

## LAB3. NEUROFISIOLOGÍA Sinapsis

***Alumn@***

Apellido, Nombre:

Apellido, Nombre: Martín Cora Francisco Javier

## Invasión de la terminal sináptica. Liberación del Neurotransmisor.

En las sinapsis químicas el neurotransmisor se libera en paquetes de tamaño fijo (cuantos - vesículas), a partir de un conjunto de vesículas disponibles en la terminal presináptica, y el número de vesículas liberadas puede variar.

Cargue y ejecute el archivo liberación01.

Este archivo simula un experimento clásico. Una neurona (A) establece una conexión con otra neurona a través de una sinapsis colinérgica (el neurotransmisor que libera la neurona A es acetilcolina). La neurona presináptica se estimula repetidamente a una frecuencia fija de 50 Hz (50 veces/segundo) y se registra la respuesta postsináptica.

En la pantalla de Resultados sólo se muestra el registro de voltaje en la neurona postsináptica (la neurona presináptica no se muestra).

Obviamente hay alguna variación en el tamaño de los Potenciales Excitatorios Postsinápticos (PEPS), pero es difícil ver algún patrón obvio.

Reduzca la concentración de calcio externo a 1 mM. La pantalla debería borrarse y ejecutarse un nuevo experimento (está seleccionado en la pantalla de Resultados: autoborrado y Ejecutar al cambiar).

El tamaño de los PEPS se reduce sustancialmente. Esto se debe a que la liberación del transmisor depende del calcio. Reduzca aún más la concentración de calcio externo a 0,1 mM. Y ejecútelo varias veces para

obtener una buena impresión de los diferentes tamaños de los PEPS.

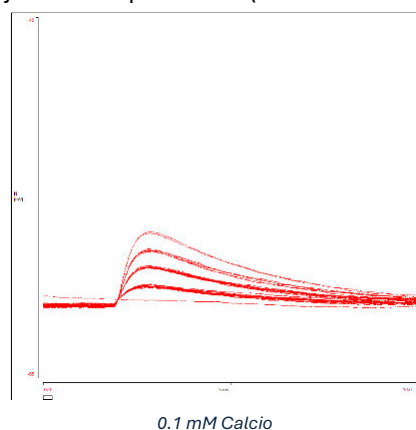
Puedes notar dos cosas: En primer lugar, hay «huecos» ocasionales en la respuesta. La neurona presináptica emite picos a una frecuencia constante (50 Hz), pero con bastante frecuencia no consigue provocar una respuesta en la neurona postsináptica.

En segundo lugar: el tamaño de los PEPS varía en amplitud con unos valores relativamente fijos, aunque como hay algo de ruido en el registro (añadido intencionadamente en la simulación) estas amplitudes no son siempre absolutamente iguales.

Esta última propiedad puede verse más claramente de la siguiente manera:

Borre los registros y desactive la casilla Borrado automático (Autoclear) en la pantalla de Resultados. Seleccione Triggered en el grupo Trigger mode de la pantalla de resultados, y establezca la base de tiempo de barrido máxima (la escala del eje inferior derecho) en 10 ms.

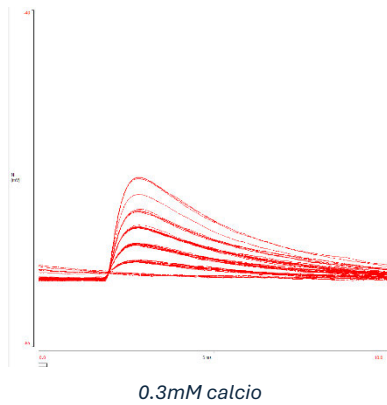
Ejecute el experimento (la concentración externa de calcio debe seguir siendo de 0.1 mM).



Ahora está viendo una vista ampliada de los PEPS individuales que se producen durante el mismo período de tiempo (400 ms), pero los PEPS están todos alineados y superpuestos. Esto es lo que se entiende por «triggered; disparado». El barrido de la pantalla se sincroniza con el momento en que el potencial de membrana cruza un nivel de disparo especificado por el usuario (-59.6 mV en este caso), y esto ocurre en la fase ascendente de los PEPS. En la pantalla también se muestra el registro desde 2 milisegundos antes del momento del disparo (Pre-trig está ajustado a 2 ms) para que se pueda observar el voltaje previo a los PEPS. La superposición de registros (barridos) alineados en función de una señal de disparo es una metodología de visualización estándar utilizada con frecuencia en experimentos reales.

