

Tesis Doctoral

Estructura electrotónica de neuronas motoras de sanguijuela

Daicz, Sergio

2011

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Daicz, Sergio. (2011). Estructura electrotónica de neuronas motoras de sanguijuela. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Daicz, Sergio. "Estructura electrotónica de neuronas motoras de sanguijuela". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Computación

Estructura electrotónica de neuronas motoras de sanguijuela

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires
en el área Ciencias de la Computación

Sergio Daicz

Directora de tesis: Lidia Szczupak
Consejero de estudios: Santiago Figueira

Lugares de trabajo: IFIBYNE (UBA - CONICET)
Departamento de Computación (FCEN - UBA)

Buenos Aires, 2011

Estructura electrotónica de neuronas motoras de sanguijuela

Las neuronas son células con estructuras tridimensionales complejas adaptadas a su función. Poseen extensos árboles neuríticos, en los que pueden recibir señales de otras neuronas en distintos puntos de su estructura. Las neuritas funcionan como cables, cuyas propiedades morfológicas y las propiedades eléctricas de la membrana determinan cómo se propagarán las señales.

Los registros electrofisiológicos intracelulares nos permiten conocer con gran precisión la evolución en el tiempo del potencial de membrana para un punto de la neurona. La actividad registrada puede provenir desde distintos puntos del árbol neurítico. Las señales originadas en el punto de registro o cerca de él serán registradas con gran fidelidad, mientras que las señales originadas en puntos lejanos sufrirán una atenuación. Dada la extensión de los árboles neuríticos, las complejas transformaciones que sufren las señales al propagarse por ellos, y nuestra limitada capacidad de observación, un modelo biofísico puede resultar muy útil para entender e interpretar las observaciones realizadas.

El efecto de la atenuación de señales dentro de una neurona es particularmente notable en el caso de las neuronas motoras de la sanguijuela, en las que los potenciales de acción que se registran en el soma llegan con una amplitud de unos pocos milivolts. En este trabajo estudiamos la transmisión de señales graduales dentro de las neuronas motoras AE, a partir de la construcción de modelos morfoeléctricos de las mismas. En los Capítulos 2 y 3 analizamos su anatomía y fisiología, obteniendo los modelos morfológicos detallados y los parámetros necesarios para construir un modelo biofísico. En el Capítulo 4 construimos modelos a partir de los datos obtenidos. Simulamos la propagación de corriente a lo largo del tronco principal de la neurona y analizamos su atenuación en ambos sentidos. A través de alteraciones en la morfología analizamos qué aspectos de la misma son los más relevantes en determinar la atenuación. En el Capítulo 5 desarrollamos una técnica novedosa de deconvolución del potencial observado que nos permite estimar la corriente en un punto remoto que dio lugar a la observación, y la aplicamos a los potenciales de acción registrados para estimar su forma en el origen. Nuestros resultados sugieren que la morfología puede ser responsable de gran parte de la atenuación observada.

Palabras clave: neurona motora, *Hirudo* sp., morfología neuronal, modelo biofísico, propagación de señales, deconvolución.

Electrotonic structure of motor neurons of the leech

Neurons are cells with complex three dimensional structures adapted to their function. They have extensive neuritic trees, in which they can receive signals from other neurons at different points of their structure. Neurites function as cables, whose morphology and the electrical properties of the membrane establish how signals propagate.

Intracellular electrophysiological recordings allow us to know with great precision the temporal evolution of the membrane potential at a point of the neuron. The recorded activity may come from different points of the neuritic tree. Signals originated at the recording point or near it will be recorded with great fidelity, while signals originated in distal points will suffer attenuation. Given the extent of neuritic trees, the complex transformations that signals suffer when they propagate through them, and our limited capacity of observation, a biophysical model can be a very useful tool to understand and interpret the observations made.

The effect of signal attenuation within a neuron is particularly notable in the case of the motor neurons of the leech, where action potentials reach the soma with an amplitude of only a few millivolts. In this work, we study gradual signal transmission within the AE motor neurons, basing us on the construction of morphoelectrical models of the neurons. In Chapters 2 and 3 we analyze their anatomy and physiology, obtaining detailed morphological models and the parameters necessary for building a biophysical model. In Chapter 4 we build models using the data obtained. We simulate current propagation through the main trunk of the neuron and we analyze its attenuation in both directions of propagation. Using variations of the morphology we analyze what aspects of it are most relevant in establishing the attenuation. In Chapter 5 we develop a novel technique consisting in deconvolving the observed potential, which allows us to estimate the current at a remote point where the signal originated. We apply it to the recorded action potentials to estimate their shape at the origin. Our results suggest that morphology may be responsible for most of the observed attenuation.

Keywords: motor neuron, *Hirudo* sp., neuronal morphology, signal propagation, deconvolution

Para Ivanna.

Índice general

1	Introducción	1
2	Morfología	10
2.1	Materiales y métodos	10
2.1.1	Preparación biológica	10
2.1.2	Tinción de neuronas y obtención de imágenes	11
2.1.3	Procesamiento	13
2.1.4	Reconstrucción	17
2.1.5	Estadísticas morfométricas	19
2.2	Resultados	19
3	Fisiología	29
3.1	Materiales y Métodos	29
3.1.1	Registros electrofisiológicos	29
3.2	Resultados	32
4	Modelado	39
4.1	Introducción	39
4.1.1	Propiedades de la membrana neuronal	39
4.1.2	Modelo pasivo	41
4.1.3	Variación espacial del potencial de membrana	44
4.1.4	Árboles neuríticos	49
4.1.5	Sistemas lineales	49
4.1.6	La neurona pasiva como un sistema lineal	51
4.1.7	Propiedades de las impedancias	52

4.1.8	Atenuación de voltaje	52
4.1.9	Transformada electrotónica	53
4.1.10	Cálculo de impedancias y atenuaciones	54
4.2	Métodos	57
4.2.1	Reducción de modelo morfológico	57
4.2.2	Simulaciones	58
4.2.3	Análisis electrotónico	58
4.3	Resultados	59
4.3.1	Parámetros pasivos	59
4.3.2	Simulaciones en morfología	59
4.3.3	Variaciones en la morfología	61
4.3.4	Análisis electrotónico	74
4.3.5	Impedancia de entrada	80
5	Estimación de potenciales remotos	82
6	Discusión y conclusiones	89
6.1	Morfología	89
6.2	Fisiología	90
6.3	Modelo	90
6.3.1	Propagación de potenciales de acción	92
6.3.2	Inyección de corriente en el soma	93
6.3.3	Propagación de potenciales sinápticos	94
6.3.4	Variaciones en la morfología	95
6.3.5	Deconvolución	96
	Bibliografía	98

Capítulo 1

Introducción

A diferencia de los modelos utilizados en las llamadas Redes Neuronales Artificiales, en las neuronas biológicas la morfología de las neuronas individuales juega un importante rol. Las neuronas son células con estructuras tridimensionales complejas adaptadas a su función. Podemos distinguir dos componentes estructurales básicos: el soma y las neuritas. En el soma, o cuerpo celular, se ubica el núcleo y es aquí donde reside la mayor parte de la maquinaria de síntesis proteica de la célula. Las neuritas son ramificaciones tubulares que se extienden desde el soma. La extensión de las neuritas cubre las regiones del sistema nervioso donde se encuentran las células con las que se conecta la neurona (entradas y salidas). La comunicación entre neuronas se da por sinapsis químicas y eléctricas. En vertebrados las neuritas se clasifican en dendritas y axones. Las dendritas son las ramas en las que la neurona recibe señales provenientes de otras neuronas y los axones son las ramificaciones que transmiten las señales hacia otras neuronas, si bien existen conexiones sinápticas que escapan a esta regla. El segmento inicial del axón es un sitio próximo al soma donde se inician los potenciales de acción (Clark et al., 2009), que son señales electroquímicas que se propagan activamente por el axón produciendo la despolarización necesaria para causar la liberación de neurotransmisores en las sinapsis, que a su vez producirán un efecto en la neurona postsináptica. En las neuronas de vertebrados, entonces, el soma se encuentra adyacente al punto donde se integran las señales de entrada para

producir la salida. En invertebrados la división entre dendritas y axones se desdibuja un poco, y en las mismas neuritas pueden coexistir puntos de entrada y salida. El sitio de inicio de potenciales de acción puede encontrarse alejado del soma.

En forma ideal, para conocer de manera acabada el funcionamiento de una neurona, querríamos registrar la actividad eléctrica en cada uno de los puntos de la célula. Sin embargo, aún no existe una técnica que permita alcanzar este objetivo. Los registros electrofisiológicos intracelulares permiten estudiar con precisión la evolución en el tiempo de las señales eléctricas que se producen en cualquier punto que pueda ser registrado de la neurona. En estos estudios el electrodo suele ser insertado en la región de mayor calibre de la célula, o sea el soma. Allí se puede registrar la actividad que invade al soma desde distintos puntos del árbol neurítico. Las señales originadas en el soma o cerca de él serán registradas con gran fidelidad, mientras que las señales originadas en puntos lejanos sufrirán una atenuación, que en extremos puede tornarlas indetectables. La morfología de las neuritas y las propiedades eléctricas de la membrana tienen un alto impacto en la integración de señales en los distintos puntos de referencia que puedan tomarse.

A partir del trabajo de Stuart y Sakmann (1994) se realizan algunos estudios introduciendo más de un electrodo en una misma neurona para registrar simultáneamente el potencial en más de un punto. Sin embargo, estos registros resultan aún difíciles de realizar y no permiten un estudio de rutina.

Dada la extensión de los árboles neuríticos, las complejas transformaciones que sufren las señales al propagarse por ellos, y la limitada capacidad de observación, un modelo biofísico puede resultar muy útil para entender e interpretar las observaciones realizadas.

Modelos biofísicos

Los modelos biofísicos han sido una herramienta fundamental para comprender el funcionamiento de las neuronas desde el trabajo seminal de Hodgkin y Huxley (1952). Se trata típicamente de ecuaciones diferenciales que des-

criben la evolución del potencial de membrana en el tiempo. Los modelos pueden incluir puramente conductancias fijas (“modelos pasivos”) o variables (“activos”). También pueden ser puntuales, o considerar dimensiones espaciales continuas o discretizadas (Koch y Segev, 1998). Entre los modelos con dimensión espacial se encuentran los modelos detallados, que incorporan los diámetros y longitudes de los procesos de las neuronas para deducir sus propiedades biofísicas.

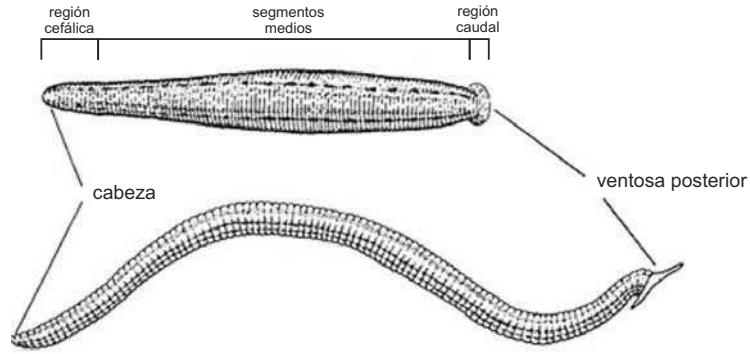
Para estos últimos es necesario conocer la morfología de la neurona a estudiar. En los últimos años surgió un creciente interés en el desarrollo de métodos que permitan una reconstrucción detallada de la morfología de neuronas a partir de imágenes obtenidas por microscopía confocal de alta resolución (Rodríguez et al., 2003; Evers et al., 2005). Esto hace posible obtener una imagen digital tridimensional de la neurona y a partir de ella aplicar métodos objetivos para obtener un modelo morfológico, a diferencia de los métodos tradicionales, que involucraban una gran carga manual y subjetiva.

