

Fisiologia sensoriale: Si prende il sistema biologico, si va a studiare le componenti più piccole e si va a capire l'organizzazione del sistema nelle componenti più piccole per capire come funzionano i sottosistemi un po' più grandi (bottom-up).

Psicofisica e psicologia sperimentale: Approccio top-down, perturbazione del sistema tutto intero e osservazione delle reazioni.

Caratteristiche dei recettori:

Specificità: Specializzati per una data modalità sensoriale, per una gamma ristretta dello stimolo.

Sensibilità: Risponde anche a stimoli di piccola intensità, a volte ai limiti fisici.

Es. Coni della retina, il cono rosso non ha il picco di sensibilità nel rosso ma è quello che risponde di più al rosso.

Processo di trasduzione dello stimolo: Trasformazione di uno stimolo in un'altro stimolo di differente natura.

Processo di amplificazione: spesso la trasduzione genera una variazione chimica nella cellula molto piccola, serve un'amplificazione del segnale trasdotto, i meccanismi variano molto da recettore a recettore, alcuni amplificano moltissimo come i bastoncelli e i recettori olfattivi. Una volta trasdotto e amplificato il segnale deve essere comunicato al sistema nervoso tramite sinapsi.

Curva di tuning: L'informazione ricevuta da un singolo fotorecettore è sempre ambigua, non si può ricostruire lo stimolo che ha generato il segnale osservando ad esempio solo i coni di una tipologia. Caratteristica comune a tutti i recettori. Può accadere anche che il segnale sia causato da uno stimolo diverso da quello per cui è specifico il recettore (es. i fotorecettori possono rispondere anche a stimoli meccanici). Nella retina il problema della specificità è risolto inserendo più tipi di recettori con curve di tuning diverse. Assumere che il rapporto tra l'attivazione dei fotorecettori si mantenga costante al variare dell'intensità luminosa mantenendo costante la lunghezza d'onda implica che la risposta all'intensità sia lineare, molto raramente è così.

Codifica di popolazione: Metodo di codifica estremamente usato nel sistema nervoso.

Limiti della codifica di popolazione: Nella realtà gli stimoli non sono mai monocromatici (tranne i laser). Stimoli policromatici possono produrre lo stesso segnale con combinazioni molto diverse di intensità delle varie lunghezze d'onda, processo sfruttato nel sistema RGB (**metamerismo**).

Il sistema alternativo è il sistema a linee dedicate, in cui serve un recettore per ogni singola lunghezza d'onda con una curva di tuning molto stretta, in questo caso sarebbe possibile fare un'analisi spettrale molto precisa. Ciò avrebbe portato ad una complessità della retina e dei circuiti associati probabilmente insostenibile.

Funzione psicometrica: Rapporto tra intensità dello stimolo e intensità percepita.

Il valore di intensità dello stimolo percepita dal 50% della popolazione prende il nome di **soglia percettiva assoluta**, misurata in assenza di stimolo di background.

La soglia misurata in presenza di background invece si chiama **soglia differenziale**.

Legge di Weber: Se si aumenta il background la soglia differenziale aumenta proporzionalmente secondo un fattore detto costante di Weber. (legge empirica).

La legge di Weber non è sempre valida, se lo fosse basterebbe abbassare il background per ottenere una soglia che tende a 0. In realtà per stimoli molto piccoli il rumore di fondo impedisce il discernimento del segnale e per stimoli molto forti il recettore o le vie che trasportano il segnale vanno in saturazione.

La valutazione psicometrica ha difetti: dipende dal soggetto di prova. Per evitare le variazioni dovute all'umore si applica la tecnica della scelta forzata, costringendo il soggetto a rispondere sempre.

Codifica dell'intensità dello stimolo e adattamento:

Alcuni recettori trasducono direttamente in uno stimolo nervoso. La frequenza delle scariche aumenta con l'intensità dello stimolo. Si può avere lento adattamento (informazione statica) o rapido adattamento (informazione dinamica). L'adattamento interessa tutti i recettori, alcuni adattano poco, ma mai zero.