Los resultados son probabilísticos, si ejecuta varias veces el experimento borrando la pantalla cada vez verá que los resultados varían. Ahora debería ser obvio que el tamaño de los PEPS no es gradual y continuo. En su lugar, los PEPS se agrupan en clases de un tamaño concreto.

Borre la pantalla y aumente la concentración de calcio externo a 0,3mM, ejecute ahora el experimento. Ahora debería ver más saltos en la amplitud de los PEPS. De nuevo borre la pantalla y aumente la concentración de calcio externo a 1mM. La amplitud de los PEPS sigue cambiando claramente a saltos. También puede ver algunos trazos con menor amplitud o incluso planos sin cambio de voltaje.



Los datos se pueden interpretar de la siguiente manera. En la terminal presináptica hay un conjunto de vesículas con neurotransmisor que se pueden liberar, y con cada espiga presináptica se libera un número entero aleatorio de ellas, fluctuando el número alrededor de un valor medio. Dependiendo del número de vesículas liberados se producirá un PEPS de mayor o menor amplitud y este cambio será a saltos (discretos) ya que se corresponderá con el número de vesículas liberadas (en cada vesícula hay una cantidad similar de moléculas de neurotransmisor).

*Nota: Se han incluido las imágenes de resultados, pero no se pedían.*

## Sinapsis

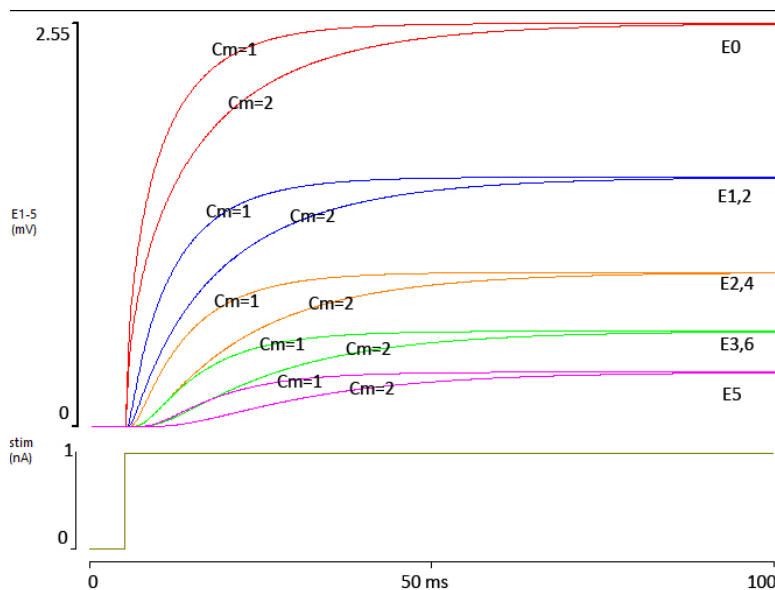
### Sumación espacial: Por qué es importante la constante de espacio.

La constante de espacio es un parámetro importante para la conducción pasiva porque cuantifica la velocidad a la que una señal se atenúa con la distancia. Tiene unidades de distancia, y un valor típico sería algo así como 5 mm. La constante de espacio tiene un gran impacto en la sumación espacial de las entradas sinápticas. Las dendritas con una constante larga permitirán que las entradas sinápticas que se produzcan en sitios relativamente distantes de una dendrita envíen una señal que todavía puede alcanzar la zona de iniciación de la espiga y desencadenar un potencial de acción.

La constante de espacio también tiene una influencia importante en la velocidad de conducción de los impulsos nerviosos en los axones. Los axones de gran diámetro propagarán los cambios locales de voltaje más lejos que los axones de pequeño diámetro y permitirán que los potenciales de acción se inicien más rápidamente a lo largo del axón. En los axones mielinizados también permite una mayor separación espacial de los nodos de Ranvier, lo que de nuevo acelera la conducción.

#### Constante de Tiempo: Retardo con la Distancia

Cargue el archivo *Pasivo05* y ejecútelo. Se observan 5 trazas simultáneas realizadas desde electrodos colocados progresivamente más distantes del lugar de estimulación (E1 a 0 mm; E2 a 1,2 mm; E3=2,4mm; E4=3,6mm; E5= 5mm). Las trazas se muestran todas en el mismo eje para que puedan compararse fácilmente. Observe los valores de los Parámetros derivados (constante de tiempo = 10 ms, constante de espacio = 2,5 mm y resistencia de entrada = 2,55 MΩ). En la pantalla de Setup inferior ajuste la capacitancia de la membrana (Cm) a 2μF. Observe ahora en los Parámetros derivados que la constante de tiempo aumenta, pero la constante de espacio y la resistencia de entrada no cambian. *(No se pedían estos valores se incluyen para que se entiendan mejor los resultados.: Cm=1μF/cm2; tau=10ms; lambda= 2,5mm; resistencia de entrada = 2,55MΩnms. Cm=2μF/cm2; ;tau = 20ms; lambda= 2,5mm; resistencia de entrada =2,55MΩnms)*