Sistema nervioso de la sanguijuela

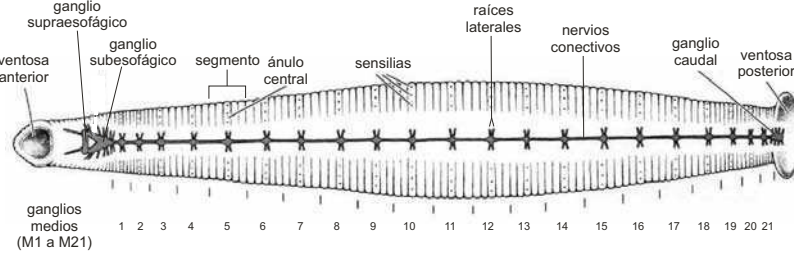
La sanguijuela *Hirudo* sp. es un anélido cuyo organismo está dividido en 34 segmentos, de los cuales seis conforman la región cefálica y siete la zona caudal (Figura 1.1 A). La segmentación de su esquema corporal se refleja en la estructura de su sistema nervioso. Éste consiste en una cadena de ganglios que se comunican entre sí por medio de nervios conectivos (Figura 1.1 B y C). En la región cefálica de la cadena, los ganglios se fusionan para formar los ganglios supraesofágico (dos ganglios fusionados) y subesofágico (cuatro ganglios fusionados). En la zona caudal, siete ganglios fusionados forman el ganglio caudal (Muller et al., 1981). Cada segmento medio mantiene una gran autonomía sensorial y motora: cada ganglio posee el repertorio completo de neuronas sensoriales y motoras que inervan dicho segmento (Figura 1.1 C). Esto ha permitido que muchos estudios se concentren en el ganglio medio aislado, donde pueden observarse interacciones sensorio-motoras completas.

Los ganglios medios (M1-M21) son muy similares entre sí y entre indivi-

A



B



C

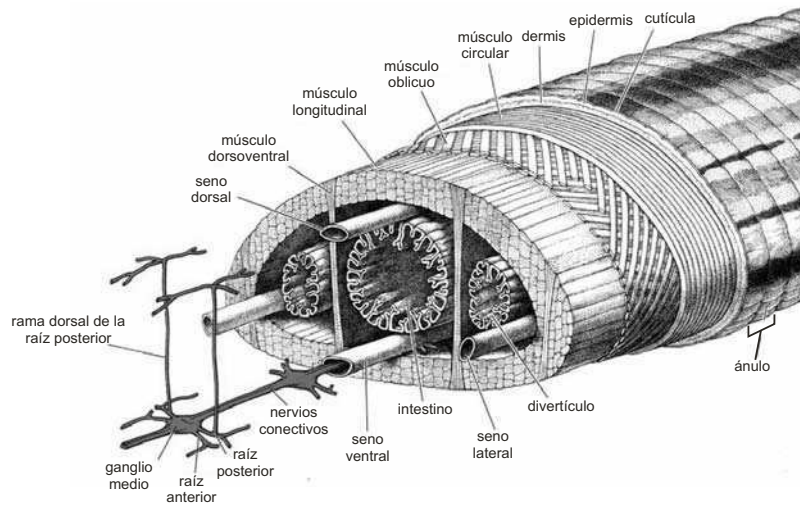


Figura 1.1: A. Esquema del cuerpo de la sanguijuela, en vista dorsal y lateral. B. Vista ventral, con la ubicación del sistema nervioso. C. Corte transversal. Todos los esquemas fueron tomados de Nicholls et al. (1992).

duos, lo cual permitió trazar un mapa que grafica la ubicación y el tamaño de los somas de las neuronas que los componen (Figura 1.2, Muller et al., 1981). Cada ganglio contiene alrededor de 200 pares bilaterales de neuronas y unas pocas neuronas impares. Todas las neuronas de la sanguijuela son monopolares. Una sola rama sale del soma formando un tronco relativamente grueso, a partir del cual salen ramificaciones de diferentes calibres. El tamaño de sus somas oscila entre los pocos micrones y las decenas de micrones y se localizan en dos monocapas, una en la cara ventral y otra en la cara dorsal del ganglio, alrededor de un neuropilo central, donde ocurren la mayoría de las interacciones sinápticas (Fernandez, 1978). Debido a esta organización, es relativamente sencillo realizar registros electrofisiológicos del soma neuronal de la mayoría de las neuronas de la sanguijuela. Se han identificado las neuronas sensoriales que responden a estímulos mecánicos ejercidos sobre la pared corporal (Nicholls y Baylor, 1968), las motoneuronas efectoras de los distintos grupos de fibras musculares (Stuart, 1970), interneuronas que participan en diferentes circuitos motores y diversas neuronas modulatorias (Kristan et al., 2005). Tal identificación se realiza tomando en cuenta la ubicación del soma neuronal en el ganglio (Figura 1.2) y las propiedades electrofisiológicas particulares.

Neuronas motoras de la sanguijuela

La estructura de todas las neuronas motoras de la sanguijuela sigue un mismo patrón general: el tronco que emerge del soma cruza la línea del eje antero-posterior del ganglio y sale por una o ambas raíces inervando fibras musculares del hemisegmento contralateral. Del tronco se extienden ramificaciones tanto en el hemiganglio ipsilateral como en el contralateral, en las cuales se reciben señales de otras neuronas y desde las cuales se emiten señales a nivel del sistema nervioso central.

El registro somático de los potenciales de acción en estas neuronas es de entre 2 y 10 mV, dependiendo de las motoneuronas. La interpretación clásica sugiere que éstos serían versiones atenuadas de potenciales de acción canónicos disparados en sitios distantes al soma (Stuart, 1970). En apoyo a esta

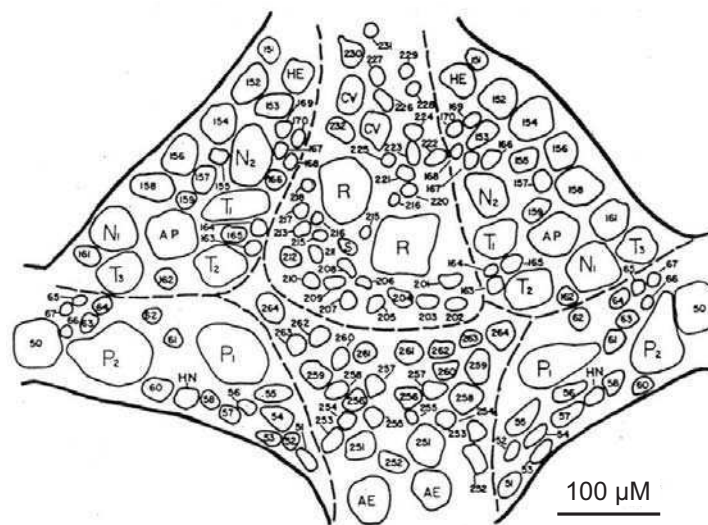


Figura 1.2: Mapa de la cara ventral de un ganglio medio de sanguijuela indicando las posiciones de los somas de las neuronas (Muller et al., 1981). Anterior es arriba. En la zona posterior se encuentran los somas de las neuronas AE. Adyacentes a estas, las neuronas NUT se ubican en las posiciones 251. Existe un mapa similar para la cara dorsal del ganglio.

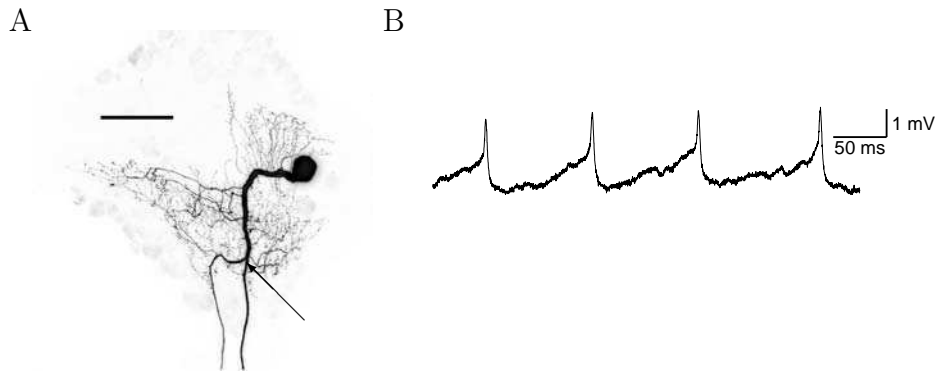


Figura 1.3: A. Morfología de una motoneurona AE obtenida mediante microscopía confocal. La flecha indica el sitio de inicio de Potenciales de Acción estimado por Gu et al. (1991). Las manchas grises representan la autofluorescencia de neuronas no teñidas y permiten distinguir el área del ganglio. Anterior es a la izquierda. Barra de escala: $100\ \mu\text{m}$. B. Ejemplo de Potenciales de Acción registrados en el soma de una motoneurona AE.

hipótesis, Gu et al. (1991) observaron en las neuronas erectoras de los anillos de la piel (neuronas AE) que el sitio de inicio de los potenciales de acción está ubicado en el punto de bifurcación del tronco, cerca del límite del ganglio (Figura 1.3 A). En registros somáticos, los potenciales de acción tienen unos $3 - 5\ \text{mV}$ de amplitud (Figura 1.3 B). Existe un par de neuronas AE por ganglio y éstas están débilmente acopladas entre sí por sinapsis eléctricas (Gu et al., 1991; Rela y Szczupak, 2003). La activación de estas neuronas causa la indentación de la piel, haciendo que su superficie pase de una textura lisa a una rugosa. Rodriguez et al. (2004) mostraron que esta modificación puede regular la respuesta neuronal frente a estímulos mecanosensoriales.

Objetivos

Nos propusimos estudiar la transmisión de señales graduales dentro de las motoneuronas AE, a partir de la construcción de modelos morfoeléctricos de las mismas. Investigamos en qué medida la forma que adquieren los registros somáticos de los potenciales de acción de las neuronas AE pueden explicarse en base a la morfología neuronal. Estudiamos la dependencia de la atenuación con la frecuencia, y analizamos el efecto de diferentes aspectos de la

morfología neuronal. Dado que la atenuación de las señales depende de sus componentes frecuenciales, consideramos la propagación de señales con distintas características: potenciales de acción, corriente sostenida y potenciales sinápticos.