Alcuni recettori non generano potenziali d'azione ma variano il loro potenziale di membrana (es. fotorecettori). Anche il fotorecettore presenta adattamento, un aumento dello stimolo causa un picco (negativo) del segnale seguito da un piccolo ritorno verso il potenziale iniziale.

L'adattamento è fondamentale per evidenziare le novità, ovvero i cambiamenti negli stimoli.

Campionamento:

Compromesso tra la densità spaziale dei recettori e la complessità della circuiteria necessaria all'elaborazione del segnale. I sensi devono essere sufficientemente precisi da distinguere una preda da un predatore ma abbastanza semplici da limitare la complessità e quindi l'ingombro ed il consumo energetico del sistema di elaborazione. Es. sensibilità tattile molto precisa sui polpastrelli, più grossolana sulla schiena.

Convergenza: Se si disponessero i recettori lontani tra loro avremmo zone funzionalmente cieche, invece se si fanno convergere i segnali di più recettori su un numero minore di neuroni di second'ordine si semplifica il circuito senza generare zone cieche.

Aliasing: I recettori devono campionare lo spazio sensoriale ad intervalli adeguati a rappresentare fedelmente le frequenze tipiche degli stimoli. Succede quando la lunghezza d'onda dello stimolo (la distanza tra i picchi, possono essere ad esempio bande in un'immagine o punte di un pettine) approssima la distanza tra i recettori (tecnicamente il doppio della distanza tra recettori).

Perché non percepiamo l'aliasing? Nell'occhio la soluzione è fornita dalla leggera sfocatura dell'immagine dovuta alle imperfezioni dell'occhio. Nella percezione tattile dalla rigidità dell'epidermide: irregolarità la cui distanza approssima la distanza tra recettori l'epidermide non può formare una singola indentazione per ogni sporgenza della superficie, così si eliminano le frequenze alte che genererebbero segnali aberranti.

Un'altra soluzione è la convergenza: facendo convergere più recettori sugli stessi neuroni post-sinaptici si eliminano ugualmente le frequenze alte aberranti.

La retina in realtà presenta una densità di coni blu inferiore, si riesce infatti a generare aliasing usando pattern blu in un soggetto con vista buona.

Parallelamente alla convergenza si ha anche divergenza quando è necessario notificare uno stimolo a più sistemi neuronali diversi.

L'adattamento avviene a livello neuronale piuttosto che recettoriale (?).

Eliminazione del Rumore: generato dai processi biologici che possono sovrastare la trasduzione generata da stimoli deboli generando falsi positivi (NdA e falsi negativi). Una possibilità per ridurre il rumore è la convergenza (facendo la media del segnale proveniente da più recettori si riduce il rumore perché ha natura additiva ed essendo casuale la sua distribuzione è una gaussiana con media 0). Altra strategia simile è la coincidenza dell'attivazione di più recettori.

La Visione

Non comparare troppo rigidamente l'occhio umano ad una macchina fotografica!

Nelle macchine la distribuzione dei fotositi è uniforme, nell'occhio umano la "risoluzione" è più alta al centro del campo visivo rispetto alla periferia. In realtà la distribuzione di coni e bastoncelli è uniforme ma la retina periferica presenta una convergenza maggiore.

Alcuni animali hanno retine uniformi, ad esempio i topi, in questi animali i movimenti oculari sono molto ridotti rispetto all'uomo.

Adattamento alla luce: è necessario adattare la sensibilità alla luce per evitare di saturare i neuroni a qualche punto della catena percettiva. L'adattamento alla luce non è un fenomeno globale ma avviene in maniera locale.

Nesso tra movimento e percezione: La percezione del mondo scaturisce dall'integrazione di informazioni visive e motorie. Il sistema nervoso tiene conto dei comandi inviati ai muscoli oculomotori e sottrae l'alterazione che si aspetta dovuta al movimento oculare dalla percezione visiva.

Luminanza delle superfici: Misura della luce emessa per unità di superficie (unità di misura: 1 candela/m²). Circa la luminanza di una superficie bianca illuminata da una candela alla distanza di 1 metro. La percezione della luminanza non dipende dalla distanza dell'occhio dalla superficie perché al diminuire dei fotoni che colpiscono la retina diminuisce anche di pari passo l'area di retina sulla quale si proietta l'immagine della superficie.