Ejecute de nuevo el experimento. Al duplicar la capacitancia de la membrana se duplica la constante de tiempo de la membrana, que ahora es de 20 ms. Esto ralentiza la velocidad de aumento del voltaje, pero no afecta a su valor final (como indica la resistencia de entrada sin cambios; 2.55MΩnms). Tampoco afecta al grado de atenuación, por lo que la constante de espacio (2,5mm) es independiente de la capacitancia. Dibuje la pantalla de resultados.

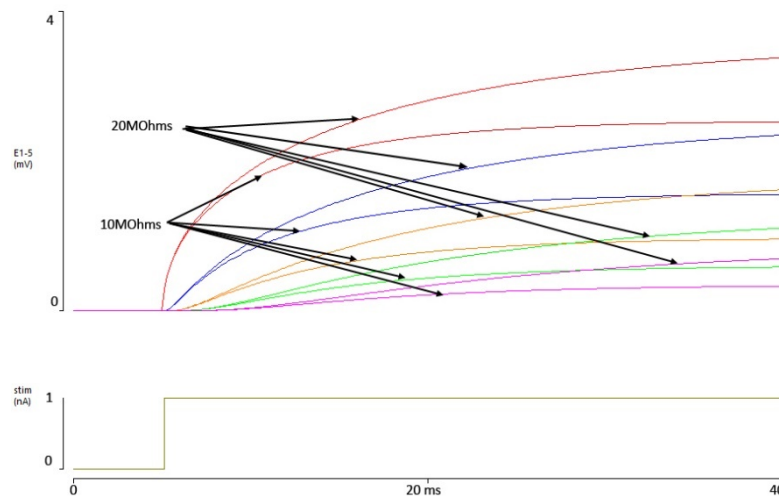
Borre la pantalla de resultados y vuelva a ejecutar el último experimento, ahora visualizará un sólo barrido. Ajuste el eje derecho de la base de tiempos a 40 ms, para ampliar la primera parte de la respuesta. El trazo rojo superior es del electrodo situado en el lugar del estímulo, y aquí el aumento de voltaje es más rápido que un exponencial puro.

Al observar electrodos de registro progresivamente más distantes, se puede ver que no sólo la velocidad de subida es más lenta, sino que cambia de forma: la forma de onda se vuelve sigmoidea. En el registro más alejado, a 5 mm del lugar del estímulo, la forma de onda inicial es bastante plana y el aumento es muy suave. Es evidente que la forma de onda no es exponencial.

Esto significa que nuestro método de medir la constante de tiempo como el tiempo que tarda el voltaje en alcanzar el 63% de su valor final ya no es válido. La membrana sigue teniendo una constante de tiempo, y esa constante se define como antes:  $\tau_m = R_m C_m$  pero no se puede medir fácilmente porque la forma de onda depende de la distancia.

Vuelva a cargar el archivo para volver a las condiciones iniciales y ejecútelo. En la pantalla inferior de Setup ajuste la resistencia de membrana ( $R_m$ ) a 20 (es decir, duplíquela) y ejecute de nuevo el archivo.

Dibuje la pantalla de resultados.



Ahora la constante de tiempo, la resistencia de entrada y la constante de espacio están aumentadas. La misma cantidad de corriente genera una respuesta final mayor en todas las posiciones a lo largo del axón. Esto tiene sentido porque la reducción de la «fuga» a través de la membrana significa que la corriente se propagará más dentro del axón antes de fugarse.

*Nota añadida, no se pedía: Con 20KOhms de resistencia de membrana, la constante de tiempo es 20ms; la de*