Dadas las similitudes morfológicas y fisiológicas de las motoneuronas AE con las otras motoneuronas de la sanguijuela, esperamos que la mayoría de las conclusiones de este estudio sean aplicables también a las demás motoneuronas. Además, consideramos que este trabajo ilustrará el efecto de la morfología neuronal sobre la transmisión de señales para una geometría diferente de la de las neuronas más comúnmente modeladas, como són las neuronas piramidales y las neuronas de Purkinje en la corteza cerebral del mamífero. Esto contribuirá a ampliar la visión que se tiene sobre la integración de señales en el árbol neurítico. Consideramos a este trabajo como un aporte al conocimiento sobre cómo las neuronas biológicas llevan a cabo su función.

Organización del trabajo

El presente trabajo se organiza de la siguiente manera.

En el Capítulo 2 analizamos la anatomía de neuronas AE, obteniendo los modelos morfológicos detallados a partir de los cuales construiremos los modelos compartimentales.

En el Capítulo 3 estudiamos la fisiología de las neuronas AE, obteniendo los parámetros necesarios para construir un modelo biofísico. Obtenemos además la forma precisa de los potenciales de acción medidos en el soma.

En el Capítulo 4 damos una breve introducción a las técnicas de modelado utilizadas, y construimos modelos biofísicos a partir de los datos morfológicos y electrofisiológicos obtenidos previamente. Simulamos la propagación de corriente a lo largo del tronco principal de la neurona y analizamos su atenuación en ambos sentidos. A través de alteraciones en la morfología analizamos qué aspectos de la misma son los más relevantes en determinar la atenuación.

En el Capítulo 5 desarrollamos una técnica de deconvolución del potencial registrado en un punto, que nos permite estimar la corriente y el potencial

en un punto remoto, considerado el sitio de origen de la señal. La aplicamos a los potenciales de acción obtenidos en el Capítulo 3.

Por último, en el Capítulo 6 analizamos y discutimos los resultados obtenidos.

Capítulo 2

Morfología

En este capítulo estudiaremos los detalles anatómicos de la neurona AE con el objetivo de obtener un modelo morfológico que sirva de base para analizar la propagación pasiva en su árbol neurítico. Si bien la morfología de la neurona AE ya fue presentada previamente (Stuart, 1970; Muller y McMahan, 1976), el estudio cuantitativo que nos propusimos requiere obtener los datos de manera directa y con gran detalle anatómico.

2.1 Materiales y métodos

2.1.1 Preparación biológica

Se utilizaron sanguijuelas de la especie *Hirudo verbana*, con un peso entre 2 y 5 g. Los animales fueron adquiridos a un proveedor comercial (Leeches USA, NY) y mantenidos en el medio salino comercial Instan Ocean (Aquarium Systems, Mentor, Ohio, Estados Unidos) utilizando una dilución 1:1000 con respecto a la recomendada para alojar peces marinos. Se los mantuvo a 15°C, bajo un ciclo luz/oscuridad de 12 hs/12 hs. Los animales no fueron alimentados por al menos un mes antes de ser utilizados.

Los animales fueron disecados en solución salina normal fría. Se extrajeron ganglios aislados. Los mismos fueron montados con su cara ventral hacia arriba en placas de Petri llenas de solución normal cuya base contenía una capa de Sylgard184 (Dow Corning, Midland, Michigan, Estados Unidos). El

tejido que empaqueta los somas neuronales (*sheath*) fue removido. Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (20 – 25°C).

La solución normal utilizada para bañar las preparaciones tuvo la siguiente composición (en mM): NaCl, 115; KCl, 4; CaCl₂, 1.8; MgSO₄, 1; Tris, 5.4 (pH 7,4).

2.1.2 Tinción de neuronas y obtención de imágenes

Las neuronas fueron cargadas con fluoróforos mediante iontoforesis. Se llenaron electrodos con Tetrametilrodamina Dextrano (3000MW) al 5 % o Alexa Fluor 488-Dextrano (10000MW) al 7 % en agua bidestilada. Las resistencias de los electrodos con estas soluciones estuvieron en un rango de entre 80 y 200 MΩ. Las neuronas AE fueron identificadas por su posición, tamaño y propiedades electrofisiológicas. Se aplicaron pulsos cuadrados de corriente de +3 nA, 1 Hz, 50 % duty cycle, por un tiempo de entre 20 y 35 min.

Luego de inyectados, los ganglios fueron fijados manteniéndolos hasta el día siguiente a 8°C en una solución de paraformaldehído 4 %. A continuación fueron lavados con buffer fosfato 0,1 M y deshidratados en una serie ascendente de concentraciones de etanol. Luego fueron clareados en metilsalicilato y montados en DePeX (VWR International, UK). Los ganglios fueron montados entre dos cubreobjetos separados por pedazos de cubreobjeto, de manera que sufrieran la menor deformación posible en el sentido dorso-ventral.

Las imágenes de las neuronas fueron obtenidas en un microscopio Olympus BX61 con unidad confocal FV300 y objetivo Olympus PLAPO60X02, NA 1,4 o en un microscopio Olympus BX61WI con unidad confocal FV1000 y objetivo Olympus UPLSAPO60XW, NA 1,2.

Las imágenes fueron adquiridas con una resolución de 1024 × 1024 pixels. A esta resolución y magnificación, el tamaño de un pixel en el plano horizontal para la unidad FV300 es de 0,230 × 0,230 μm, mientras que para la FV1000 es de 0,207 × 0,207 μm. Los planos fueron tomados con un espaciado en el eje Z que de manera que los voxels fueran cúbicos: 0,23 μm en la FV300 y 0,20 μm en la FV1000.

Para la rodamina se usó un láser HeNe-G de 543 nm y 1 mW de potencia,

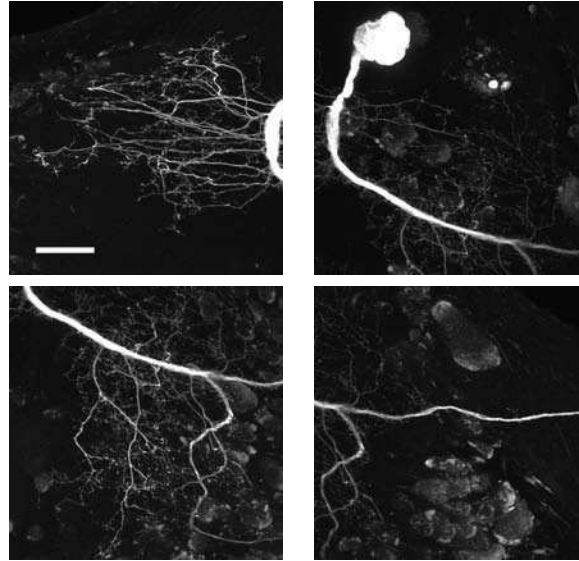


Figura 2.1: Proyecciones de máxima intensidad sobre el plano XY de imágenes obtenidas por microscopía confocal de los distintos volúmenes que comprenden a la motoneurona AE nI. Las imágenes se componen de 362, 628, 525 y 386 planos respectivamente. Barra de escala: $50 \mu\text{m}$.

con un filtro ND de 40%. Para el Alexa Fluor 488, un láser de Argón de 488 nm y 10 mW, con filtro ND de entre 5 y 10%.

A esta magnificación, las neuronas no entraban en el campo visual del microscopio. Se debieron adquirir varias columnas para obtener la imagen de una neurona completa. (Ver Figura 2.1). Fueron necesarias unas 4 columnas cuando se trataba de una sola neurona, y 5 o 6 cuando se quería obtener la imagen de las dos AE de un ganglio.

Los somas de las neuronas fueron escaneados por separado con una resolución menor.

El árbol dendrítico de AE tiene un espesor del orden de $80 \mu\text{m}$ en el eje Z, resultando aproximadamente en unos 600 Mb por canal para cada columna. Debido a que el programa de adquisición requiere guardar todo el stack en memoria, y no soporta más de 1 Gb, algunas columnas debieron a su vez ser adquiridas en 2 subvolúmenes.

2.1.3 Procesamiento

Manipulación de imágenes TIFF

El proceso de escaneado genera archivos TIFF multiimagen de gran tamaño, en el orden de 1 Gb. Desarrollamos una herramienta (que llamamos `rtiff`) para manipulaciones simples de este tipo de archivos que, a diferencia de la mayoría de las herramientas disponibles, no requiere cargar el volumen completo en memoria.

Esta herramienta nos permite, entre otras cosas, convertir entre 8, 12 y 16 bits por pixel, separar canales, extraer subvolúmenes y obtener proyecciones e histogramas.

La herramienta fue desarrollada en lenguaje C, usando la librería `libtiff`.

Deconvolución de imágenes

La imagen de un objeto obtenida mediante un sistema de adquisición está siempre sujeta a un borronado (*blur*), producto de las limitaciones intrínsecas de todo sistema óptico. Una manera de modelar el fenómeno es pensar que un objeto puede ser representado como un conjunto de fuentes puntuales de luz. Si las condiciones de adquisición fueran ideales, la imagen de cada fuente puntual sería un punto. Los efectos de difracción debidos a la apertura finita del objetivo y las aberraciones ópticas producen, sin embargo, una difusión de la imagen tridimensional de un punto, que es caracterizada por la Función de Difusión Puntual (PSF, por *Point Spread Function*). Podemos describir entonces la imagen de cualquier objeto como la convolución entre el objeto y la PSF del sistema de adquisición. La columna izquierda de la Figura 2.2 muestra una PSF típica de microscopía de fluorescencia de campo amplio (*widefield*). Como se ve en el plano XZ, gran parte de la señal queda fuera del plano focal, con lo que la imagen adquirida de un plano estará contaminada por la señal de los planos adyacentes. Pero como se puede apreciar en el plano XY, también hay contaminación en el mismo plano focal. Esto se presenta como un “halo” que rodea los objetos. Los radios de las neuritas de las neuronas que estudiamos suelen estar por debajo de los $0,5 \mu\text{m}$, por lo que este fenómeno no es despreciable.

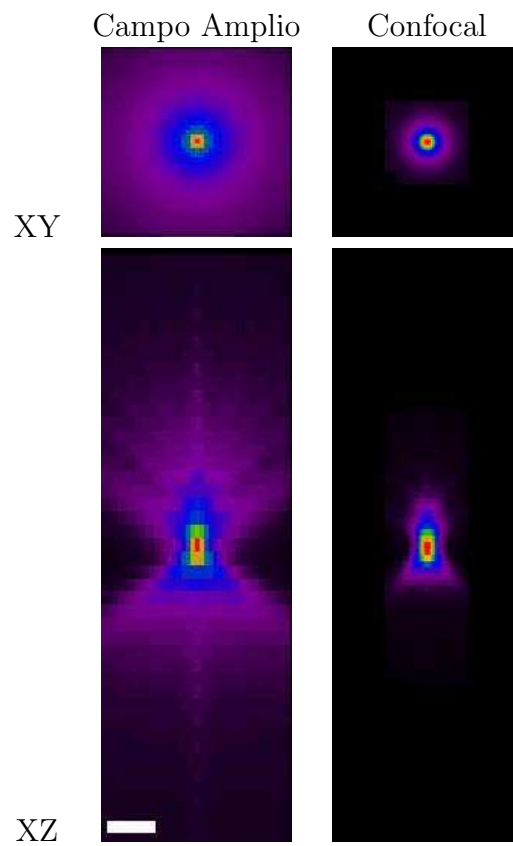


Figura 2.2: Funciones de Difusión Puntual calculadas teóricamente para un sistema de adquisición de imágenes de fluorescencia de campo amplio (*wide-field*) y uno confocal. Barra de escala: $1 \mu\text{m}$.