La retina mantiene la capacità di percepire informazioni in un range che va da 10⁻⁶ a 10⁶ Cd/m² (12 ordini di grandezza). Oltre 10⁷ circa iniziano i danni retinici, come limite inferiore abbiamo la soglia assoluta di percezione.

I coni non vanno in saturazione, i bastoncelli sì.

Fattori che permettono un così ampio range di funzionamento:

- Diametro pupillare: varia da 8 a 2 mm, fattore = 16, 1.2 ordini di grandezza.
- Presenza di recettori diversi: coni e bastoncelli (si pensa che i bastoncelli lavorino fino a circa 100 Cd/m², i coni lavorano da 10⁻³ fino al limite massimo).
- Meccanismi biochimici di adattamento alla luce ed al buio.
- Meccanismi di adattamento sinaptico.

Nella retina umana coni e bastoncelli non sono distribuiti in modo uniforme. Altri animali hanno distribuzioni differenti, ad esempio la retina del topo non è un buon modello per la retina foveale umana, ma di quella periferica. La similitudine tra retina murina e umana periferica si pensa dipenda dagli antenati comuni che si muovevano di notte (bastoncelli) perché di giorno erano attivi grandi rettili. La retina umana è adattata alla visione notturna tranne la fovea, filogeneticamente più recente. L'inserzione del nervo ottico genera un punto cieco a circa 15° in direzione temporale, normalmente non ci accorgiamo della sua presenza perché il sistema nervoso lo riempie (tipo filtri photoshop).

L'assenza di bastoncelli nella fovea fa sì che la sensibilità alle sorgenti di luce deboli sia migliore nella visione periferica: di giorno dobbiamo scorrere lo sguardo, di notte no ma vediamo di meno al centro del campo visivo.

Origine filogenetica dei fotorecettori:

Il fotorecettore ancestrale era con ogni probabilità un cono, le modificazioni dei bastoncelli sono frutto di specializzazioni successive. La formazione di nuovi dischi nei primi stadi è apparentemente uguale nel cono e nel bastoncello.

Il versante sinaptico del cono è una struttura "a nastro" e forma contatti con molte cellule, per lo più neuroni bipolari.

La sinapsi del bastoncello è molto più piccola e contatta meno cellule.

Il segmento esterno del bastoncello è molto più grande rispetto a quello del cono, infatti non si vedono i segmenti esterni dei coni.

La retina periferica rappresenta la maggior parte della retina quindi quasi tutta la retina è in realtà costituita da segmenti esterni dei bastoncelli (conferiscono migliore visione notturna).

La captazione dei fotoni e l'amplificazione del segnale avvengono nel segmento esterno, il contatto sinaptico in quello interno. Per trasferire il segnale da un lato all'altro del neurone si usa il potenziale di membrana.

Nel segmento esterno non ci sono canali ionici significativi, nel segmento tra segmento esterno ed il nucleo ci sono canali per il K^+ **non** modulati dal potenziale di membrana, la fuoriuscita di potassio porta ad iperpolarizzazione di potassio che tende al potenziale di riposo del potassio. Agiscono anche altri canali (HCN), che fanno passare sodio e potassio attivati da iperpolarizzazione, K è vicino all'equilibrio e ne passa poco, Na è molto lontano dall'equilibrio ed entra in grande quantità. Si mantiene così l'equilibrio elettrico, per quello chimico c'è la Na/K ATPasi. Alla luce saturante il potenziale si stabilizza a circa -70 mV, il bottone sinaptico non rilascia neurotrasmettitore.

Al buio si aprono i canali CNG che fanno entrare Na e Ca generando una corrente depolarizzante che si propaga al segmento interno tramite il ciglio che collega segmento esterno e segmento interno. I canali HCN si chiudono (sono aperti dalla iperpolarizzazione) Il nuovo equilibrio è a circa -45 mV. Nel segmento esterno c'è uno scambiatore Na , Ca , K attivo secondario che importa sodio ed estrude calcio. In luce saturante il calcio è a circa 100 nM, al buio circa 500 nM.