*espacio 3.54mm y la resistencia de entrada es 3,6MOhms;*

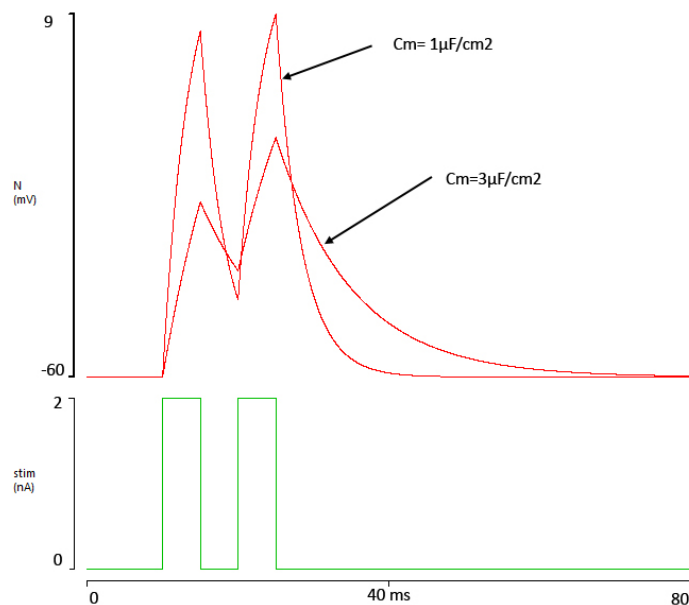
*Con 10KOhms de resistencia de membrana la constante de tiempo es 10; la constante de espacio es 2.5mm y la resistencia de entrada 2,55MOhms*

## Sumación temporal: Por qué es importante la constante de tiempo

Cargue el archivo *Pasivo02* y ejecútelo. En el gráfico inferior se muestran dos pulsos de inyección de corriente sucesivos y breves, y en el gráfico superior se muestra la respuesta del voltaje de la membrana. Se observa cómo el voltaje empieza a aumentar tras el primer estímulo, pero no alcanza el valor de estado estacionario antes de que el estímulo termine y el voltaje comienza a caer. Sin embargo, el segundo estímulo ocurre antes de que el voltaje de la membrana regrese a su valor inicial, lo que causa que la segunda respuesta se “añada a la espalda” de la primera y así el segundo pico alcanza un valor de voltaje superior al de la primera respuesta. Esto es una sumación temporal.

Reduzca la capacidad de la membrana (de 3 a  $1\mu\text{F}$ ) y ejecute nuevamente la simulación.

Dibuje los resultados, analice y explique la respuesta que observa en el voltaje comparando los



resultados obtenidos con 3 y  $1\mu\text{F}$  de capacidad.

*Hay una diferencia de amplitud en el voltaje en respuesta a un primer pulso de corriente de aproximadamente 32mV y de 23,5mV a un segundo pulso de corriente siendo mayor cuando la capacidad de la membrana es de  $1\mu\text{F}/\text{cm}^2$  con respecto a  $3\mu\text{F}/\text{cm}^2$ .*

*También se observa que la pendiente del cambio de voltaje en el tiempo ( $\partial V/\partial t$ ) durante la despolarización (carga del condensador) y la repolarización (descarga del condensador) es mayor para cuando la capacidad de la membrana es menor. La mayor capacidad de la membrana hace que el cambio de voltaje en respuesta a la estimulación sea más*

*lento cuando la capacidad de la membrana es mayor, que implica ahora una mayor tau. Se tarda más en alcanzar el máximo de la despolarización y también en la repolarización de la membrana lo que permite que con elevada capacidad la sumación temporal sea mayor cuanto mayor sea  $C_m$ .*

¿Por qué la respuesta de voltaje tiene mayor amplitud cuando  $C_m=1\mu\text{F}$ ?

*La amplitud es mayor porque con una menor capacidad la corriente responsable del cambio de voltaje circula ahora mayoritariamente por el elemento resistivo que contribuye al cambio de voltaje de la célula, mientras que cuando la capacidad es mayor la corriente inyectada se desvía para cargar/descargar el condensador lo que implica no sólo un enlentecimiento sino también un menor cambio de voltaje asociado a la corriente iónica, resistiva que pasa a través de los canales que ahora es menor, ya que  $I_m=I_c+I_r$*

Ya hemos visto los efectos de la constante de tiempo sobre la suma temporal en una célula esférica simple. ¿Qué ocurre si añadimos la complicación de la conducción pasiva?

Cargue el archivo *pasivo06* y ejecútelo.

