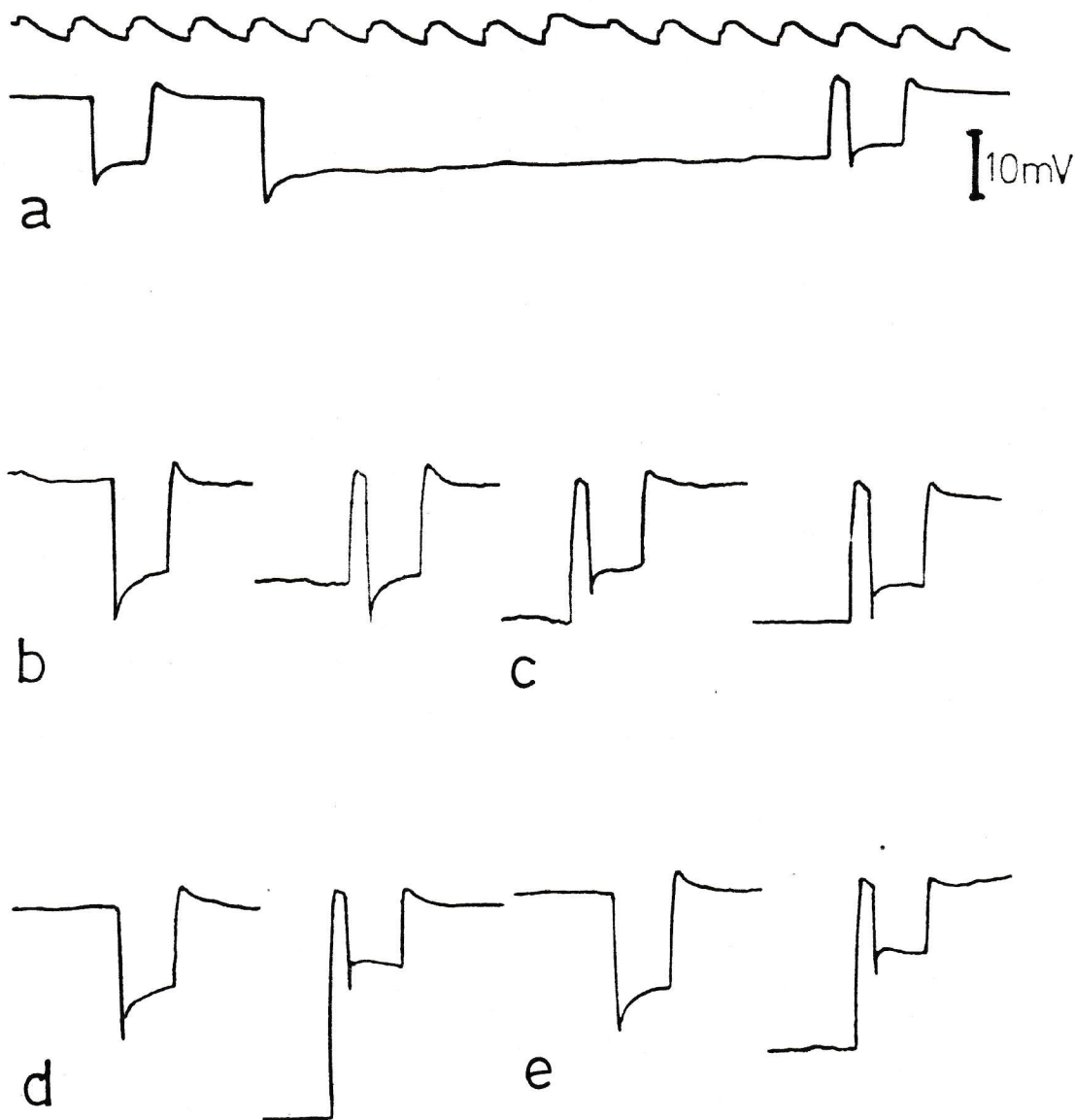


Fig. 16: a Pruebas de inducción mostrando la respuesta control, seguida de la respuesta al estímulo inductor prolongado y la respuestas "inducida" a un estímulo idéntico al control. b Para intensidades iguales de verde (511 nm). c Con 621 nm y luego 680 nm como inductor con intensidades que evocan iguales amplitudes de hiperpolarización. d Estímulo de prueba de 450 nm e inducción ante intensidad saturante de 621 nm. e con 511 nm antes y después de inducción con 680 nm de intensidad saturante. (cal. de 10 mV y marca de tiempo de 1 cps.).

inicial. Estos efectos aumentan con el tamaño de la hiperpolarización al estímulo inductor, y para amplitudes iguales, aquel evocado con 621 nm resulta más efectivo que con 680 nm (fig. 16c).

La persistencia de una espiga inicial frente a las diferentes condiciones de preadaptación, hace suponer que los transientes de hiperpolarización resultan de la superposición de dos fenómenos independientes. En un desarrollo experimental paralelo en nuestro laboratorio (Gutierrez et al., 1981, 1983), se estudió la participación de neuronas dopaminérgicas en la generación de respuestas de tipo-L a través, tanto de la aplicación tópica o sistémica de Haloperidol, como de inyecciones intraoculares de 6 OHDA según el método descrito por Alcayaga (1982). De acuerdo con los estudios de Dowling & Ehinger (1978) y de Hayashi (1980), las células horizontales más externas de la carpa son postsinápticas a terminales dopaminérgicos de neuronas interplexiformes.

La figura 17 muestra una selección de estos experimentos. En ella se observa la desaparición de la espiga de inicio, quedando sólo un transiente lento que se hace evidente por su abolición con las secuencias de inducción (fig. 17c,e). Aparece entonces demostrada la naturaleza doble de la actividad fásica de inicio que incluye un componente rápido dependiente de la acción de células interplexiformes participando en un paso de realimentación desde la capa plexiforme interna y un segundo que, por su dependencia del color, parece