Quando il potenziale supera la soglia nel bottone sinaptico entra calcio che fa rilasciare le vescicole di glutammato.

Pigmenti visivi: cromoforo + apoproteina

Opsine: Recettori accoppiati a proteine G (trasduttori). Formano legame covalente con residuo Lys 296 con gruppo prostetico derivato da vit. A (11-cis-retinale). Lo spettro di assorbimento è modulato dalla struttura della proteina.

L'assorbimento di un fotone fa trasformare l'11-cis-retinale in retinale tutto-trans che induce cambiamento conformazionale nella proteina cromoforo e nell'opsina.

I recettori associati a proteine G sono trans-membrana, si trovano con un capo nel disco (organello intracellulare) e con l'altro nel citosol. I recettori associati a proteine G tendono ad essere associati a coppie, sembra che questi dimeri si associno a formare "binari" tutti orientati parallelamente (mantenuti in posizione dal citoscheletro) (modelli da rivedere perché in questo caso i recettori sono stazionari e sono le proteine G a diffondere).

Si conoscono 3 conopsine e 1 rodopsina, si pensa che siano originate da duplicazioni e successive mutazioni dello stesso gene primordiale (spiega anche il motivo della sovrapposizione delle curve di tuning, la conopsina verde e quella rossa sono di origine relativamente recente e le loro sequenze amminoacidiche sono ancora molto simili, molto di più rispetto alle conopsine blu e verde).

Come si fa a determinare la curva di tuning di un fotorecettore?

Si misura il potenziale di membrana di un cono/bastoncello isolato ed adattato al buio che viene esposto a flash di luce a lunghezza d'onda diversa ma di intensità costante (costante il numero di fotoni medio che colpiscono una unità di superficie). Per rappresentare in un grafico il grande range di intensità luminosa a cui risponde un fotorecettore si usa una scala logaritmica dell'intensità luminosa.

In realtà il potenziale del fotorecettore non è un segnale "pulito" ma contiene rumore dovuto all'attivazione termica degli enzimi legati alla catena di trasduzione, l'iperpolarizzazione non può essere più misurata quando la sua ampiezza è inferiore a quella del rumore.

In realtà secondo le leggi della percezione viste prima la sensibilità (e quindi la iperpolarizzazione) non scende mai a zero ma diventa molto piccola.

Per misurare sensibilità molto piccole si può fissare un obiettivo di iperpolarizzazione e aumentare l'intensità luminosa fino ad ottenere l'iperpolarizzazione voluta.

Il numero di fotoni (intensità luminosa) necessario ad ottenere la stessa iperpolarizzazione varia enormemente al variare della lunghezza d'onda, per questo si rende necessario il grafico in scala logaritmica.

Se spostiamo la lunghezza d'onda verso il rosso la sensibilità precipita verso valori infinitesimali, se invece ci spostiamo verso l'ultravioletto la sensibilità cala poco.

Perché allora non vediamo gli ultravioletti? Perché cornea e cristallino si presentano praticamente opachi nell'ultravioletto e li filtrano (ecco perché si danneggiano).

Il grafico che otteniamo in questo modo in realtà si “impenna” verso il rosso (aumentano i fotoni necessari per ottenere la stessa stimolazione). Come si ottiene allora il grafico bellino?

- Invertiamo il segno del logaritmo.
- Poniamo il valore (logaritmico) a cui si trova il picco a 0 (normalizziamo).

Esperimento di psicofisica (<https://www.jneurosci.org/content/jneuro/30/37/12495.full.pdf>)

Obiettivo dell'esperimento: determinare la soglia percettiva assoluta del topo per uno flash luminoso di breve durata e di piccole dimensioni.

I topi non possono parlare quindi i ricercatori si sono inventati questo metodo per rilevare se il topo ha visto o meno lo stimolo: addestrare i topi che possono smettere di correre (ai topi piace molto correre sulla ruota di notte) per andare a bere solo se hanno visto un flash luminoso (l'abbeveratoio eroga acqua solo per 12 s in seguito allo stimolo luminoso). Lo stimolo viene presentato ad intervalli casuali da 200 a 500 giri di ruota, è considerato come rilevato se il topo si ferma entro due giri di ruota dopo la presentazione dello stimolo.