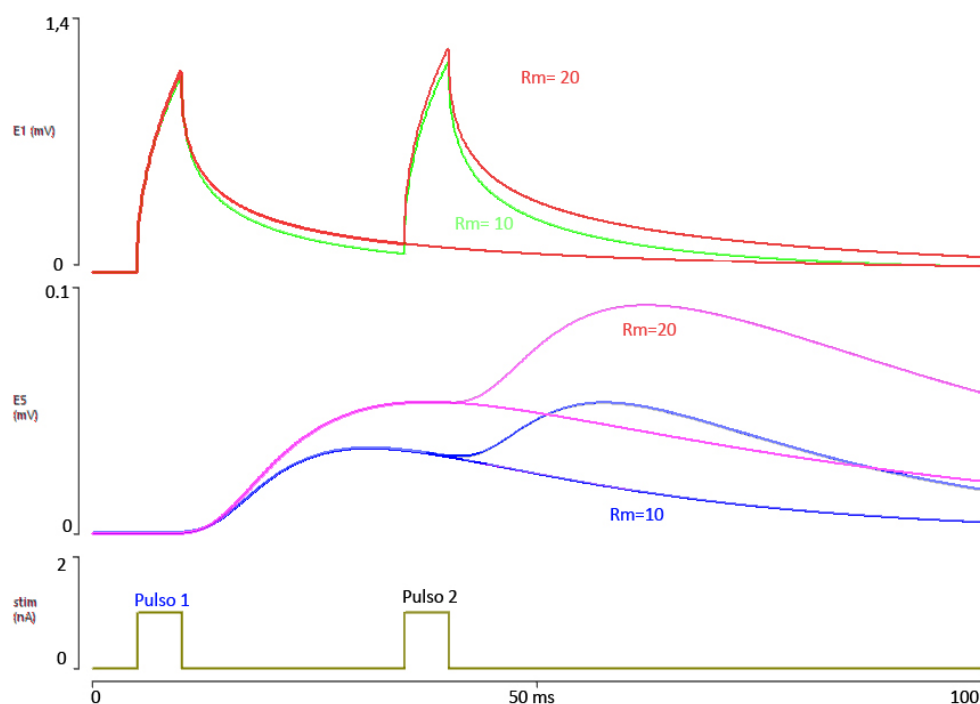
El trazo inferior muestra dos estímulos breves que se suceden con relativa rapidez. El trazo superior (rojo) muestra la respuesta del voltaje en el lugar de la inyección de corriente. Hay muy poca suma temporal: el segundo pico no es mucho mayor que el primero.

El trazo central (púrpura) muestra la respuesta del voltaje en un electrodo dispuesto a 5mm de distancia del punto de inyección (E1). La respuesta es mucho menor, como cabría esperar debido a la atenuación (observe las diferentes escalas de los ejes), pero ahora las dos respuestas interactúan y el pico de la segunda respuesta es considerablemente mayor que el pico de la primera. Por lo tanto, la suma temporal se produce lejos del lugar de inyección de la corriente, pero no en el lugar de inyección.

Aumente la resistencia de la membrana ( $R_m$ ) a 20 y ahora vuelva a ejecutar.

La respuesta en el lugar de inyección de la corriente (E1) es muy similar, pero la suma temporal en el lugar distal de la dendrita (E5) aumenta considerablemente. La conducción pasiva puede causar diferentes grados de suma temporal en diferentes regiones de una dendrita.

Dibuje el resultado



Dado que el estímulo de corriente es el mismo en ambas situaciones, ¿por qué el aumento de la resistencia de la membrana provoca un cambio tan pequeño en la respuesta de voltaje en el lugar de la inyección de corriente y, sin embargo, un cambio tan sustancial en el cambio de voltaje unos milímetros más allá a lo largo de la dendrita (ahora hay sumación)?

( $R_m=10K\Omega$ ;  $\tau = 30ms$ ;  $\lambda = 2,5mm$ ;  $R_m=20 K\Omega$ ;  $\tau = 60ms$ ;  $\lambda = 3,54mm$ )

Como se ve en los parámetros derivados, un aumento de la resistencia de membrana aumenta un 100%  $\tau$ , y un 40%  $\lambda$ . Pero esto provoca un cambio pequeño en un lugar próximo al lugar de inyección (E1) sin haber apenas sumación temporal (la amplitud de la segunda despolarización con respecto a la primera aumenta en  $\approx 0,1mV$  mayor para  $R_m=20K\Omega$  (curva roja) y  $0.06mV$  para  $R_m=10K\Omega$  (curva verde) esto supone un aumento debido a la suma de menos de un 1% en la amplitud de la respuesta al segundo pulso, esto es debido a que a pesar del aumento en  $\tau$  el decaimiento del voltaje en E1 es muy rápido y a los 30 milisegundo cuando se produce el pulso 2 el voltaje de la membrana en E1 a retornado prácticamente a su valor basal.

Sin embargo, la sumación es porcentualmente mucho mayor en E5. Así aunque la amplitud de la señal en E5 es menor(debido a su atenuación con la distancia como se ve reflejado en la escala de los ejes, ahora va de  $0mV$  a  $0.1mV$  y en E1 la escala abarca de  $0mV$  a  $1.4mV$ ) la señal se va haciendo más duradera (aumenta más lentamente y también decae más lentamente).