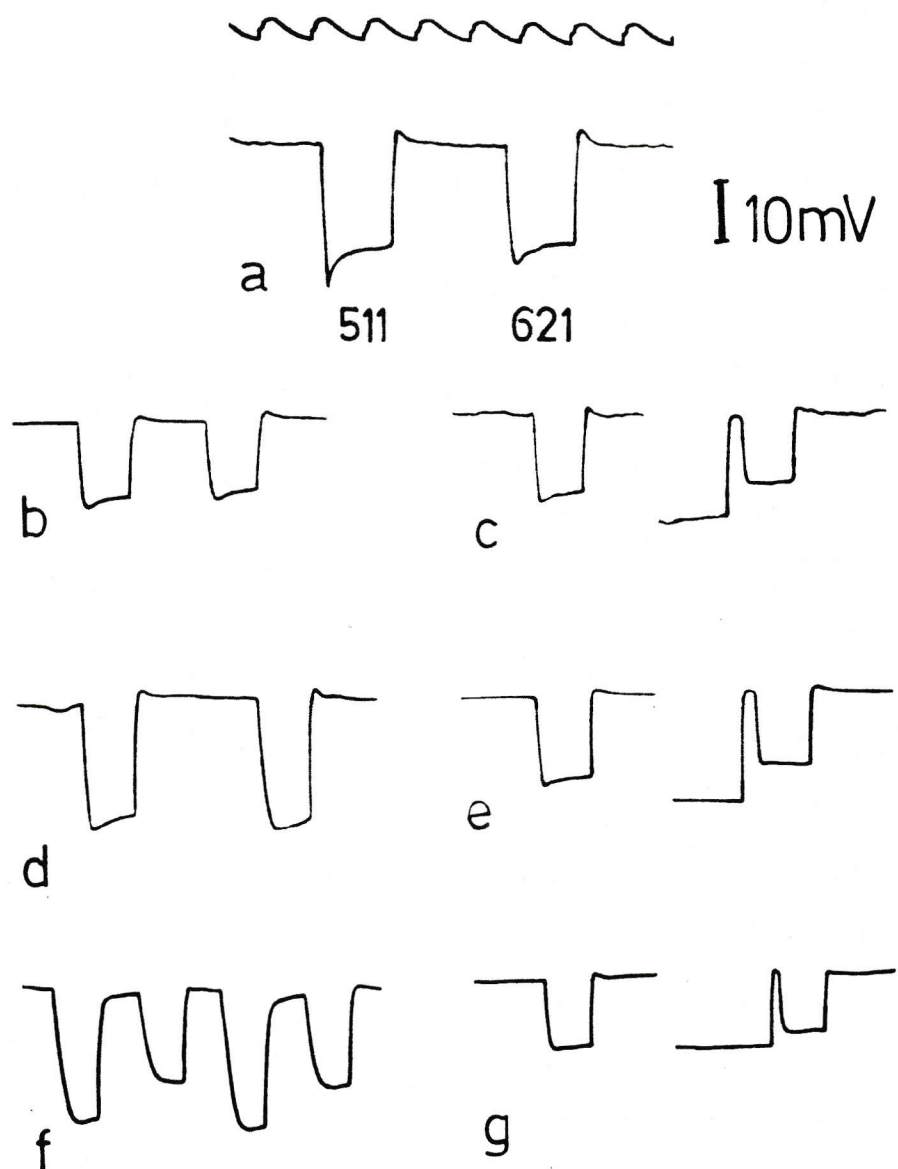


Fig. 17: Efecto de bloqueadores dopaminérgico. **a** Respuestas de amplitudes iguales frente a 621 nm y 511 nm (cal. 10 mV y marca de 1 cps). **b** Igual, después de tratamiento con haloperidol y **(c)** frente a estímulo de 511 nm, antes y después de inducción con 621 nm. **d, e** Lo mismo que en **b, c** pero en retina tratada con 6OHDA. **f** Efecto de doble aplicación de 6OHDA; respuestas alternadas a 511 nm y 621 nm, sólo distinguibles por su amplitud. **g** Sobre la misma preparación anterior, efecto de inducción de 621 nm sobre 405 nm.

involucrar interacciones entre poblaciones diferentes de conos.

Cabe preguntarse lo que ocurre a nivel de los fotoreceptores con las condiciones de estimulación que suprimen los transientes tardíos. Experimentos en que se varió el intervalo de oscuridad que separa ambos estímulos (fig.18), muestran que los efectos de la inducción se observan sólo en el primer segundo luego del cese de la luz de preadaptación. Esta duración sugiere la posible participación de un fenómeno de desensibilización como el descrito para conos de tortuga (Baylor & Hodgkin, 1974). Estos autores estudiaron el comportamiento de la fase de recuperación del potencial de oscuridad de conos, observando que esta aumenta en duración con la intensidad y va acompañada de una disminución de la sensibilidad. Con un estímulo de 10 ms y un flujo cuántico equivalente a 7×10^8 fotones. $\mu\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, para una longitud de onda (644 nm) cercana a la de sensibilidad máxima (630 nm), obtuvieron una fase de recuperación exponencial con una constante de tiempo de 3 s y, al disminuir la intensidad a 1.8×10^5 fotones. $\mu\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, ésta se redujo a 0.3 s. En nuestros experimentos se utilizaron estímulos de longitud de onda coincidente con la máxima sensibilidad de los conos rojos (620 nm) y un flujo de 1.5×10^6 fotones. $\mu\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. En estas condiciones los efectos aparecen restringidos a menos de un segundo. Aunque parece aventurado comparar conos de tortuga con horizontales de carpa, es dable pensar en la existencia de

fenómenos homólogos a nivel de los fotorreceptores, con dominios enmarcados dentro de los mismos órdenes de magnitud.

En la figura 18 se presenta un experimento donde se varió el intervalo postinductor entre 30 ms y 910 ms, seleccionando para mayor claridad una unidad que carece del componente temprano. Esta figura se obtuvo superponiendo respuestas a estímulos de prueba en secuencias sucesivas, cambiando cada vez el intervalo respecto al estímulo inductor. Con la ayuda del computador, estas respuestas grabadas en disco, fueron desplegadas en el osciloscopio haciendo coincidir el cese del estímulo de preadaptación con el inicio del barrido. El gráfico que acompaña, relaciona las amplitudes alcanzadas por cada una de ellas, 136 ms después del inicio de la luz de prueba, con la duración del intervalo que separa ambos estímulos. La curva resultante se asemeja a una exponencial simple con una constante de tiempo de aproximadamente 0.7 s, valor que está de acuerdo con la cinética de primer orden esperada según el modelo de la tortuga (Baylor et al., 1974). Este modelo supone la existencia de una cadena de reacciones asociadas a la remoción de los bloqueadores de canales de Na^+ que actúan durante la fotorrespuestas, de las cuales sólo las etapas más lentas, con constantes de tiempo de 10 s a 100 s, estarían ligadas al proceso de regeneración de fotorpigmento. Esto último sugiere que, para las intensidades aquí usadas, la degradación de pigmento no tiene una participación significativa en los fenómenos de inducción.

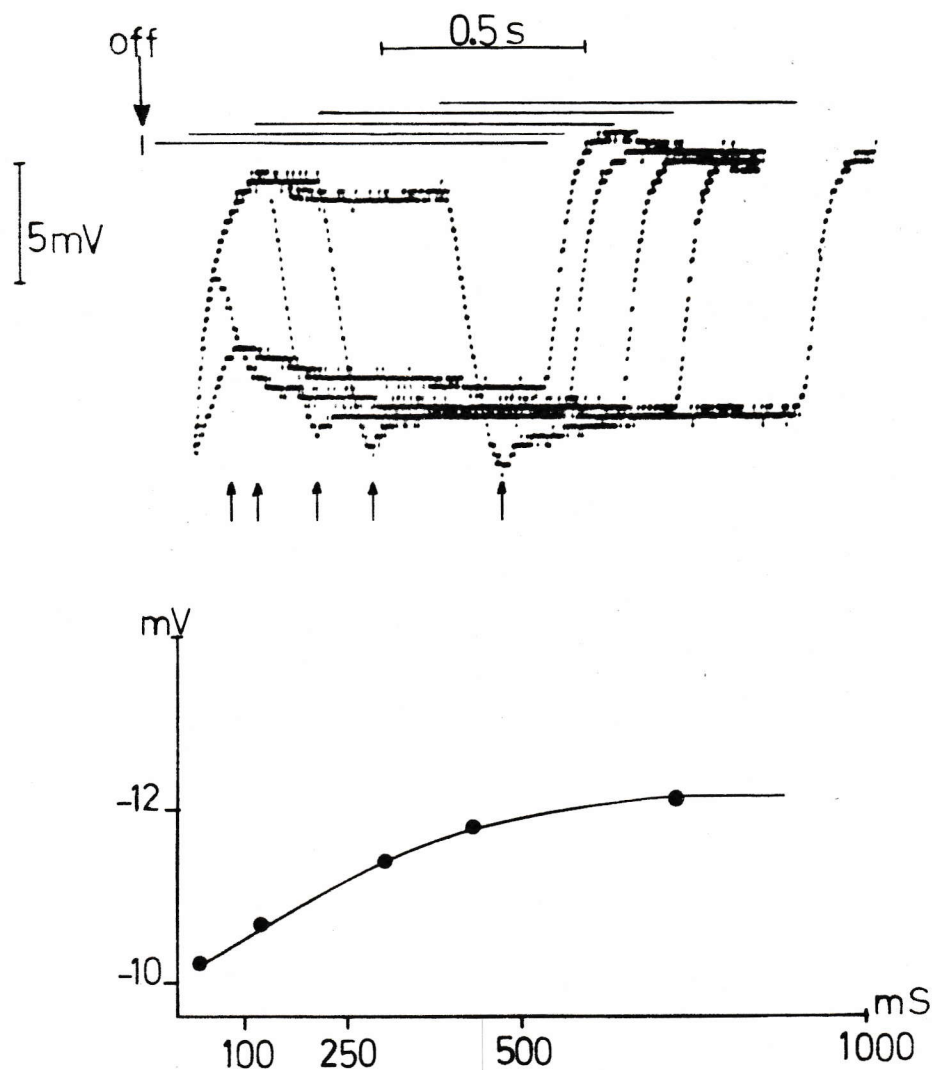


Fig. 18: Respuestas obtenidas a con estímulos de prueba de 520 nm, separados a diferentes intervalos del inductor (620 nm). Estas respuestas aparecen superpuestas haciendo coincidir el cese del estímulo de preadaptación (off). El gráfico muestra las amplitudes obtenidas a los 136 ms del inicio de la respuesta (flechas) para los diferentes intervalos probados. Los trazos horizontales sobre las respuestas indican los respectivos estímulos.