Risultato: la soglia assoluta misurata per uno stimolo a 500 nm con un angolo di ampiezza di 5.3° è stata di 67 ± 6 (intervallo di confidenza 95%) fotoni misurati alla cornea (molto simile a quanto misurato nell'uomo da Hecht et al., 1941). Considerando che uno stimolo di questa ampiezza si proietta su un'area di retina che contiene circa 8350 bastoncelli la probabilità che uno di essi abbia ricevuto più di un fotone è trascurabile (<0.003) ne deduciamo che i bastoncelli sono capaci di rispondere ad un singolo fotone (che causa una singola isomerizzazione del retinale).

Da qui l'esperimento prosegue per analizzare la sommazione spaziale dello stimolo variando la dimensione del disco luminoso. Si osserva che per stimoli sufficientemente piccoli la soglia risulta inversamente proporzionale alla dimensione del disco (come previsto dalla legge di Ricco), mentre per stimoli la cui proiezione sulla retina è compresa tra 1000 e 10000 μm^2 (400-4000 bastoncelli) la soglia è molto più bassa del previsto (effetto di **supersommazione spaziale**). Il modello sviluppato dai ricercatori per spiegare questo fenomeno si basa su tre assunzioni:

- 1) Singole isomerizzazioni delle rodopsine possono essere rilevate e trasmesse dai bastoncelli ai neuroni di livello più elevato. (Provata nella prima parte dell'esperimento e da Hecht et al. 1941, Barlow et al. 1971, Mastrorade 1983).
- 2) Le isomerizzazioni che avvengono a causa dell'agitazione termica (“al buio” perché non dipendono dai fotoni, le possiamo considerare come falsi positivi) avvengono e sono indistinguibili da quelle indotte da stimoli luminosi. (Provata da Barlow et al. 1971, Mastrorade 1983, Baylor et al. 1979).
- 3) Cellule gangliari tappezzano la retina ed hanno campi ricettivi descritti da gaussiane che si sovrappongono tra cellule gangliari vicine.

Questo modello sostiene che la sommazione spaziale per i target più piccoli sia soddisfatta perché lo stimolo cade principalmente su un singolo campo ricettivo e quindi eccita una cellula gangliare molto più delle circostanti. Invece la supersommazione avviene per target che generano un simile livello di eccitazione in due o più cellule gangliari vicine, l'effetto combinato delle isomerizzazioni termiche e quelle luminose fa in modo che la stimolazione delle cellule gangliari superi la soglia dei neuroni a valle nella catena di trasmissione verso il sistema nervoso.

Modello alternativo: Una spiegazione alternativa attribuisce alle cellule amacrine AII la supersommazione, la plausibilità di questa spiegazione dipende dalle dimensioni del campo ricettivo delle cellule amacrine nel topo. Studi nella retina di gatto (che ha una densità di bastoncelli molto vicina a quella del topo) hanno evidenziato che una cellula amacrina AII riceve afferenze da circa 300 bastoncelli, mentre studi nel topo hanno mostrato che le gap-junctions potrebbero ampliare il campo ricettivo fino 4 volte. Se il campo ricettivo delle cellule amacrine AII è di circa 1200 bastoncelli (vicino ai 2000 per i quali l'effetto di supersommazione è massimo) non si può escludere questa seconda ipotesi.

Un'altra ricerca (quale?) misurò la soglia minima del sistema visivo umano a 5-6 foto-isomerizzazioni.

Perché la dimensione ottimale è proprio quella che è? Osservando le cellule gangliari sulla retina si nota che l'albero dendritico della maggior parte di esse ha un diametro pari a quello della proiezione del disco avente il diametro ottimale misurato prima. È la cellula gangliare ad integrare i segnali ricevuti da circa 3000 recettori ed attivarsi solo se si rilevano circa 12 trasduzioni. (non torna proprio tanto).