Cuando la despolarización en respuesta al pulso 2 alcanza E5 el potencial de la membrana todavía no ha retornado a su valor basal, se encuentra despolarizado ( $0.034mV$  cuando  $R_m=10K\Omega$ , curva azul; y  $0,054mV$

cuando  $R_m=20K\Omega$  (curva rosa), y esto permite que la llegada del segundo estímulo se añada significativamente al primero, es decir hay sumación temporal (la amplitud en respuesta al segundo pulso alcanza valores de 0,053mV para  $R_m=10K\Omega$  y 0,093mV para  $R_m=20K\Omega$ . Esto supone que cuando la resistencia de membrana es  $20K\Omega$  el potencial resultante tras el pulso 2 en E5 es el doble (aumento del 100%) que el provocado por el pulso 1.

La sumación es mayor a mayor distancia que en zonas próximas a la zona de inyección de la corriente. Esto es debido a que la resistencia de membrana modifica no sólo la constante de espacio sino la de tiempo pero no de manera homogénea como vimos con anterioridad y eso causa que la pendiente del cambio de voltaje ( $\partial v/\partial t$ ) sea cada vez menor a medida que nos alejamos del punto de inyección de la corriente provocando que los cambios de voltaje más distantes sean también más lentos, tanto para aparecer como para desaparecer. Esto da lugar a que las despolarizaciones más distantes son aunque más pequeñas más duraderas lo que permite que se produzca una mayor sumación temporal en las zonas más alejadas (E5) a pesar de su menor amplitud debido a la pérdida de cargas a través de la membrana a medida que estas se propagan por el axón.

Por supuesto esta sumación también se ve favorecida por el aumento de la constante de espacio. Si comparamos el resultado de la sumación en E5, para  $R_m=10K\Omega$  para de pulso1-> 0,034mV a pulso2-> 0,053mV, mientras que con  $R_m=20K\Omega$  pasa de 0.053 a 0.093mV como consecuencia de un menor decaimiento de la señal con la distancia para una mayor  $\lambda$ .

## Sinapsis químicas

En una sinapsis química, la información se transmite entre neuronas en forma de señal química. En concreto, la despolarización de la membrana presináptica abre canales de calcio dependientes de voltaje, y la entrada de calcio resultante desencadena la unión de vesículas a la membrana presináptica, la formación de un poro y la liberación del contenido de las vesículas (exocitosis de vesículas de neurotransmisor) que contienen la señal química. El neurotransmisor se difunde a través de la hendidura sináptica (espacio entre la membrana presináptica y la membrana postsináptica) e interactúa con los receptores para neurotransmisores de la membrana postsináptica. Esta interacción neurotransmisor-receptor provoca cambios de voltaje de la membrana de la neurona postsináptica.

Existen sinapsis química en los que un único potencial de acción presináptico genera una despolarización suficiente para provocar la liberación del transmisor, mientras que en otras sinapsis químicas, la despolarización presináptica subumbral puede provocar la liberación del transmisor por sí sola, sin necesidad de que se produzca una espiga.

## Excitación e inhibición

Cargue y ejecute el archivo *sinapse01*. Dibuje la pantalla de resultados identificando cada registro. En la pantalla de configuración (SetUp) tres neuronas son visibles como círculos amarillos (N1, N2, N3). Una línea que termina en un rombo azul va de N1 a N3; esto representa una conexión sináptica. Una línea similar va de N2 a N3. Los dos rombos representan sinapsis químicas, y las etiquetas *a* y *b* indican que tienen propiedades diferentes. Indican que son diferentes tipos de sinapsis con diferentes propiedades, pero no tienen significado fuera del programa.

Las propiedades de las sinapsis se establecen utilizando el comando de menú Sinapsis. N1 y N2 se estimulan con corriente positiva (recuadros 1 y 2 serían estimuladores) y en respuesta a un estímulo despolarizante presentan una descarga regular de potenciales de acción, que generan potenciales postsinápticos (PSPs) en la neurona 3 (N3).

En la pantalla de Resultados vemos como varía el potencial de membrana de las 3 neuronas en el tiempo (0 a 400ms), además bajo el registro de voltaje de cada neurona se monitoriza la intensidad de corriente aplicada a través del estimulador (1, 2, o 3) asociado a cada neurona.

Pregunta: Una de las sinapsis genera un potencial postsináptico *excitatorio* (PEPS) en N3 mientras que la otra genera un potencial postsináptico *inhibitorio* (PIPS). ¿Cuál es cuál?