La desensibilización, según lo descrito para tortuga, acompaña al proceso de recuperación del potencial de oscuridad de los conos, en tanto que en las células horizontales de la carpa, el potencial se restablece antes que la sensibilidad. El experimento de la figura 19 permite aportar mayores antecedentes en este sentido. En este caso, se fijó el intervalo de oscuridad en 30 ms y se varió la intensidad del estímulo inductor, manteniendo constante el de prueba. Esta figura también se obtuvo por superposición de las respuestas en el osciloscopio, haciendo coincidir el término del estímulo inductor. En este caso, para mostrar el potencial evocado por la luz de adaptación, el barrido se inicia antes. El gráfico adjunto muestra la relación entre la intensidad del estímulo inductor y el decaimiento de la amplitud de la respuesta al estímulo de prueba (fig.19b), en una expresión aproximada de la caída de sensibilidad. Esta aparece como una función monótonica, concordando con lo descrito para el fenómeno de desensibilización de conos, y parece no ser influida por el curso de recuperación del potencial al cese. En efecto, las dos respuestas menos afectadas se inician desde potenciales idénticos pero alcanzan amplitudes diferentes. Por tanto, los cambios de sensibilidad inducidos, parecen ocurrir en un nivel previo a las células horizontales, y su recuperación no coincide con el transcurso temporal del cese de la respuesta al inductor.

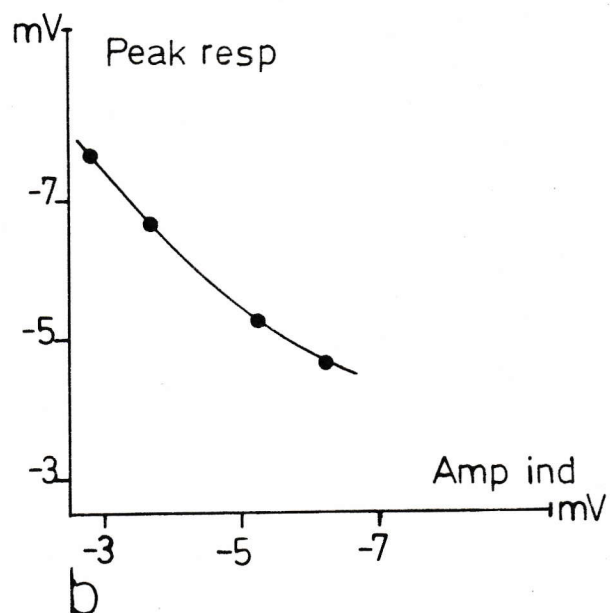
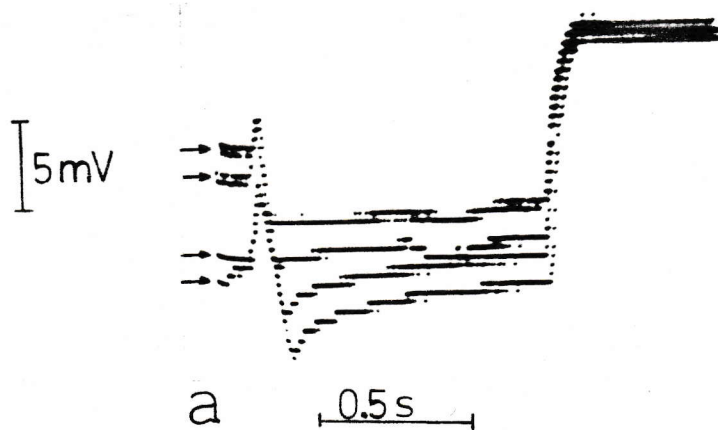


Fig. 19: **a** Superposición de respuestas (a 520 nm) obtenidas para intensidades crecientes del inductor (620 nm) y un intervalo de oscuridad de 30 ms. **b** Gráfico de amplitud de respuesta inducida medidas en el máximo (Peak resp) respecto a las amplitudes evocadas por el inductor (Amp ind) indicadas en **a** (flechas).

Existe otro hecho de mayor relevancia, cual es que la cinética de recuperación de la sensibilidad parece no afectar a la respuesta inducida una vez que esta ha alcanzado una amplitud sostenida; de no ser así, los potenciales evocados que se ilustran en la figura 19a deberían converger hacia un mismo nivel dentro del primer segundo estimado para la recuperación. La figura 18 muestra también que para los intervalos más breves tampoco hay convergencia. Un fenómeno de esta naturaleza puede involucrar mecanismos de gran complejidad que con toda probabilidad incluyen relaciones diferenciales entre poblaciones de conos.

Al respecto es interesante revisar en mayor detalle las dependencias cromáticas que subyacen este fenómeno de inducción. La figura 20 muestra un adecuado resumen de éstas; corresponde a registros obtenidos de una misma unidad, con una secuencia de inducción repetida para intervalos crecientes de oscuridad, intercambiando los filtros (505 nm y 620 nm) de los estímulos inductor y de prueba. En esta célula, aunque el transiente aparece muy marcado por el componente temprano, son siempre visibles los cambios de sensibilidad inducidos.

En concordancia con lo descrito para la figura 16, el efecto mayor se obtiene con un estímulo de inducción rojo, sobre respuestas al verde y, para los intervalos más breves, las respuestas inducidas se ven afectadas tanto en su amplitud como en la duración de su actividad transiente. Aunque en menor grado, también se observa inducción de verde sobre verde

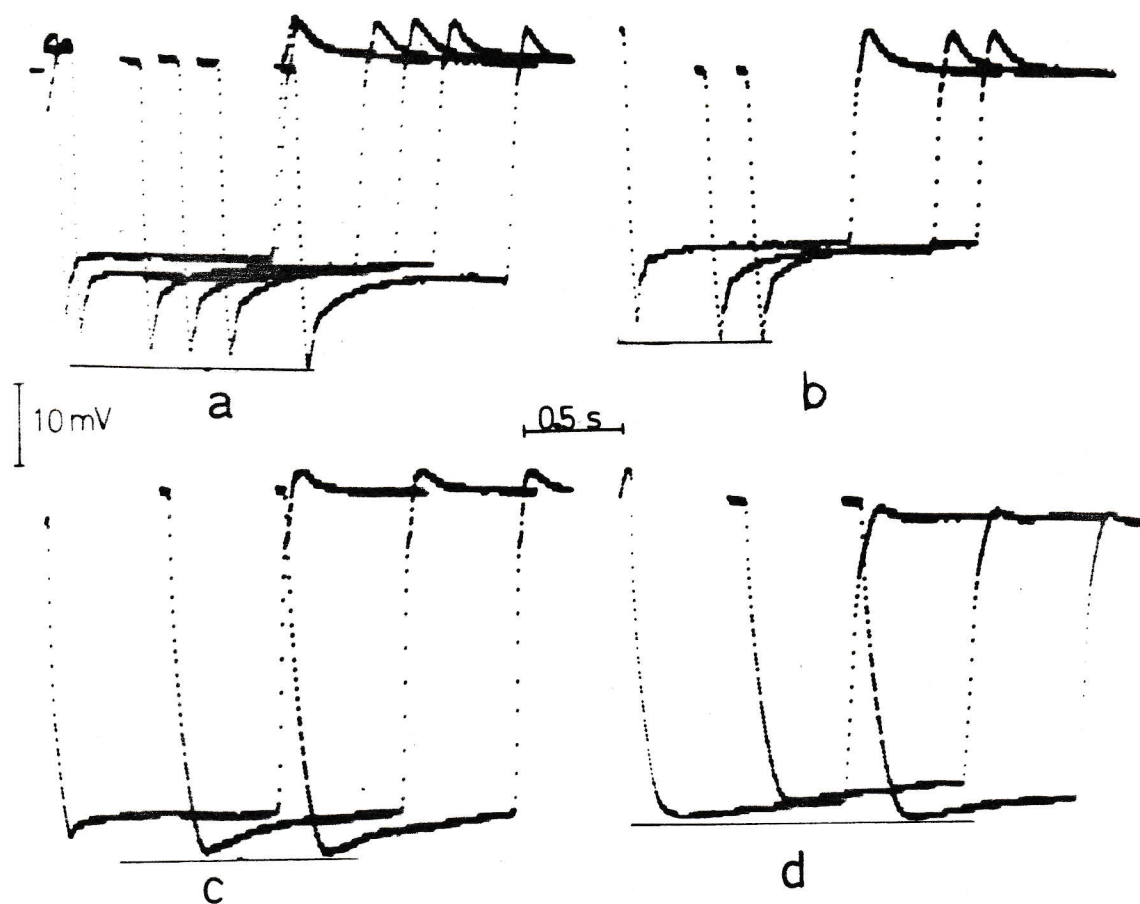


Fig. 20: Superposición de respuestas inducidas para diferentes combinaciones de colores. a Rojo (620 nm) sobre verde (520 nm), b verde-verde, c rojo-rojo y d verde sobre rojo. Para destacar los efectos de inducción aparecen trazos horizontales en coincidencia con el máximo de la respuesta mas separada del inductor.