Alcune specie presentano il **tapetum lucidum**, uno strato di tessuto riflettente oltre la retina che riflette la luce di nuovo attraverso i bastoncelli. Aumenta la sensibilità alla luce ma produce una leggera sfocatura, è tipico di animali che hanno vita notturna e non presentano una fovea sviluppata.

Quale è l'iperpolarizzazione generata da un singolo fotone?

Non si può "sparare" un singolo fotone, si devono usare filtri attenuatori in modo da avere statisticamente la probabilità che un singolo fotone colpisca il recettore. Si tratta quindi sempre di fenomeni probabilistici che richiedono analisi di tipo statistico.

Classicamente si era stimata la variazione di potenziale di un bastoncello in risposta ad un singolo recettore a circa 1 mV, più recentemente (Cangiano et al. 2012, <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.226878>) si è misurata nella retina di ratto una variazione di potenziale (media della variazione di potenziale/media del numero di fotoni assorbiti) di 3.32 mV (Standard Deviation 1.18) oppure (aumento di varianza/risposta media) 3.55 mV (SD 1.55) a 24°C (vicino alla temperatura ambiente) mentre a 36°C (vicino alla temperatura corporea) si è misurata una risposta (media della variazione di potenziale/media del numero di fotoni assorbiti) di 2.35 mV (SD 0.82) oppure (aumento di varianza/risposta media) 2.57 mV (SD 1.33)

Catena fototrasduttiva del bastoncello

- 1) Attivazione della rodopsina. Una singola rodopsina rimane attiva per un tempo medio di 36 ms.
- 2) Attivazione delle proteine G: In media sembra che una singola rodopsina attivi 20 proteine G.
- 3) Attivazione della fosfodiesterasi: Le proteine G si legano e disinibiscono la fosfodiesterasi che aumenta la sua attività catalitica degradando cGMP (presente in elevata concentrazione nel segmento esterno).
- 4) Idrolisi della cGMP: Al buio si ha un equilibrio tra sintesi e degradazione, alla luce PDE ne degrada grandi quantità.
- 5) Chiusura dei canali ionici: Al buio cGMP tiene aperta una piccola parte dei canali di membrana, (canali CNG, cyclicnucleotide gated) (meccanismo cooperativo tra più molecole, l'apertura dei canali varia con il cubo della concentrazione di cGMP quindi una piccola diminuzione della concentrazione di cGMP si traduce in una grande diminuzione dei canali aperti).

La chiusura di canali altera il potenziale come detto prima.

La corrente che attraversa il segmento esterno è misurata con le micropipette a suzione, per convenzione la corrente al buio si indica come negativa, in condizioni di saturazione la corrente si porta a 0 (una volta chiusi tutti i canali non se ne possono chiudere altri).

In un bastoncello di anfibio (molto più grande) la risposta è molto più lenta (perché la stessa velocità delle reazioni in un volume maggiore impiega più tempo a produrre la stessa depolarizzazione).

La risposta alla luce dei recettori ha andamento quadratico (il grafico è una parabola), nella pratica questo comportamento è seguito solo dalla primissima fase di attivazione, poi si ha una deviazione della quale è responsabile il meccanismo di spegnimento della risposta.

Elettroretinogramma(ERG)

Si applica un elettrodo alla cornea (tramite lente a contatto) ed un altro in un'altra parte del corpo e si misura la differenza di potenziale transretinica (tra versante corneale e versante sclerale). La genesi del segnale è complessa per via delle correnti in gioco che prendono percorsi diversi.

Per flash deboli si ottiene solo un'onda positiva detta **onda b**, per flash più intensi la risposta è bifasica, si presenta prima un'**onda a** negativa e poi l'onda b positiva.

L'onda a è dovuta ai fotorecettori ed alle loro correnti generate dalla catena trasduttiva, l'onda b è generata dalle cellule bipolari.

Perché con flash deboli si vede solo l'onda b? Perché grazie alla grande convergenza le cellule bipolari si attivano già per stimolazioni sparse dei bastoncelli.

ERG scotopico: studia solo i bastoncelli.

ERG fotopico: studia i coni.

L'andamento iniziale dell'onda a ha andamento parabolico.