*N1 genera potenciales excitatorios postsinápticos (despolarización) sobre N3, mientras que N2 genera potenciales inhibitorios postsinápticos (hiperpolarización).*

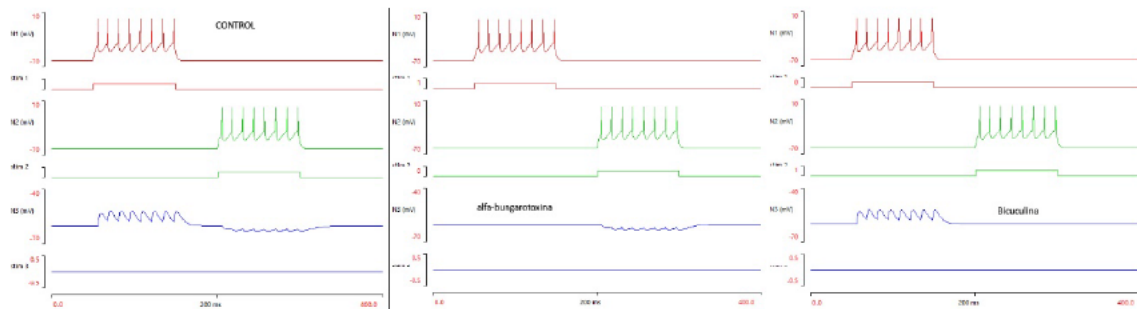
Aplica la  $\alpha$ -bungarotoxina (marcando la casilla correspondiente en el grupo Fármacos del panel control experimental) y ejecuta de nuevo el experimento. La  $\alpha$ -bungarotoxina se deriva del veneno de serpiente (del género *Bungarus*) y es un bloqueante específico de los receptores nicotínicos de acetilcolina. Dibuje la pantalla de resultados e indique que es lo que observa con respecto al experimento inicial.

Retire la  $\alpha$ -bungarotoxina y añada bicuculina (desmarcando y marcando la casilla correspondiente en el grupo Fármacos del panel control experimental). La bicuculina bloquea a



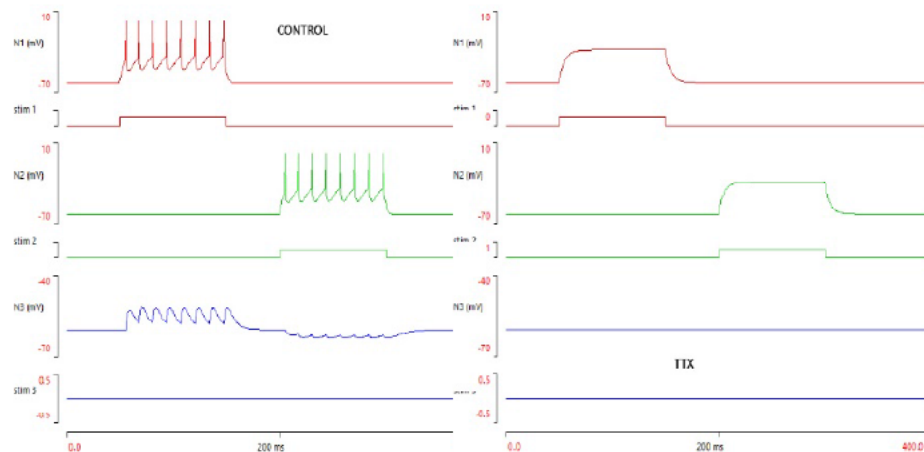
su vez los receptores GABA<sub>A</sub>. Dibuje la pantalla de resultados e indique que es lo que observa con respecto al experimento inicial.

¿Confirma el resultado sus ideas respecto a los PEPS y PIPs?



*Si lo confirma plenamente, ya que al bloquear la acción de los neurotransmisores (acetilcolina y GABA) se observa la desaparición de sus efectos postsinápticos. Al bloquear los receptores para GABA<sub>A</sub> con bicuculina desaparecen los PIPs en N3 en respuesta a la estimulación de N2; y al bloquear los receptores nicotínicos para acetilcolina con  $\alpha$ -bungarotoxina desaparecen los PEPS en N3 en respuesta a la estimulación de N1.*