(fig.20a), lo que está de acuerdo con el decaimiento paulatino observado en respuestas de larga duración para esta región del espectro. La situación en el rojo es diferente, como se ve cuando ambos estímulos son de este color (620 nm): sólo es afectado el transcurso de inicio, manteniéndose constante las amplitudes al cese. Esto está de acuerdo con la constancia observada en las hiperpolarizaciones evocadas por estímulos de larga duración en esta región del espectro. Por otra parte, cuando el inductor es verde, las respuestas de prueba al rojo, muestran sus cursos temporales inalterados y las amplitudes son sólo ligeramente afectadas: se observa primero una fase temprana de potenciación seguida por una de inhibición y una posterior recuperación.

Este comportamiento en relación con las longitudes de onda seleccionadas para los estímulos de prueba y de preadaptación, sugiere una disimetría en la conectividad asociada a ambos procesos. La actividad dominada por conos verdes aparece más sensible a la preadaptación y su actividad es menos persistente frente a estímulos de larga duración lo que estaría reflejando una menor capacidad de regulación frente a los cambios transientes de sensibilidad a nivel de estos conos. En unidades que no muestran el componente rápido de inicio, las repuestas al estímulo de prueba son aún más sensibles a la preadaptación, lo que sugiere un rol regulatorio de la realimentación mediada por neuronas interplexiformes, aparentemente más activas frente a luces de longitud

de onda media y corta, donde los transientes rápidos son mas prominentes. En contraposición, tanto la mayor persistencia de las respuestas al rojo como el carácter lento de su fase de inicio, tendrían que ver con una regulación mas efectiva y circunscrita a la plexiforme externa. Por esto, la preadaptación al verde fallaría en alterar el curso inicial de respuestas al rojo y los cambios en amplitud inducidos, tendrían que ver con la regulación a través de las interplexiformes, principalmente afectadas por el verde. Por otra parte, la preadaptación al rojo sólo afecta el curso temporal de las hiperpolarizaciones al mismo color, manteniéndose invariables las amplitudes sostenidas, lo que sería el resultado de una desregulación sólo transiente y mas bien a nivel de la capa plexiforme externa.

Esta proposición de disimetría permite también entender mejor las curvas I-R ya descritas, donde se reconoce la existencia de dos grupos: el primero mas sensible al verde, caracterizado por una conspicua actividad transiente y correspondiente a las curvas de mayor pendiente, mientras que el segundo, dominado por la actividad de conos rojos presenta poca actividad fásica, pendientes I-R menores y con inflexiones intermedias.

Conclusiones

Confirmando las expectativas basadas en los mèritos de la preparaciòn in vivo, podemos resumir las siguientes conclusiones relativas a la actividad monofàsica:

1.- Las cèlulas horizontales de tipo-L muestran una importante participaciòn de aferencias de conos verdes, ademàs de aquella generalmente reconocida de los conos rojos

2.-La distribuciòn espectral de componentes fàsicos muestra que los proceso sensibles al verde y al rojo involucran conectividades diferentes, lo que aparece reafirmado por la asimetrìa de los efectos de inducciòn.

3.- Los experimentos de inducciòn, en presencia y ausencia de bloqueadores dopaminèrgicos, revelan la naturaleza doble de los transientes de hiperpolarizaciòn al inicio de respuestas a longitudes de onda media y corta. Existe un primer componente temprano que depende de la acciòn de neuronas interplexiformes y uno lento que, de acuerdo con las dependencias a adaptaciones cromàticas, parece involucrar a las cèlulas de tipo-C

4.- Los experimentos de inducciòn con intervalos variables muestran que el potencial de cèlulas de tipo-L se recupera en forma mas ràpida que lo esperado para fotorreceptores y que la cinètica de recuperaciòn de la sensibilidad no se refleja en la respuesta inducida que mantiene su amplitud hasta el cese. Esto sugiere la

existencia de mecanismos compensatorios que, de acuerdo con el punto anterior, parece incluir la participación de células horizontales de tipo-C como mediadoras de las interacciones diferenciales entre conos.

D I S C U S I O N

La organización de la capa plexiforme externa de la retina es un problema aún no resuelto. A medida que aumenta el volumen de antecedentes acerca de la fisiología y anatomía de las células horizontales en una gran diversidad de especies, los esquemas tentativos de patrones de conectividad se suceden en una constante revisión (vease Ehinger, 1983). Aunque estos modelos permiten señalar la posible participación de nuevos elementos en la generación de los potenciales-S, persisten importantes interrogantes en cuanto a su significación funcional.

El desarrollo de nuestro paradigma experimental debe entenderse como un nuevo intento por aclarar el rol de las células horizontales en el contexto de la función visual. Considera, en primer lugar, el respeto por la integridad fisiológica de la retina, garantizando la preservación de los mecanismos de fototransducción y de las interacciones sinápticas. Los registros así obtenidos han revelado, en efecto, rasgos novedosos y de gran valor interpretativo. En segundo lugar y siempre buscando el contexto funcional, se ha preferido la estimulación con luz difusa, con el propósito de evocar actividad invariante a lo largo de las láminas constituidas por células horizontales de un mismo tipo, acopladas eléctricamente entre sí (Kaneko, 1971) y con propiedades de integración espacial de gran simplicidad (Naka, 1982). Por

último, el uso de sumas de colores en diferentes combinaciones temporales ha permitido, al ampliar el dominio de exploración de los potenciales-S, entregar nuevos antecedentes sobre el origen de la actividad de las células horizontales de tipo-C.

Un importante resultado ha sido comprobar, en las respuestas sostenidas de células horizontales, la existencia de componentes transientes con complejas dependencias espectrales. Estos componentes, como manifestación directa de las relaciones interneuronales, aportan nuevos criterios para una clasificación funcional de los diferentes tipos celulares. Una consecuencia inmediata es el reconocimiento de no más de dos tipos de unidades C, con espectro de acción de gran variabilidad, y de un solo tipo de unidades L.

Variabilidad de las células cromáticas

La gran dispersión que se observa entre los espectros de acción de células de tipo-C (fig.7), pone en duda su estructura laminar isotrópica, sugiriendo que no existen acoplamientos eléctricos entre células de este tipo. Cualquiera sea el rol específico de estas unidades en la discriminación cromática, es razonable esperar que no constituyan capas de actividad uniforme, pues esta función solo tiene sentido en cuanto segrega dominios diferenciales en el campo visual.

Similiar dispersión ha sido recientemente descrita para la población única de células horizontales de actividad oponente en un pez de retina dicromata (Burkhardt & Hassin 1983). En este caso de mayor simplicidad, las variaciones en los puntos neutros y máximos de sensibilidad, son explicadas por diferencias en los pesos relativos con que convergen las dos únicas poblaciones de conos. Esta explicación sería del todo razonable si no fuera por la regularidad del mosaico de fotorreceptores (Marc & Sperling, 1976) y por la distribución uniforme de contactos entre estos elementos y las células horizontales cromáticas, manifestada en la independencia del antagonismo respecto al area de estimulación (Burkhardt & Hassin, 1978).