La columna derecha de la Figura 2.2 muestra la PSF de un sistema de adquisición confocal. Se puede ver que gran parte de la luz fuera de foco es descartada gracias a la ranura confocal (*pinhole*). Sin embargo, la imagen aún dista bastante de ser un punto, por lo que se puede beneficiar considerablemente por técnicas de *deconvolución*. Éstas consisten en buscar revertir el proceso de convolución entre el objeto original y la PSF, y para lograr este objetivo hay distintas variantes. Algunas se basan en conocer la PSF, y mediante técnicas iterativas estimar el objeto que convolucionado con la PSF produzca una imagen similar a la adquirida. Pero para ello es necesario o bien calcular teóricamente o determinar experimentalmente la PSF. El principal problema en ambos casos es que pequeñas variaciones en las condiciones experimentales pueden producir cambios en la PSF por lo que las PSFs obtenidas no serían adecuadas para reconstruir la imagen. Los métodos de deconvolución ciega (*blind deconvolution*), por otra parte, a la vez que ajustan la estimación del objeto ajustan simultáneamente una estimación de la PSF. El software AutoDeblur (AutoQuant Imaging) implementa este método satisfactoriamente. El proceso de deconvolución mejora la resolución, disminuyendo el “halo” que rodea a las neuritas, particularmente en el eje Z (Figura 2.3, comparar segunda columna con la primera).

Filtrado anisotrópico

Aun luego de deconvolucionadas, las imágenes adquiridas presentan un importante nivel de ruido y disparidad de la distribución de la señal a lo largo de las neuritas. Broser et al. (2004) desarrollaron un filtro no lineal de difusión anisotrópica. El mismo está diseñado específicamente para mejorar imágenes de neuronas. Los filtros de difusión simulan un proceso físico de difusión de la señal mediante ecuaciones en derivadas parciales. Un filtro de difusión lineal homogénea es equivalente a aplicar un filtro gaussiano, es decir un filtro pasabajos que homogeneiza la señal pero a su vez difumina los bordes. El filtro de Broser et al., en cambio, está diseñado de manera que difunda la señal en la dirección del eje de las neuritas, y no en la dirección perpendicular. En la tercer columna de la Figura 2.3 se puede ver cómo el filtro reduce el ruido y

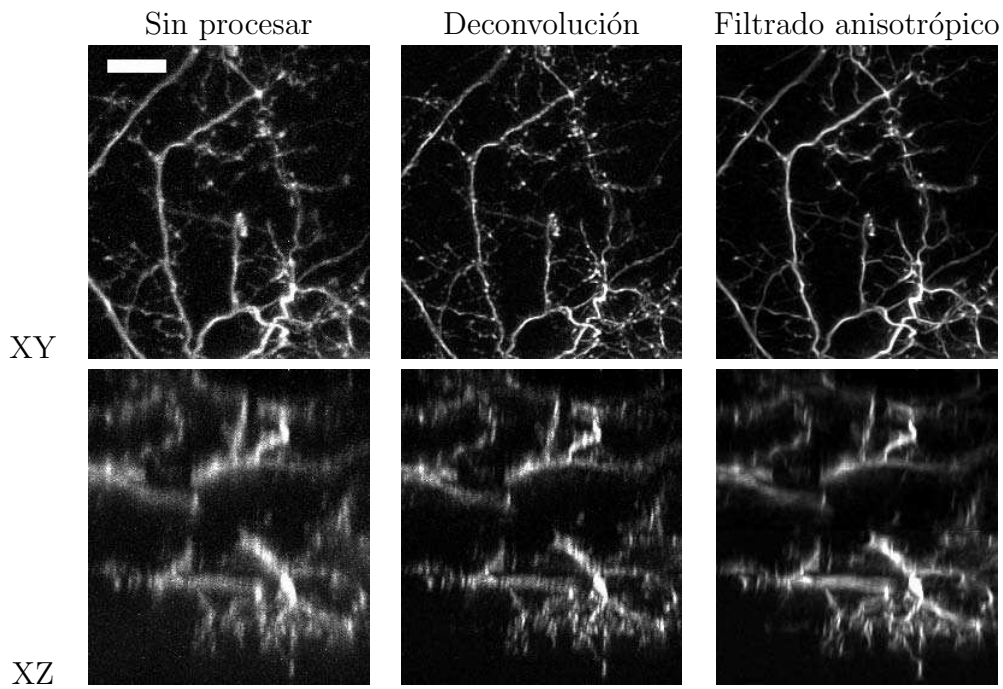


Figura 2.3: Pasos del procesamiento de imágenes previo a la reconstrucción. Proyecciones de máxima intensidad de un subvolumen de la neurona nIIa sobre el plano XY en la fila superior, y sobre el plano XZ en la fila inferior. Primer columna: imagen sin procesar. Segunda columna: después de la deconvolución. Tercer columna: después del filtrado anisotrópico. Comparando la fila superior con la inferior se puede observar que la resolución es mucho mejor en el plano XY que en el eje Z. Comparando la segunda columna con la primera se puede observar la mejora en resolución por la deconvolución. Comparando la tercer columna con la segunda se puede ver cómo el filtrado anisotrópico mejora la señal disminuyendo el ruido sin perder los bordes. El subvolumen comprende $234 \times 260 \times 262$ pixels. Barra de escala: $10 \mu\text{m}$.

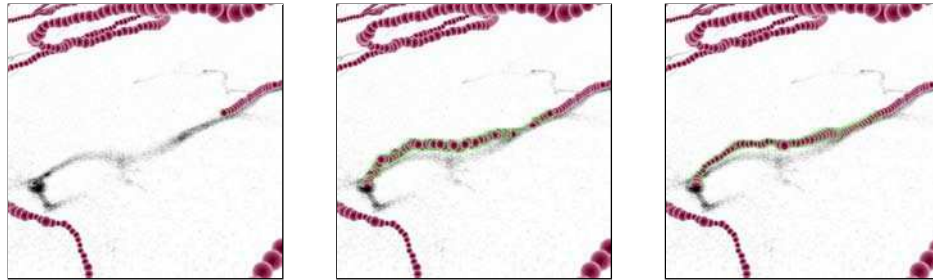


Figura 2.4: Proceso de reconstrucción de la morfología neuronal. Izquierda: se seleccionó el extremo de una neurita que se quiere recorrer, en el centro del campo. Centro: Primera aproximación hecha por el programa. Derecha: Resultado luego de ajustarse a la línea central y al diámetro de la neurita.

homogeneiza la señal, pero manteniendo los bordes.

2.1.4 Reconstrucción

Evers et al. (2005) desarrollaron un módulo para reconstruir morfologías neuronales a partir de imágenes confocales. El mismo está desarrollado como un *plug-in* para el programa de visualización Amira y permite una reconstrucción “semiautomática”. El usuario marca dos puntos de una neurita y el programa los une automáticamente siguiendo la intensidad de la imagen, adaptándose a la forma y determinando la línea central y el diámetro de la neurita (Figura 2.4). De esta manera se puede ir construyendo el árbol dendrítico especificando únicamente los puntos de bifurcación y algunos puntos intermedios. El diámetro de las neuritas fue medido por el programa en segmentos de $0,5 \mu\text{m}$ de longitud.

El tamaño de los stacks de imágenes impedía cargar todos los volúmenes simultáneamente en memoria. La reconstrucción se realizó cargándolos de a uno por vez. Las posiciones relativas de los volúmenes que comprenden a una neurona fueron determinadas con la ayuda del software VIAS (Volume Integration and Alignment System, Rodriguez et al., 2003). Éste permite trabajar con las proyecciones de máxima intensidad de los volúmenes en los distintos planos (XY, YZ, XZ) (Figura 2.5).

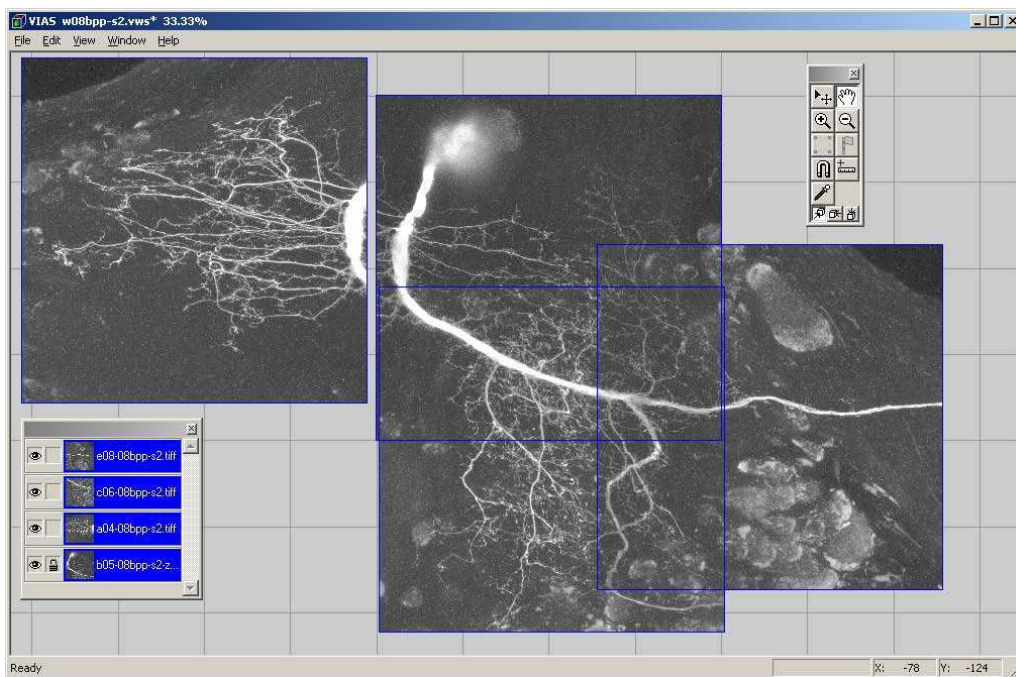


Figura 2.5: Determinación de las posiciones relativas de los distintos volúmenes que comprenden a una neurona utilizando el software VIAS. Los tres volúmenes de la derecha ya fueron alineados entre sí en el plano XY. El volumen de la izquierda aún debe ser alineado con los demás.

Código	Ganglio	Res (μm)	AE Izq	AE Der	Sist
nI	M11	0.23 x 0.23 x 0.23	nI TR	-	FV300
nII	M8	0.23 x 0.23 x 0.23	nIIa AF488	nIIb TR	FV300
nIII	M11	0.20 x 0.20 x 0.20	nIIIa AF488	nIIIb TR	FV1000

Tabla 2.1: Datos de las 5 neuronas AE reconstruidas, provenientes de tres ganglios de tres animales distintos. TR: Tetrametilrodamina Dextrano. AF488: Alexa Fluor 488 Dextrano.