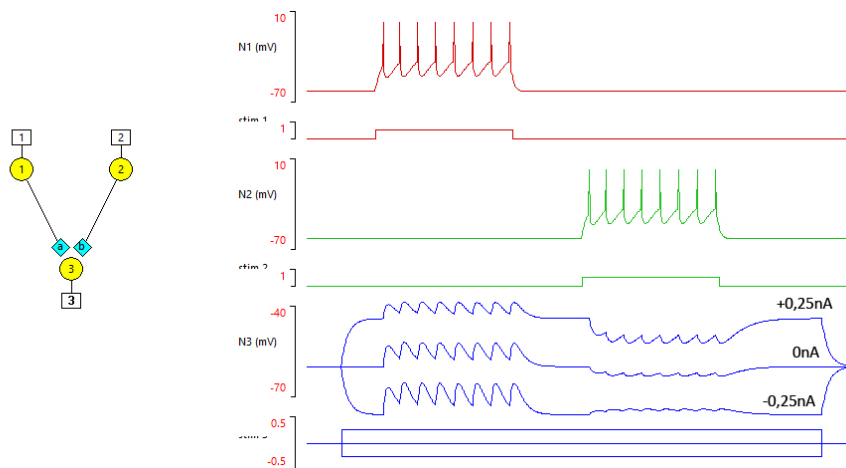
Retire la bicuculina y aplique TTX y ejecute de nuevo el experimento. Dibuje la pantalla de resultados, ¿Qué ha cambiado con respecto al experimento inicial? Explique los resultados.



*Como consecuencia de la aplicación de tetrodotoxina se han bloqueado los canales de sodio voltaje dependientes de N1 y N2. Ahora la inyección de una corriente despolarizante es estas neuronas sólo genera un cambio subumbral en el voltaje de sus membranas insuficiente a todas luces para la liberación de acetilcolina por N1 y de GABA por N2. Como resultado en la neurona postsináptica N3 se dejan de observar potenciales postsinápticos tanto excitadores (en respuesta a acetilcolina, N1) como inhibidores (en respuesta a GABA, N2).*

Retire el TTX y desmarque la casilla **Autoclear** en la pantalla de Resultados. Ahora ajuste la Amplitud del estímulo 3 a 0.25 nA. De esta manera ahora estaremos inyectando una corriente despolarizante a la neurona N3 durante el tiempo de los potenciales postsinápticos. Debería ver que los PEPS se han hecho más pequeños en términos de su altura base-pico, mientras que los PIPS se han hecho más grandes. Dibuje su resultado y compárelo con el obtenido en el experimento inicial.

Ahora ajuste Amplitud del estímulo 3 a -0.25 nA (ponga un signo menos delante del número). Ahora los PEPS han aumentado. Los PIPS, sin embargo, han invertido su dirección. En lugar de ir en sentido negativo desde el potencial de reposo ahora van en sentido positivo. Dibuje su resultado y compárelo con el obtenido en el experimento inicial.



Pregunta: ¿Por qué los PEPS y PIPS cambian de amplitud (base-pico) con la despolarización, por qué los PIPS cambian de amplitud con la hiperpolarización, y por qué las PIPS invierten su polaridad con la hiperpolarización?

*En la imagen se observa el experimento control (0nA) que resulta de la estimulación de N1 y N2; y el resultado la estimulación de N1 y N2 combinada con la despolarización de N3 (+0.25nA) o con la hiperpolarización de N3 (-0.25nA). Tanto los PEPS como los PIPS son el resultado de despolarizaciones e hiperpolarizaciones asociadas a corrientes iónicas a través de canales voltaje dependientes cuya corriente va a ser mayor o menor en función de la fuerza electromotriz o de empuje ( $fem = V_m - E_{ion}$ ). Es esta fuerza la que cambia cuando se cambia el potencial de la membrana de N3 mediante despolarizaciones e hiperpolarizaciones.*

*Así al despolarizar la membrana aumentamos la fem (la diferencia entre el potencial de membrana y el potencial de equilibrio para el ion) para los aniones implicados en los PIPS y por tanto su corriente es mayor y eso provoca el aumento en la amplitud del PIPS. Por el contrario, al despolarizar, disminuimos la fem (al acercar  $V_m$  a  $E_{ion}$ ) para los cationes implicados en los PEPS el resultado es una menor corriente catiónica de entrada lo que provoca una menor amplitud de los PEPS.*

*Al hiperpolarizar pasa justo lo contrario la fem aumenta para los cationes responsables de los PEPS y eso hace que su amplitud aumente. En el caso de los PIPS la hiperpolarización de N3 no sólo cambia la fem que en el control favorece la salida de aniones, que causa la hiperpolarización, sino que el resultado ahora se invierte ya que  $V_m$  sobrepasa el potencial de equilibrio del anión y ahora en vez de salir aniones entran aniones, es decir se invierte la dirección del flujo de iones y por tanto el efecto del GABA sobre N3, invirtiendo la polaridad de los PIPS.*