Una proposición que permite superar esta incongruencia, es que los potenciales registrados son sólo una manifestación parcial de la forma en que estas unidades participan con el resto de la retina. Apoyando tal idea, están los resultados obtenidos con sumas de colores, donde quedan de manifiesto complejas dependencias, mas allá del signo y de la saturación de las respuestas.

Origen de la actividad cromática

Los resultados obtenidos con luces monocromáticas y mezclas de colores revelan que las acciones antagónicas no corresponden a la participación exclusiva y directa de ninguna de las poblaciones de fotorreceptores, sino que más bien

resultan de funciones espectrales de origen posterior. Por otra parte, el mecanismo de depolarización aparece circunscrito al rojo, lo que descarta una simple inhibición presináptica mediada por horizontales de tipo-L. Los fenómenos de pseudopigmentos que involucran interacciones antagónicas entre conos (Sirovich & Abramov, 1977), surgen como la explicación más plausible. De esta forma, la actividad de células de tipo-C podría ser generada por procesos a su vez dependientes de interacciones antagónicas previas, aunque éstas se han mostrado hasta ahora inaccesibles al microelectrodo.

Una alternativa razonable es que los fenómenos de pseudopigmento no se manifiestan en el dominio de los potenciales en ningún compartimento celular. Los experimentos realizados en tortuga, por ejemplo, sugieren la participación del ion Ca^{++} en la inhibición presináptica hacia conos, al mismo tiempo que modula la liberación del neurotransmisor desde los fotorreceptores. Esto hace esperar complejas interdependencias como las que se manifiestan en el fenómeno de oclusión (Gershenfeld & Piccolino, 1981). Un ejemplo similar ha sido descrito en peces: GABA, el neurotransmisor más probable de células horizontales de tipo-L, participa en la generación de respuestas de depolarización (Negishi & Drujan, 1969b) y depende a su vez de la presencia de glutamato liberado por los conos (Lam & Ayoub, 1983).

Aunque los antecedentes no son suficientes para basar una predicción cuantitativa de las funciones espectrales

que se podría generar a través de estas interdependencias, no se puede desconocer el hecho de que las células cromáticas dependen de procesos que no siempre se manifiestan en el potencial postsináptico y presentan características temporales que trascienden al cese del estímulo. Esta proposición, aunque incompleta, ofrece un sustrato más amplio para dar cuenta de las complejas propiedades de las células horizontales de tipo-C.

Acerca del rol funcional de células horizontales de tipo-L

Contrariamente a lo descrito para las unidades cromáticas, las células horizontales de tipo-L son más bien invariables en sus espectros de acción (vease fig.15cd), lo que es consistente con la existencia de acoplamiento eléctrico que las organiza en una lámina isotrópica. Esto hace que la actividad de unidades de tipo-L aparece como un fenómeno de distinta clase respecto a las cromáticas, participando en un rol funcional que va más allá de la codificación en pares oponentes.

Se ha visto que el curso temporal de las respuestas de células de tipo-L, depende fuertemente de la composición espectral del estímulo, lo que señala la participación de más de una población de fotorreceptores. La modalidad de esta participación es ilustrada por los experimentos de adaptación cromática, en los que se deprime la actividad de la población

de conos más afectada, resultando una acción relativa mayor del resto de los conos. De acuerdo con esto, los cambios en respuestas al verde, por inducción con rojo, aparecen asociados a una mayor participación relativa de los conos verdes. Según lo observado, esto se traduce en una inhibición de las respuestas inducidas, lo que demuestra la existencia de una acción de signo opuesto de parte de conos verdes. Esto significa a su vez que las células horizontales de tipo-L reciben influencias cromáticas con características que hacen pensar en las horizontales de tipo-C como mediadoras de esta acción.

En este contexto es importante revisar la relación de estas células con los elementos más proximales de la retina. Tanto en la carpa (Kaneko & Tachibana, 1983) como en el pez dorado (Kaneko, 1970, 1973), la actividad de las células bipolares, si bien aparece segregada en unidades con y sin color oponente, es dominada por una acción central de conos rojos. Estudios morfológicos revelan por su parte, que los procesos de bipolares se conectan preferentemente con estos mismos conos (Stell et al., 1967) y que las sinapsis directas con células horizontales se circunscriben a unidades de la capa más externa (Parthe, 1981), con toda probabilidad de tipo-L (Hashimoto et al., 1976). Por otra parte, la estimulación eléctrica de células de tipo-C, no modifica la actividad de bipolares vecinas (Toyoda & Tonosaki, 1978).

Estos antecedentes muestran a las células bipolares en relación directa sólo con conos rojos y horizontales de

tipo-L. Considerando que estas células de disposición radial son el canal obligado de la fotorrespuestas hacia elementos más proximales de la vía visual, es de esperar una intervención, aunque sea indirecta, de los conos verdes y azules. Stell & Lightfoot (1975) mostraron que estos conos son presinápticos sólo a horizontales cromáticas. En este contexto resulta enteramente razonable nuestra proposición de que las células horizontales de tipo-L reciben influencias de las de tipo-C, participando de esta manera en la actividad coloroponente que se observa en las células bipolares. En este esquema, la discriminación espectral se sobrepone como una dimensión adicional en el proceso de detección de objetos. Esta estrategia evolutiva aparece particularmente adecuada a las exigencias del medio visual de la carpa.

Problemas y adaptaciones de la visión subacuática

El mundo visible bajo el agua presenta un aspecto esencialmente diferente al conocido sobre la superficie: en todo su volumen se distribuye un gran número de formas vivientes que inciden directamente sobre sus propiedades ópticas, como la turbidez y el índice de dispersión. Además, las características de transmisividad del agua reducen el espectro de radiancia a una banda que se hace más estrecha con la profundidad. En un medio con estas características ópticas, la posibilidad de detectar objetos se ve reducida por la conjugación

de dos factores: el alto grado de turbidez, que atenúa rápidamente la luz con la distancia, y las reflexiones difusas que van sumando a la luz de fondo un espectro idéntico al de ésta, diluyendo la luz reflejada por el objeto con la consiguiente pérdida del contraste.

En el caso particular de los ciprinidos se configura una serie de rasgos reveladores en la adaptación a estos problemas. En estos peces existe una clara dominancia de los mecanismos sensibles al rojo: para el pez dorado todas las neuronas retinianas dependientes de conos son afectadas por la población sensible a longitudes de onda largas (Spekrijse et. al., 1972; Kaneko, 1973). Esta zona del espectro es de escasa intensidad bajo el agua, pero también lo es en cuanto a reflexiones difusas, por lo que cerca de la superficie, en el eje horizontal, la detección de objetos con espectro de reflectancia plano es acentuada por la reflexión de luz roja, pobre en el contorno. Frente a esto, la confluencia de procesos sensibles a longitudes de onda medias y cortas a través de unidades de actividad oponente, resulta altamente ventajosa, ya que permite controlar la banda espectral del sistema detector dominante y su eventual potenciación sin riesgo de saturación.

Rango dinámico y detección

El rango de iluminación en que operan los diferentes sistemas visuales, alcanza a más de siete unidades loga-

rítmicas, considerando desde la tenue luz de una noche sin luna hasta la de un día de sol radiante. Aunque la mayoría de los organismos no está activa dentro de tan amplio rango, éste supera en varios ordenes de magnitud al cubierto por el nervio óptico. Las células ganglionares, por limitaciones propias de la fisiología celular, no responden con más de 100 espigas en 100 ms (Kuffler, 1953). Es decir, una fibra del nervio óptico no puede transmitir más de 100 niveles discernibles en un intervalo de 100 ms, lo que se traduce en un rango dinámico restringido a dos unidades logarítmicas. La detección de objetos depende de la capacidad para discriminar superficies visibles más que de la valoración de la energía radiante, de manera que esta restricción, por coincidir con el rango de variaciones naturales de reflectancias, no debería incidir en una mayor limitación.