Las morfologías reconstruidas fueron exportadas en el formato SWC (Canon et al., 1998).

2.1.5 Estadísticas morfométricas

Las morfologías obtenidas fueron importadas en una base de datos relacional mediante rutinas desarrolladas en Matlab.

Los datos fueron obtenidos mediante consultas SQL y rutinas Matlab, y las figuras fueron generadas mediante rutinas Matlab.

2.2 Resultados

Adquirimos imágenes de un total de 5 neuronas, provenientes de tres ganglios, según se detalla en la Tabla 2.1.

La Figura 2.6 muestra las composiciones de las proyecciones de máxima intensidad de las imágenes obtenidas para cada neurona en forma independiente. En las Figuras 2.7 y 2.8 se muestran juntos los pares de neuronas pertenecientes a un mismo ganglio.

Las imágenes obtenidas resultaron adecuadas para el proceso de reconstrucción, permitiendo resolver los árboles dendríticos con gran detalle.

La Figura 2.9 muestra las reconstrucciones detalladas obtenidas, sin incluir los somas. La longitud total de las neuritas reconstruidas estuvo entre 10 y 14 mm por neurona (Tabla 2.2). Como el diámetro fue medido cada 0,5 μm , esto resultó en un orden de entre 20000 y 28000 segmentos por neurona.

Todas las neuronas reconstruidas siguen la misma morfología general. Del

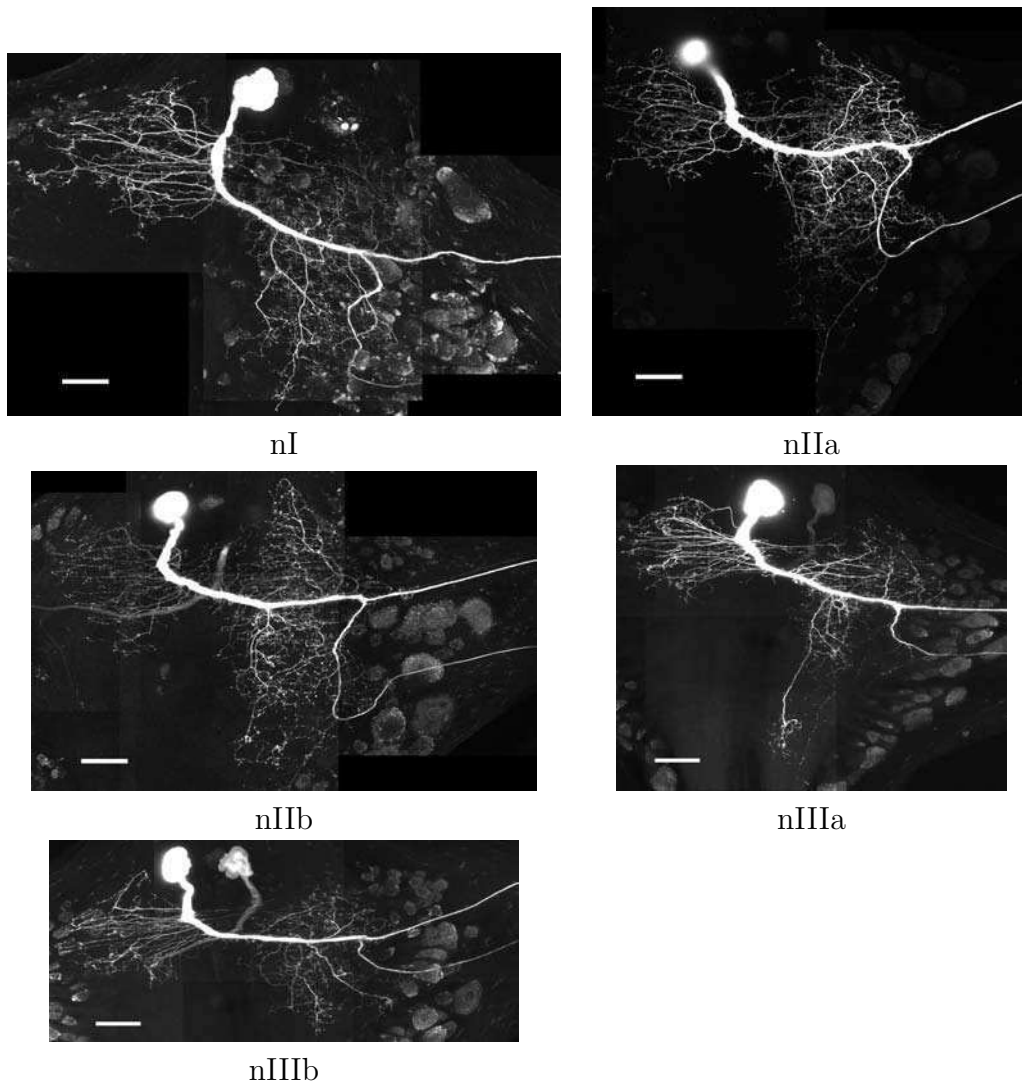


Figura 2.6: Composición de las proyecciones de máxima intensidad en el plano XY de los volúmenes que componen a cada motoneurona AE reconstruida. Las imágenes fueron rotadas y/o volteadas para que las neuronas queden en posiciones similares. Barra de escala: 50 μm .

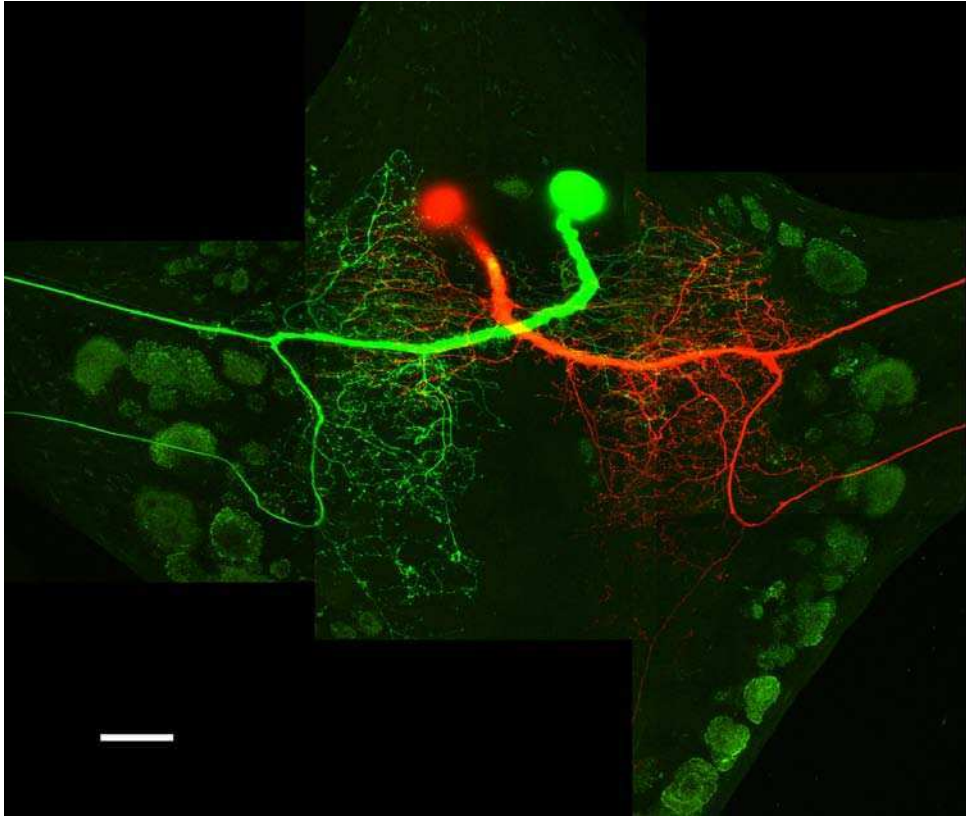


Figura 2.7: Composición de las proyecciones de máxima intensidad en el plano XY de los volúmenes correspondientes al ganglio nII, en el que se teñieron ambas motoneuronas AE. Una de las neuronas fue teñida con Tetrametilrodamina Dextrano (rojo) y la otra con Alexa Fluor 488 Dextrano (verde). Barra de escala: 50 μm .

Neurona	Long total (μm)	# Secc.	Long. Prom. Secc. (μm)	# Ramas Tronco	Máx. orden R. Tronco
nI	14282	737	19	29	16
nIIa	13794	803	17	27	16
nIIb	13793	739	19	31	18
nIIIa	10337	752	14	27	20
nIIIb	10865	862	13	26	17

Tabla 2.2: Suma de longitudes, Cantidad de secciones no bifurcadas, Longitud promedio de sección, Cantidad de ramas emergentes del Tronco, Máximo orden de bifurcación de ramas emergentes del tronco.

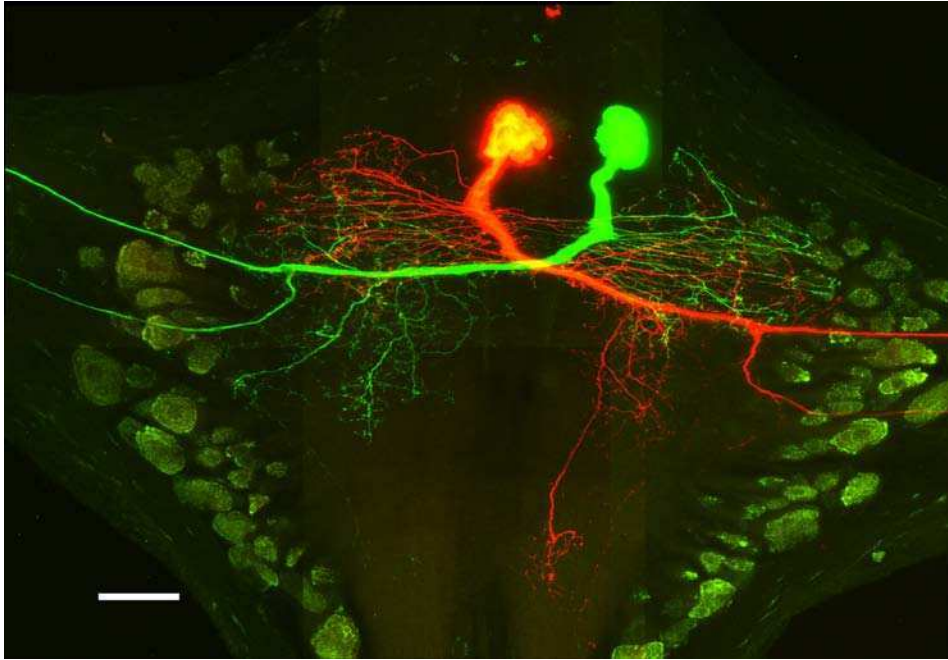


Figura 2.8: Idem Figura 2.7 para el ganglio nIII.

soma sale un tronco que atraviesa el ganglio hacia el extremo contralateral y se bifurca para dar lugar a los axones que salen del ganglio hacia las raíces anterior y posterior. Esto resulta congruente con el hecho de que en la sanguijuela las neuronas motoras inervan la musculatura del lado contralateral a la ubicación del soma (Stuart, 1970). Estudios realizados por Gu et al. (1991) mostraron que el sitio de inicio de los potenciales de acción en estas neuronas motoras se halla en este punto de bifurcación. Del tronco y los axones salen numerosas ramas más finas. Se dividió a las neuronas en cuatro regiones: Tronco, Axones, Neuritas que salen del tronco, y Neuritas que salen de los axones. Cada una se muestra en un color distinto. Las neuritas parecen ocupar las mismas regiones del ganglio en cada caso.