El proceso de detección visual se inicia con la fototransducción, que depende de la energía incidente. Luego del complejo sistema neuronal que es la retina, está el nervio óptico, cuya actividad refleja la forma en que los objetos visible modifican el espectro radiante. Este proceso de diferenciación resulta de las interacciones antagónicas entre las cadenas neuronales de disposición radial (fotoreceptor-bipolar-ganglionar) y las láminas tangenciales que integran la actividad de las primeras (horizontales y amacrinas). Esta particular organización se manifiesta en el desplazamiento sobre el eje de las intensidades, de las curvas I-R y de los

umbrales diferenciales de las neuronas radiales con las variaciones de iluminación de fondo. La actividad se mantiene así centrada en la zona de mayor sensibilidad diferencial (Byzov & Kuneszova, 1971).

En retinas monocromáticas, la acción directa de los fotorreceptores sobre las células bipolares es inhibida por las células horizontales, cuya actividad resulta de una integración sobre una área extensa. En este proceso, la respuesta de la célula bipolar refleja la diferencia entre la luz incidente en el centro de su campo receptivo y el nivel promedio de iluminación (Werblin, 1977; Srinivasan et al., 1982). El caso de las retinas tricromáticas reviste mayor complejidad; contrariamente a lo que se podría esperar, la acción de cada población de conos no es modulada por láminas de células horizontales con sensibilidades espectrales equivalentes. En la capa plexiforme externa de estas retinas, ocurre una segregación de la actividad en diferentes tipos de células horizontales. Como se ha visto, las de tipo-L o de luminosidad son responsables, esencialmente, de un proceso de integración, mientras que las de tipo-C o cromáticas responden a relaciones diferenciales de la actividad de conos con sensibilidades espectrales distintas, siendo sólo las horizontales de tipo-L las que interactúan directamente con las células bipolares.

De esta manera, en las retinas con sistemas de pigmentos múltiples, la actividad neuronal no sólo pesa por su magnitud, sino que también por el componente cromático que

depende de la particular ordenación de sus elementos en relación con las sensibilidades espectrales. En las interacciones antagónicas entre neuronas radiales y tangenciales, este componente interviene en la mantención de una cierta coherencia entre ambos elementos. La integración de la actividades de células de tipo-C y las de tipo-L consiste, pues, en que estas últimas son moduladas cromáticamente antes de ejercer su acción inhibitoria sobre la transmisión fotorreceptor-bipolar.

Comentarios finales

Los antecedentes acumulados en la presente tesis sitúan a la células horizontales de la capa en el contexto de la optimización del proceso de detección de objetos. En este enfoque original, la actividad cromática de la capa plexiforme externa aparece como una variable adicional, en adaptación a los problemas de la visión subacuática, y no como objeto visual en sí. A nuestro entender, el ver insistentemente a estas células como las responsables de un proceso de codificación cromática en pares oponentes con incidencia en la percepción del color, es un obstáculo importante en el avance de este campo (vease Vision Research 1983, num.11).

En el contexto propuesto, la organización centro-periferia de la color oponencia de neuronas retinianas de disposición radial, es la manifestación de la consistencia

cromática de la acción antagónica ejercida por los elementos tangenciales. De esta manera, para una detección diferencial, la actividad de las células bipolares y ganglionares es relativa a un entorno trivariante, es decir, dependiente de la actividad de las tres poblaciones de conos, y el carácter color oponente de estas unidades es resultado de la interacción diferencial centro periferia y no corresponde a una forma particular de codificación del canal en el que participan.

Por otra parte, el hecho de que las células horizontales de tipo-L son afectadas por la acción de unidades cromáticas, al mismo tiempo que aparecen involucradas en la generación de los pares oponentes de las tipo-C, sugiere que dentro del mismo compartimento celular pueden desarrollarse diferentes niveles de integración. Esto permitiría comprender la existencia de pseudopigmentos y otras funciones espectrales, en una distribución no isoelectrica del potencial de las células horizontales.

Un avance mayor, requiere de un estudio detallado de conectividad en que se pueda establecer claramente con qué elementos hacen sinapsis las células horizontales, especialmente las de tipo-C. La dificultad mayor radica en reconocer clases funcionales con el solo examen morfológico. En este sentido la marcación intracelular con peroxidasa (HRP) es una poderosa herramienta, pero su lenta difusión en heterotermos, le impide alcanzar las ramificaciones más finas y alejadas dentro de las tiempos impuestos por la preparación in vitro.

El desarrollo de la técnica de registros in vivo reduce este problema, ya que permite recuperar el animal después de una sesión de registros e inyecciones para esperar la migración transináptica del marcador; esto permitiría identificar circuitos neuronales asociados a la actividad registrada por el microelectrodo.

B I B L I O G R A F I A

- ALCAYAGA, J. (1982). Exploración electroretinográfica del sistema dopaminérgico de la retina de la carpa (Cyprinus carpio). TESIS DE LICENCIATURA, FACULTAD DE CIENCIAS BB. Y FF., U. DE CHILE.
- BARLOW, M. B. (1980). Critical limiting factors in the design of the eye and visual cortex. The Ferrier lecture, 1980. Proc. Roy. Soc. Lond. 212, 1186 - 1194.
- BAYLOR, D.A. & FUORTES, M.G.F. (1970). Electrical responses of single cones in the retina of the turtle. J. Physiol. (Lond.) 207, 77 - 92.
- BAYLOR, D.A., FUORTES, M.G.F & O'BRYAN, P.M. (1971). Receptive fields of cones in the retina of the turtle. J. Physiol. (Lond.) 214, 265 - 294.
- BAYLOR, D. A. & HODGKIN, A. L. (1974). Changes in time scale and sensitivity in turtle photoreceptors. J. Physiol. (Lond.) 242, 729 - 758.
- BAYLOR, D. A., HODGKIN, A. L. & LAMB, T. D. (1974). The electrical response of turtle cones to flashes and steps of lights. J. Physiol. (Lond.) 242, 685 - 727.
- BLATZ, P. E. & LIEBMAN P. A. (1973). Wavelength regulation in visual pigments. Expl. Eye Res. 17, 573 - 580.

- BURKHARDT, D.A. & HASSIN, G. (1978). Influences of cones upon chromatic and luminosity-type horizontal cells in pikeperch retinas. J. Physiol. (Lond.) 281, 125 - 137.
- BURKHARDT, D. A. & HASSIN, G. (1983). Quantitative relations between color-opponent response of horizontal cells and action spectra of cones. J. Neurophysiol. 49, 961 - 975.
- BYZOV, A. L., GOLUBTZOV, K. V. & TRIFONOV, Y.A. (1977). The model of mechanism of feedback between horizontal cells and photoreceptors in vertebrate retina. In "Vertebrate Photoreception", ed. Barlow, H.B. & Fatt, P., Academic Press INC. (Lond.) 265 - 274.
- BYZOV, A. L. & KUSNEZOVA, L. P. (1971). On the mechanisms of visual adaptation. Vision Res. Suppl. 3, 51 - 63.
- CERVETTO L. & Mac NICHOL, E.F., Jr. (1972). Inactivation of horizontal cells in turtle retina by glutamate and aspartate. Science N.Y. 178, 767 - 768.
- CERVETTO, L. & PICCOLINO, M. (1975). Mechanism of synaptic transmission in the vertebrate retina. Golgi Centennial Symposium, ed. M. Santini, Raven Press, N. Y., 577 - 581.
- CHAN, R. Y. & NAKA, K. I. (1976). The amacrine cell Vision Res. 16, 1119 - 1129.

- DAW, N. W. (1968). Colour-coded ganglion cells in the goldfish retina: extension of their receptive field by means of new stimuli. J. Physiol. (Lond.) 197, 567 - 592.
- DE VALOIS, R. L., SMITH, C. J., KITAI, S. T. & KARDLY, A. J. (1958). Response of single cells in monkey lateral geniculate nucleus to monochromatic light. Science N.Y. 127, 238 - 239.
- DJAMGOZ, M.B.A., REYNOLDS, S.H., ROWE, J.S. & RUDDOCK, K.H. (1981). Control of retinal S-potentials in dark adapted and bleached retinae. Vision Res. 21, 1581 - 1584.
- DOWLING, J.E. & EHINGER, B. (1978). The interplexiform cell system. I Synapses of the dopaminergic neurons of the goldfish retina. Proc. Roy. Soc. Lond. B. 201, 7 - 26.
- DOWLING, J. E. & RIPPS, H. (1973). Effect of magnesium on the horizontal cell activity in the skate retina. Nature (Lond.) 242, 101 - 103.
- EASTER, S. S. Jr. (1975). Retinal specializations for aquatic vision: theory and facts. In "Vision in Fishes", ed. Ali, M. A., Plenum Press N.Y. & Lond., 609 - 618.
- EBREY, T. G. & HONIG, B. (1977). New wavelength dependent visual pigment nomograms. Vision Res. 17, 147 - 152.
- EHINGER, B. (1983). Connexions between retinal neurons with identified neurotransmitters. Vision Res. 23, 1281 - 1291.

- FUORTES, M.G.F. & SIMON, F.J. (1974). Interactions leading to horizontal cell responses in the turtle. J. Physiol. (Lond.). 240, 177 - 198.
- GALLEGO, A. (1971). Horizontal and amacrine cells in the mammal's retina. Vision Res. 11 (Suppl. 3), 33 - 50.
- GERSCHENFELD, H.M. & PICCOLINO, M. (1980). Sustained feedback effect of L-horizontal cells on turtle cones. Proc. Roy. Soc. Lond. B. 206, 465 - 480.
- GERSCHENFELD, H. M., PICCOLINO, M. & NEYTON, J. (1980). Feedback modulation of cone synapses by L-horizontal cells of the turtle retina. J. Exp. Biol. 89, 177 - 193.
- GOURAS, P. (1968). Identification of cone mechanism in the monkey ganglion cells. J. Physiol. 199, 533 - 547.
- GUTIERREZ, O., NEELY, A. & SALINAS, R. (1981). The dopaminergic system of retina of *Cyprinus carpio*. Intracellular recordings in situ (Abstract). Arch. Biol. Med. Exp. 14, 264.
- GUTIERREZ, O., NEELY, A. & SALINAS, R. (1983). The horizontal system of the carp retina. Transients reveal chromatic influences on L-units with participation of interplexiform cells. Arch. Biol. Med. Exp. 16, 271 - 281.

- GUTIERREZ, D. & SALINAS, R. (1984). A simple device to aid impalement of cells using conventional microelectrode drives. Physiol. & Behav. (in press).
- HAGINS, W. A. & YOSHIKAMI, S. (1977). Intracellular transmission in photoreceptors: Electrical effects of chelating agents introduced to rod by vesicle fusion. In "Vertebrate Photoreception", ed. Barlow, H.B. & Fatt, P., Academic Press Inc (Lond.) 97 - 138.
- HARDSI, F.I. (1976). Spectral relations of cone pigments in goldfish. J. Gen. Physiol. 68, 65 - 80.
- HASHIMOTO, Y., KATO, A., INOKUCHI, M. & WATANABE, K. (1976). Re-examination of horizontal cells in the carp retina with Procion Yellow electrode. Vision Res. 16, 25 - 29.
- HAYASHI, T. (1980). Histochemical localization of dopamine and acetylcholinesterase activity in the carp (*Cyprinus carpio*) retina. Acta Histochem. Cytochem. 13, 330 - 342.
- HEDDEN, Jr., W. L. & DOWLING, J. E. (1978). The interplexiform cell system II. Effects of dopamine on goldfish retinal neurones. Proc. Roy. Soc. Lond. B. 201, 27 - 55.
- HUBEL, D. H. & WIESEL, T. N. (1960). Receptive fields of optic fibres in the spider monkey. J. Physiol. 154, 572 - 580.

- JACOBSON, M. & GAZE, R. M. (1960). Types of visual response from single units in the optic tectum and optic nerves of the goldfish. Quart. J. Exptl. Physiol. 49, 199 - 209.
- JAMESON, D. & HURVICH L. M. (1955). Some quantitative aspects of an opponent-colors theory. I Chromatic responses and spectral saturation. J. Opt. Soc. Am. 45, 546 - 552.
- JOHNSTON, D. & LAM, D. M. K. (1981). Regenerative and passive membrane properties of isolated horizontal cells from a teleost retina. Nature (Lond.) 292, 451 - 454.
- KANEKO, A. (1970). Physiological and morphological identification of horizontal, bipolar and amacrine cells in goldfish retina. J. Physiol. (Lond.) 207, 623 - 633.
- KANEKO, A. (1971). Electrical connections between horizontal cells in the dogfish retina. J. Physiol. (Lond) 213, 95 - 105.
- KANEKO, A. (1973). Receptive organization of bipolar and amacrine cells in the goldfish retina. J. Physiol. 235, 133 - 153.
- KANEKO, A. & HASHIMOTO, A. (1969). Electrophysiological study of single neurons in the inner nuclear layer of the carp retina. Vision Res. 9, 37 - 55.

- KANEKO, A. & TACHIBANA, M. (1983). Double color-opponent receptive field of carp bipolar cells. Vision Res. 23, 381 - 388.
- KANEKO, A. & YAMADA, M. (1972). S-potentials in the dark-adapted retina of the carp. J. Physiol. (Lond.) 227, 261 - 273.
- KUFFLER, S. W. (1953). Discharge pattern and functional organization of mammalian retina. J. Neurophysiol. 16, 37 - 68.
- LAM, D. M. & AYOUB, G. (1983). Biochemical and biophysical studies of isolated horizontal cells from the teleost retina. Vision Res. 23, 433 - 441.
- LASATER, E. M. & DOWLING, J. E. (1982). Carp horizontal cells in culture respond selectively to L-Glutamate and its agonists. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 79, 936 - 940.
- LAUFER, M., MILLAN, E. E. & VANEGAS, H. (1971). Spectral sensitivity of L-type S-Potentials in teleost retina. Vision Res. Suppl. 3, 77 - 86.
- LEVINE, J. S. & Mac NICHOL, E.F. (1982). The blue, green and near infrared environment of fishes are due to the evolution of the eye. Scient. Am. 246, 108 - 117.

- LOEW, E. R. & LYTHGOE, J. N. (1978). The ecology of cones pigments in teleost fishes. Vision Res. 18, 715 - 722.
- LYTHGOE, J. N. (1975). Problems of seeing colours underwater. In "Vision in Fishes". ed. Ali, M. A. Plenum press N.Y. & Lond. 619 - 634.
- MacNICHOL Jr., E. F. & SVAETICHIN, G. (1958). Electric responses from the isolated retina of fishes. Am. J. Ophthalmol. 46, 26 - 46.
- MARC, R. E. & LAM, D.M.K. (1981). Uptake of aspartic and glutamic acid by photoreceptors in goldfish retina. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 78, 7185 - 7189.
- MARC, R. E. & SPERLING, H. G. (1976). The chromatic organization of the goldfish cone mosaic. Vision Res. 16, 1211 - 1224.
- MARKS, W.B. (1975). Visual pigments of single goldfish cones. J. Physiol. (Lond.) 178, 14 - 32.
- MARMARELIS, P. Z. & NAKA, K. I. (1973). Non linear analysis and synthesis of receptive-field responses in the catfish retina III. Two input white noise analysis. J. Neurophysiol. 36, 634 - 648.
- MARROCO, R. T. (1972). Responses of monkey optic tract fibres to monochromatic light. Vision Res. 12, 1169 - 1174.

- MARSHALL, L. M. & WERBLIN, F. S. (1978). Synaptic transmission to the horizontal cells in the retina of the larval tiger salamander. J. Physiol. 279, 321 - 346.
- MICHAEL, C. R. (1978). Color-sensitive complex cells in monkey striate cortex. J. Neurophysiol. 41, 1250 - 1266.
- MILLER, R. F. (1978). Low sodium uncouples electrotonic connections between horizontal cells. Brain Res. 139, 178 - 182.
- MITARAI, G., ASANO, T. & MIYAKE, Y. (1974). Identification of five types of S-potentials and their corresponding generating sites in the horizontal cells of the carp retina. Jap. J. Ophthalmol. 18, 161 - 176.
- NAKA, K. I. (1982). The cells horizontal cells talk to. Vision Res. 22, 653 - 660.
- NAKA, K. I. & RUSHTON, W. A. H. (1966a). S-Potential from color units in the retina of fish. J. Physiol. (Lond.) 185, 536 - 555.
- NAKA, K. I. & RUSHTON, W. A. H. (1966b). An attempt to analyse colour reception by electrophysiology. J. Physiol. (Lond.) 185, 556 - 586.
- NAKA, K. I. & RUSHTON, W.A.H. (1966c). S-potentials from luminosity units in the retina of fish (Cyprinidae). J. Physiol. (Lond.) 185, 587 - 599.