A pesar de las coincidencias, en los trazos de tronco y axones, las neuritas muestran variabilidad en la cantidad de ramas que salen del tronco (Tabla 2.2).

En la Figura 2.10 A se muestra la longitud total de los segmentos que componen cada región de las neuronas reconstruidas. Se observa que la lon-

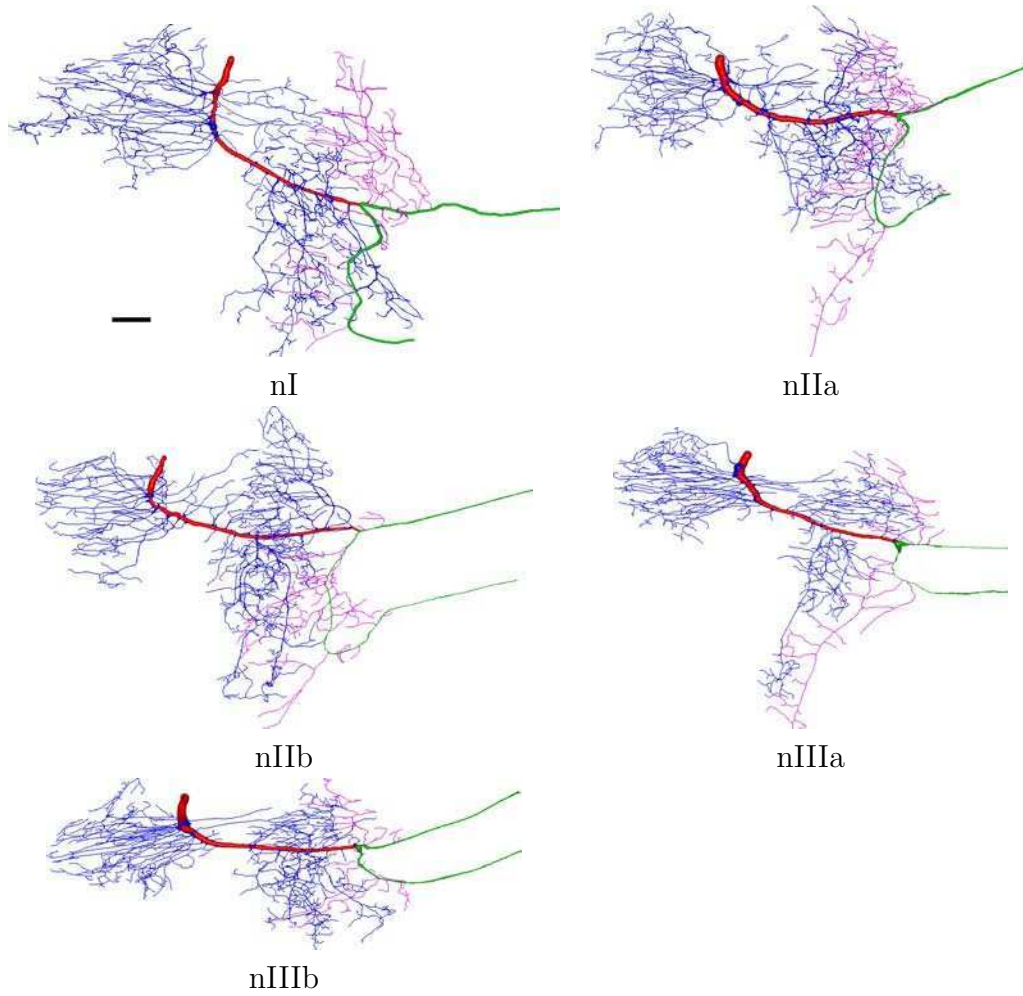


Figura 2.9: Reconstrucciones detalladas de las cinco motoneuronas AE estudiadas. Los somas no se muestran. Los distintos colores corresponden a diferentes regiones de la neurona: Tronco (tr, rojo), Axones (ax, verde), neuritas que salen del tronco (trneur, azul) y neuritas que salen de los axones (axneur, magenta). Barra de escala: $50 \mu\text{m}$.

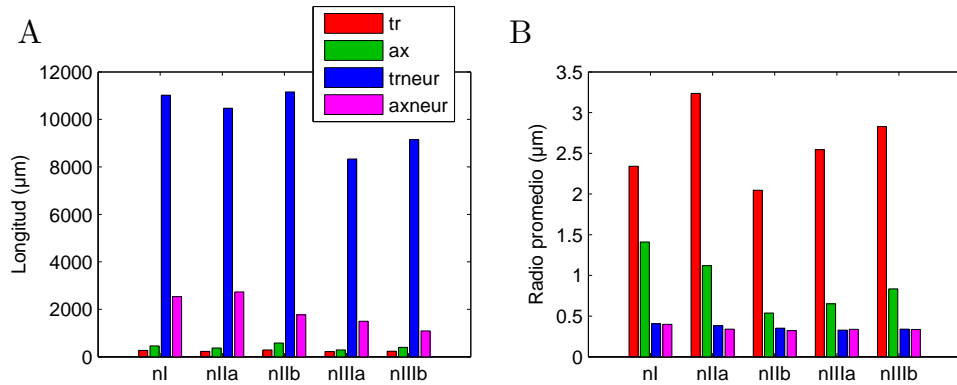


Figura 2.10: A. Longitud total de los segmentos que componen cada región de las neuronas reconstruidas. B. Radio promedio de los segmentos que componen cada región de las neuronas reconstruidas.

gitud total de las neuritas de las neuronas nIIIa y nIIIb es menor que las de las otras. Esto podría deberse a una menor calidad en la tinción o reconstrucción. Sin embargo, la Tabla 2.2 muestra que la cantidad de secciones no bifurcadas, la cantidad de ramas que emergen del tronco y el orden de bifurcación de dichas ramas son similares para todas las neuronas. La “complejidad” de los árboles dendríticos reconstruidos es similar, con una menor longitud promedio de sección para las neuronas del ganglio nIII.

En la Figura 2.10 B vemos los radios promedio de los segmentos que componen cada región. Se observa que en todos los casos el radio promedio de las neuritas que emergen del tronco es similar al de las neuritas que emergen de los axones. Además, estos radios son similares para todas las neuronas, con un promedio de $0,35 \pm 0,03 \mu\text{m}$.

Las Figuras 2.11 y 2.12 muestran en detalle cómo se distribuyen los radios de neuritas y ramas principales, respectivamente. En la Figura 2.13 graficamos el perfil del radio a lo largo del tronco de cada neurona reconstruida.

En la Figura 2.14 A comparamos las áreas aportadas por cada región para cada una de las neuronas estudiadas. A pesar de su menor diámetro, es claro que las neuritas aportan la gran mayoría de la superficie de membrana de las neuronas, en virtud de ser la región neuronal de mayor longitud total.

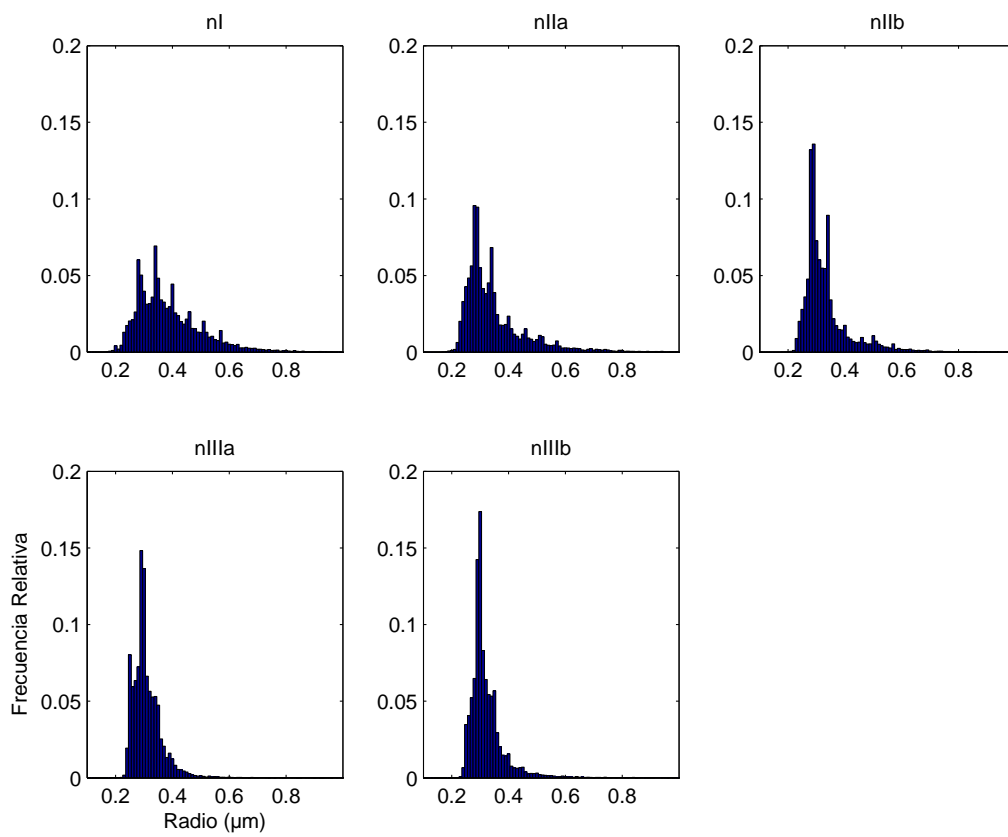


Figura 2.11: Histogramas de distribución de radios de las regiones trneur y axneur de cada neurona reconstruida.

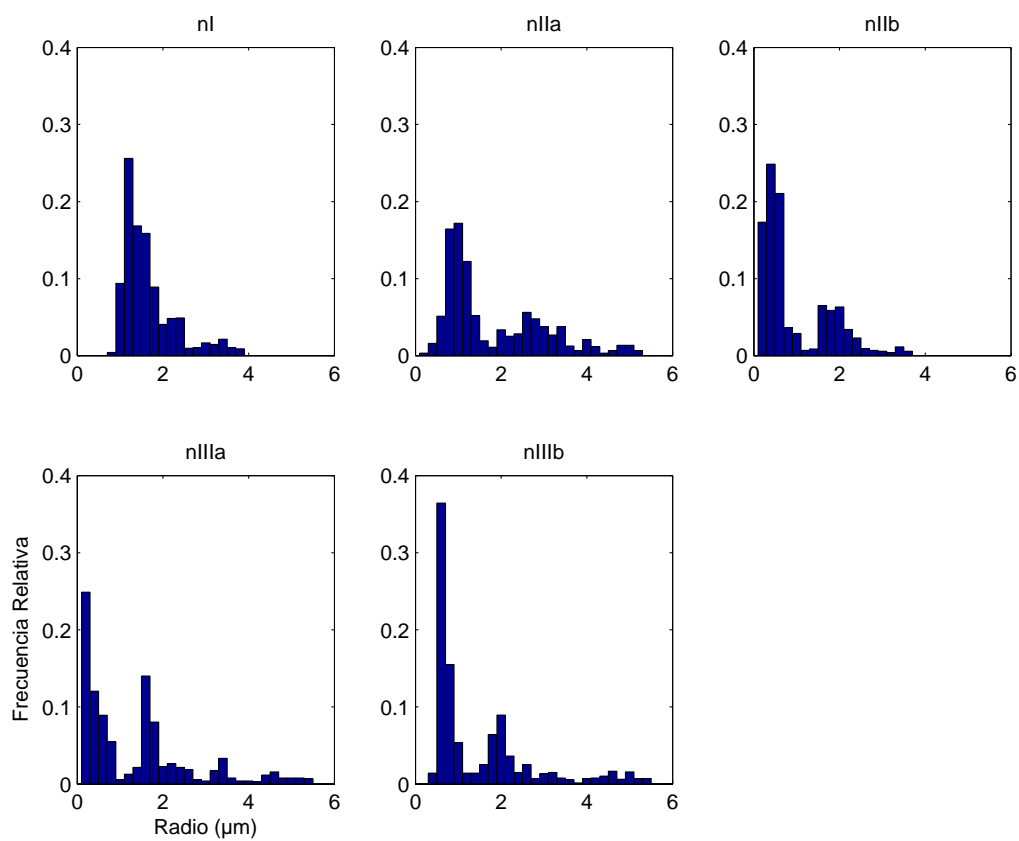


Figura 2.12: Histogramas de distribución de radios de las regiones tr y ax de cada neurona reconstruida.

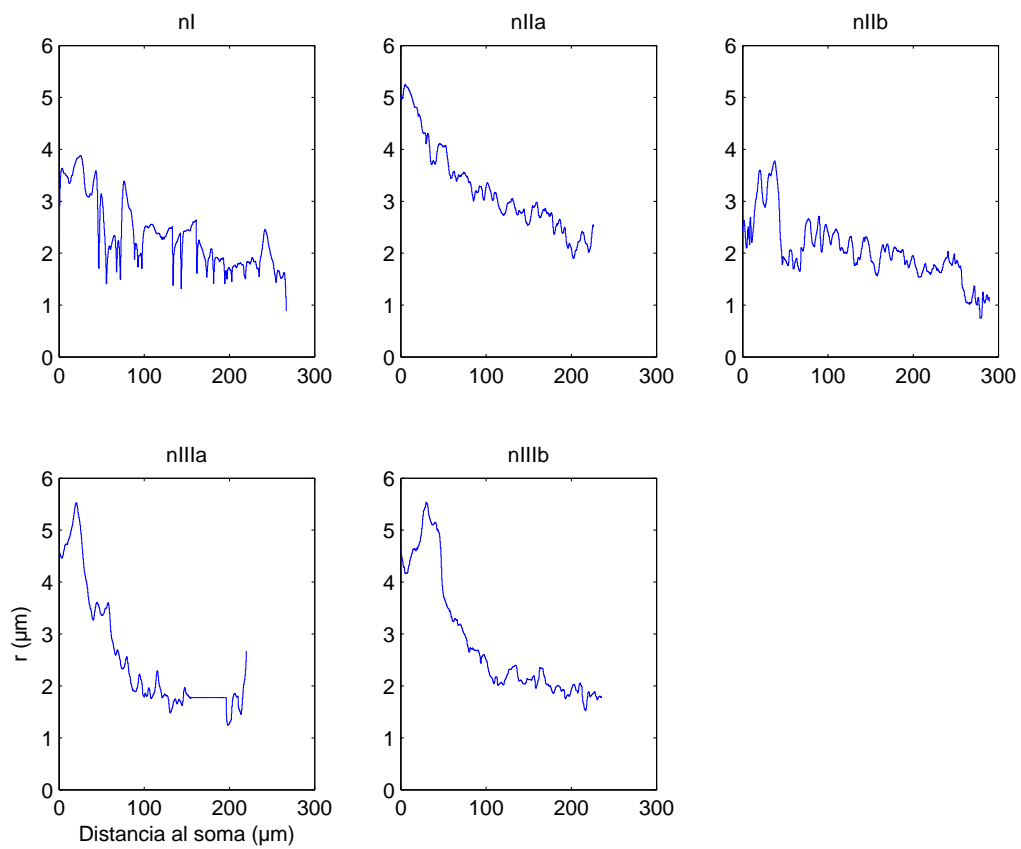


Figura 2.13: Radio del tronco en función de la distancia al soma para cada neurona reconstruida.

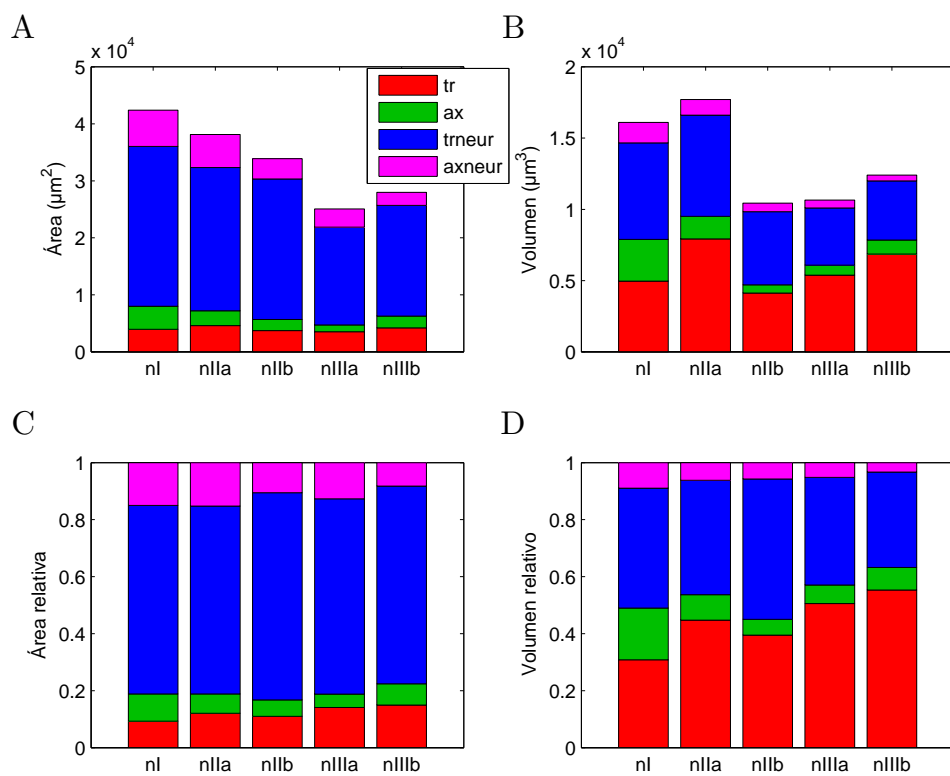


Figura 2.14: Áreas y volúmenes de las distintas regiones de cada una de las neuronas reconstruidas. A. Áreas absolutas. B. Volúmenes absolutos. C. Áreas relativas al total de cada neurona. D. Volúmenes relativos al total de cada neurona.

La Figura 2.14 C muestra que la proporción del área total aportada por cada región es similar para todas las neuronas reconstruidas, y el área aportada por las neuritas que emergen del tronco y los axones constituye aproximadamente el 80% del área total. Las Figuras 2.14 B y D muestran el aporte de volumen total y relativo de cada región, respectivamente. El tronco principal y el conjunto de las neuritas aportan porcentajes similares del volumen total de cada neurona.

Capítulo 3

Fisiología

En este capítulo estudiaremos las características electrofisiológicas básicas de las neuronas AE con el fin de poder obtener los parámetros necesarios para el modelado de las neuronas caracterizadas morfológicamente. Estas medidas incluirán la resistencia de entrada y las constantes de tiempo que nos permitirán deducir, junto con el análisis morfológico, las magnitud de las resistencia y la capacitancia membrana específicas.

Los potenciales de acción de todas las motoneuronas de la sanguijuela se propagan pasivamente hacia el soma, y por ello su amplitud es muy pequeña en registros somáticos (Stuart, 1970). Trabajos de Gu et al. (1991), utilizando técnicas de fotoablación y estudiando tiempos de propagación, establecieron que el potencial de acción se inicia en el punto de bifurcación. Nosotros utilizaremos el registro somático del potencial de acción como medida de la atenuación de la señal desde la bifurcación al soma (Capítulos 4 y 5).

3.1 Materiales y Métodos

3.1.1 Registros electrofisiológicos

Para la preparación biológica ver Sección 2.1.1.

Las neuronas AE individualizadas fueron registradas mediante electrodos intracelulares impalados en el soma neuronal. Los microelectrodos se fabricaron a partir de capilares de borosilicato de diámetro externo 1 mm e interno

0,75 mm (FHC, Bowdoinham, Maine, Estados Unidos) utilizando un estimador de micropipetas horizontal Sutter P 97 (Sutter Instrument, Novato, California, Estados Unidos) y fueron llenados con una solución de acetato de potasio 3 M. Se seleccionaron electrodos de 20 a 40 M Ω de resistencia. Se utilizó un amplificador diferencial Axoclamp 2B (Axon Instruments, Foster City, California, Estados Unidos) operando en la configuración de fijación de corriente continua (current clamp).

Una vez impalada la neurona, se esperaron 5 minutos antes de medir el potencial de membrana e iniciar el protocolo experimental. Durante este período se observó en algunos registros un aumento en el valor absoluto del potencial de membrana, debido probablemente al sellado del daño inicial generado en la membrana al penetrarla con el electrodo.

Los registros fueron digitalizados a frecuencias de 10 kHz mediante un conversor analógico-digital Digidata 1320 (Axon Instruments) y almacenados en una PC. Se utilizó el programa Clampex del paquete pClamp 9.0 (Axon Instruments) para definir los protocolos de adquisición, controlar a la Digidata y almacenar los registros.

La inyección de corriente a través del electrodo de adquisición produce una desviación en el potencial registrado. Ésta fue compensada mediante la función *bridge balance* del Axoclamp. La correcta calibración de la misma fue corroborada cambiando al modo *discontinuous current clamp* (DCC) y verificando que las lecturas de potencial durante la inyección de corriente coincidieran en ambos casos. No se utilizó el modo DCC para la adquisición debido al mayor ruido de alta frecuencia que suelen presentar los registros adquiridos en este modo.

Los protocolos de adquisición fueron definidos en Clampex y las formas de corriente inyectadas fueron generadas por la Digidata.

Inyectamos pulsos cuadrados de corriente de 4 s de duración y amplitud variable en neuronas AE (Figura 3.1 A).