- NAKA, K. I. & RUSHTON, W.A.H. (1967). The generation and spread of S-potentials in the fish (Cyprinidae). J. Physiol. (Lond.) 192, 437 - 461.
- NEGISHI, K. (1971). Reduction and enhancement of S-Potential observed with simultaneous light stimuli in isolated fish retina. Vision Res. Suppl. 3, 65 - 76.
- NEGISHI, K. & DRUJAN, B.D. (1978). Effect of catecholamines on the horizontal cell in the fish retina. Sensory Process. 2, 388 - 334.
- NEGISHI, K. & DRUJAN, B.D. (1979a). Effects of catecholamines and related compounds on horizontal cells in the fish retina. J. Neurosc. Res. 4, 311 - 334.
- NEGISHI, K. & DRUJAN, B. D. (1979b). Effects of some aminoacids on the horizontal cell in the fish retina. J. Neurosc. Res. 4, 351 - 363.
- NORTON, A. L., SPERKREIJSE, H. WOLBARSHT, M. L. & WAGNER, H. J. (1978). Receptive field organization of the S-potential. Science, N.Y. 160, 1021 - 1022.
- O'BRYAN, P. M. (1973). Properties of the depolarizing synaptic potential evoked by peripheral illumination in cones of the turtle retina. J. Physiol. (Lond.) 235, 207 - 223.

- PARTHE, V. (1981). Horizontal cell processes in teleost retina. J. Neurosc. Res. 6, 113 - 118.
- PICCOLINO, M., NEYTON, J. & GERSCHENFELD, H.M. (1980). Synaptic mechanisms involved in the responses of the chromaticity horizontal cells of the turtle retina. Nature, Lond. 284, 58 - 60.
- RAVIOLA, E. & GIGULA, N. B. (1975). Intramembrane organization of specialized contact on the outer plexiform layer of the retina. J. Cell Biol. 65, 192 - 222.
- RUDDOCK, K. H. & SVAETICHIN, G. (1974). The effect of maintained light stimulation on S-potentials recorded from the retina of teleost fish. J. Physiol. 244, 569 - 588.
- SAKAI, H. & NAKA, K. I. (1983). Synaptic organization involving receptor, horizontal and on- and off-center bipolar cells in the catfish retina. Vision Res. 23, 339 - 352.
- SCOTT, W. B. & GROSSMAN, E. J. (1973). Freshwater fishes of Canada. Res. Board of Canada bull. 184.
- SHAEFFER, S. F., RAVIOLA, E. & HEUSER, J. E. (1982). Membrane specializations in the outer plexiform layer of the turtle retina. J. Comp. Neurol. 204, 253 - 267.
- SHEFNER, J.H. & LEVINE, M.W. (1976). A psychophysical demonstration of goldfish trichromacy. Vision Res. 16, 671 - 673.

- SHIGEMATZU, Y., YAMADA, M. & FUWA, M. (1978). Latency measurement of the color coded S-Potentials in the carp retina. Vision Res. 18, 1435 - 1438.
- SIMON, E.J. (1973). Two types of luminosity horizontal cells in the retina of the turtle. J. Physiol. (Lond.) 230, 199 - 211.
- SIROVICH, L. & ABRAMOV, I. (1977). Photopigment and pseudopigments. Vision Res. 17, 5 - 16.
- SPEKREIJSE, H. & NORTON, A. L. (1970). The dynamic characteristics of color-coded S-potentials. J. Gen. Physiol. 56, 1 - 15.
- SPEKREIJSE, H., WAGNER, H. G. & WOLBARSH, M. L. (1972). Spectral and spatial coding of ganglion cell responses in goldfish retina. J. Neurophysiol. 35, 76 - 83.
- SRINIVASAN, M.V., LAUGHLIN, S.B. & DUBBS, A. (1982). Predictive coding: a fresh view of inhibition in the retina. Proc. Roy. Soc. Lond. B. 216, 427 - 459.
- STELL, W. K. (1967). The structure and relationships of horizontal cell and photoreceptor-bipolar synaptic complex in goldfish retina. Am. J. Anat. 120, 401 - 424.

- STELL, W. K. & LIGHTFOOT, D. O. (1975). Color-specific interconnection of cones and horizontal cells in the retina of the goldfish. J. Comp. Neurol. 159, 473 - 495.
- STELL, W.K., LIGHTFOOT, D.O. & WEELER, T.G. (1975). Goldfish retina: Functional polarization of cone horizontal cell dendrites and synapses. Science, N.Y. 190, 989 - 990.
- SVAETICHIN, G. (1953). The cone action potential. Acta Physiol. Scand. suppl. 106, 565.
- SVAETICHIN, G. & Mac NICHOL, E. F. (1958). Retinal mechanism for chromatic and achromatic vision. Ann. N.Y. Acad. Sci. 54, 385 - 404.
- TACHIBANA, M. (1981). Membrane properties of solitary horizontal cells isolated from goldfish retina. J. Physiol. (Lond.) 321, 141 - 161.
- TERANISHI, T., NEGISHI, K. & KATO, S. (1983). Dopamine modulates S-potential amplitude and dye-coupling between external horizontal cells in carp retina. Nature, Lond 301, 243 - 246.
- TOMITA, T. (1965). Electrophysiological study of the mechanisms subserving color coding in the fish retina. Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol. 30, 559 - 566.
- TOMITA, T. (1970). Electrical activity of vertebrate photoreceptors. Q. Rev. Biophys. 3, 179 - 222.

- TOMITA, T., KANEKO, A., MURAKAMI, M. & PAUTLER, E.L. (1967). Spectral responses curves of single cones in the carp. Vision Res. 7, 519 - 531.
- TOYODA, J., FUJIMOTO, M. & SAITO, T. (1977). Responses of second order neurons to photic and electrical stimulation of the retina. In "Vertebrate Photoreception", ed. Barlow, N.B. & Fatt, P., Academic press Inc. (Lond.) 231 - 249.
- TOYODA, J. & TONOSAKI, K. (1978). Effects of polarization of horizontal cells on the on-center bipolar-cell of carp retina. Nature (Lond.) 276, 399 - 401.
- TRIFONOV, Y. A., BYZOV, A. L. & CHALAIKHYAN, L. M. (1974). Electrical properties of subsynaptic and nonsynaptic membranes of horizontal cells in fish. Vision Res. 14, 229 - 241.
- WALOGA, G. & PACK, W. L. (1978). Ionic mechanism for the generation of horizontal cell potential in isolated axolotl retina. J. Gen. Physiol. 71, 69 - 92.
- WERBLIN, F. S. (1975). Anomalous rectification in horizontal cells. J. Physiol. 244, 639 - 657.

- WERBLIN, F. S. (1977). Synaptic interaction mediating bipolar response in the retina of the tiger salamander. In "Vertebrate Photoreception", ed. Barlow, N. B. & Fatt, P., Academic Press INC. (Lond.) 205 - 230.
- WERBLIN, F. S. & DOWLING, J. E. (1969). Organization of the retina of the mudpuppy, Necturus maculosus. II Intracellular recording. J. Neurophysiol. 32, 339 - 355.
- WHEELER, T. G. & NAKA, K. I. (1977). The modes of chromatic interactions in the retina. Vision Res. 17, 1015 - 1018.
- WITKOVSKI, P. (1967). A comparison of ganglion cell and S-potential response properties in carp retina. J. Neurophysiol. 30, 546 - 561.
- WITKOVSKI, P. & DOWLING, J.E. (1969). Synaptic relationships in the plexiform layers of carp retina. Z. Zellforsch. 100, 60 - 82.
- WU, S. & DOWLING, J.E. (1973). L-aspartate. Evidence for a role in cone photoreceptor synaptic transmission in carp retina. Proc. Nat. Acad. Sce. U.S. 75, 5205 - 5210.
- YANG, X. L., TAUCHI, M. & KANEKO, A. (1983). Convergence of signals from red-sensitive and green-sensitive cones onto L-type horizontal cells of the goldfish retina. Vision Res. 23, 371 - 380.