Para el análisis de cada registro se consideraron intervalos de 4 s de duración antes, durante, y después del pulso (Figura 3.1 B). Para cada intervalo se calculó el potencial promedio y se detectaron los potenciales de acción (ver a continuación). Esto último permitió calcular la frecuencia de disparo

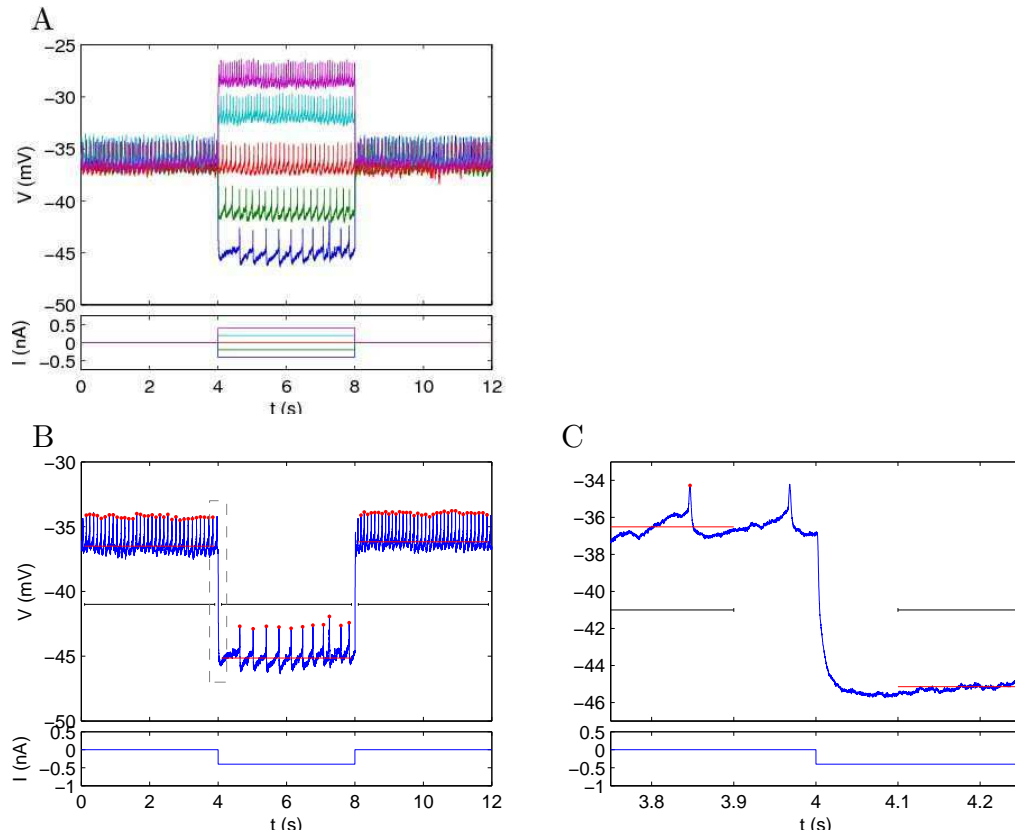


Figura 3.1: A. Registros representativos de una neurona AE, en la cual se inyectaron pulsos cuadrados (4 s) de corriente de amplitud variable. Los colores indican la correspondencia entre la corriente inyectada (I) y el cambio de potencial resultante (V_m). B. La figura muestra uno de los registros indicando mediante segmentos de línea los intervalos considerados para el análisis: 4 s antes, durante, y luego del pulso. Para cada intervalo se calculó el potencial promedio (línea roja horizontal) y se detectaron los potenciales de acción (los puntos rojos indican los picos). Se dejaron fuera del análisis intervalos de 100 ms alrededor del inicio y del final del pulso para evitar artefactos en la detección de potenciales de acción (ver Figura 3.2). C. Detalle en escala ampliada del área recuadrada con línea de puntos en B.

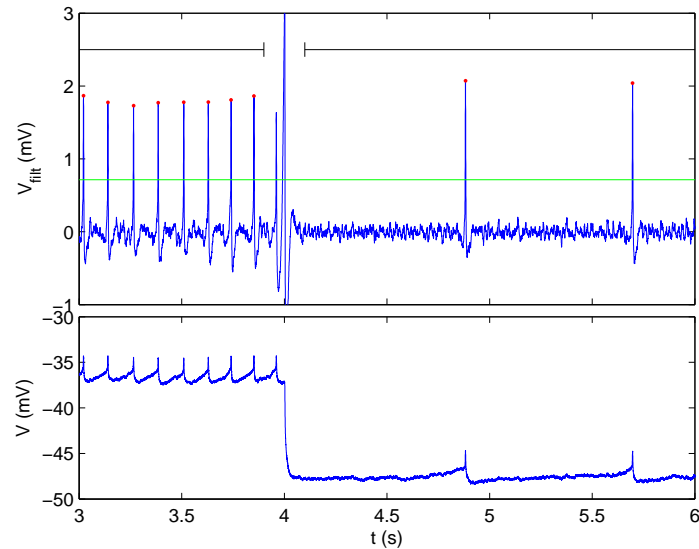


Figura 3.2: Proceso de detección de potenciales de acción. A la señal original (panel inferior) se le aplica un filtro pasabanda entre 30 y 300 Hz (panel superior). Se elige un umbral apropiado, en este caso de 7 desviaciones standard (línea verde). Se considera que hay potencial de acción en los tiempos en que la señal filtrada supera el umbral. Los puntos rojos marcan los picos. Los segmentos negros indican los intervalos analizados. Notar que el comienzo del pulso aparece como un gran artefacto, que queda fuera de los intervalos considerados.

promedio durante cada intervalo.

La Figura 3.2 describe el proceso de detección de potenciales de acción, basado en Quiroga et al. (2004).

3.2 Resultados

Resistencia de Entrada

Los potenciales de reposo de las neuronas AE estuvieron en un rango de -54 a -37 mV, con un promedio de $-45 \pm 6,9$ mV. Estos valores son similares a los reportados por Gu et al. (1991). Para estimar la resistencia de entrada, analizamos la relación entre el potencial de la membrana durante el pulso y la corriente inyectada (Figura 3.3 A). Las curvas presentan formas similares

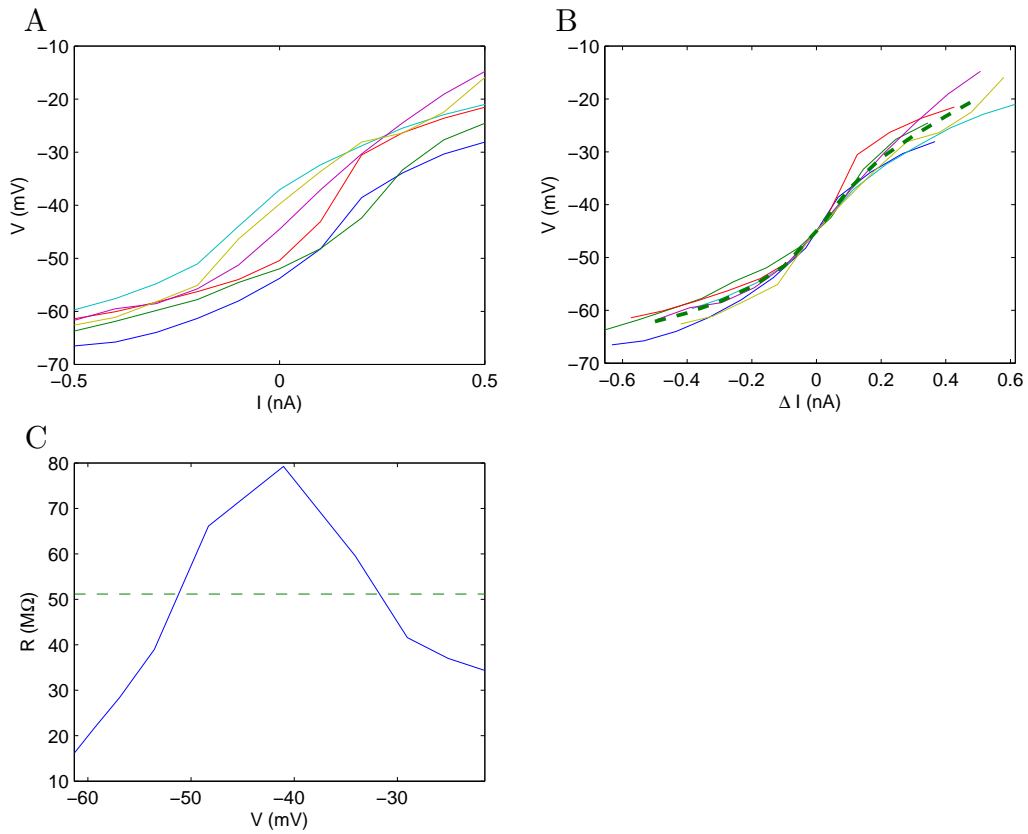


Figura 3.3: A. Potencial de membrana durante el pulso en función de la corriente inyectada. Cada trazo corresponde a una neurona. B. Potencial de membrana durante el pulso en función de la diferencia entre la corriente inyectada y la necesaria para llevar la neurona a -45 mV. La línea punteada representa el promedio de los trazos, calculado cada $0,1$ nA. C. Resistencia de entrada en función del potencial de membrana. La curva se obtuvo derivando el trazo promedio de B. La línea punteada representa el valor promedio de la curva: $51,2 M\Omega$.

pero con cierta dispersión en el eje vertical. Tomando como hipótesis que las principales conductancias dependen del valor absoluto del potencial de membrana, volvemos a graficar los datos poniendo en el eje X la diferencia entre la corriente inyectada y la necesaria para llevar cada neurona al potencial de reposo promedio (-45 mV, Figura 3.3 B). Las curvas así obtenidas presentan mayor coherencia. Está claro que la relación V-I no es lineal. La curva promedio muestra una rectificación hacia ambos lados. Esta rectificación es típica de las motoneuronas de la sanguijuela (Mangan et al., 1994), y ya fue mostrada para las AE por Rodríguez et al. (2004).

Derivando la curva promedio obtenemos la Figura 3.3 C, que muestra la resistencia de entrada en función del potencial de membrana. Para construir nuestro modelo lineal tomaremos en cuenta el valor medio de la curva, $51,2$ M Ω .

Constantes temporales

Para obtener las constantes temporales se analizaron los primeros 50 ms de la respuesta de la neurona frente a pulsos de corriente negativa. La respuesta fue ajustada por una suma de dos exponenciales de la forma $a_1 e^{-t/\tau_1} + a_2 e^{-t/\tau_2} + c$ (Golowasch et al., 2009, Figura 3.4). Se seleccionaron aquellos ajustes en que $R^2 > 0,99$ y la diferencia entre los extremos del intervalo de confianza para τ_1 fue menor a 3 ms. La Figura 3.4 B y C muestra los valores obtenidos para τ_1 y τ_2 , con promedios de 16,6 y 1,0 ms respectivamente [$n = 21$].

Frecuencia de disparo

La Figura 3.5 A muestra la frecuencia de disparo en función de la corriente inyectada. Se encuentra una gran variabilidad entre neuronas. Una primer causa de variabilidad son los distintos estados iniciales en los que se encuentran las neuronas, probablemente producidos por un involuntario daño variable al impalar la neurona. En la Figura 3.5 B graficamos la frecuencia de disparo en función del potencial en el soma durante el pulso. Obtenemos curvas más semejantes entre sí.

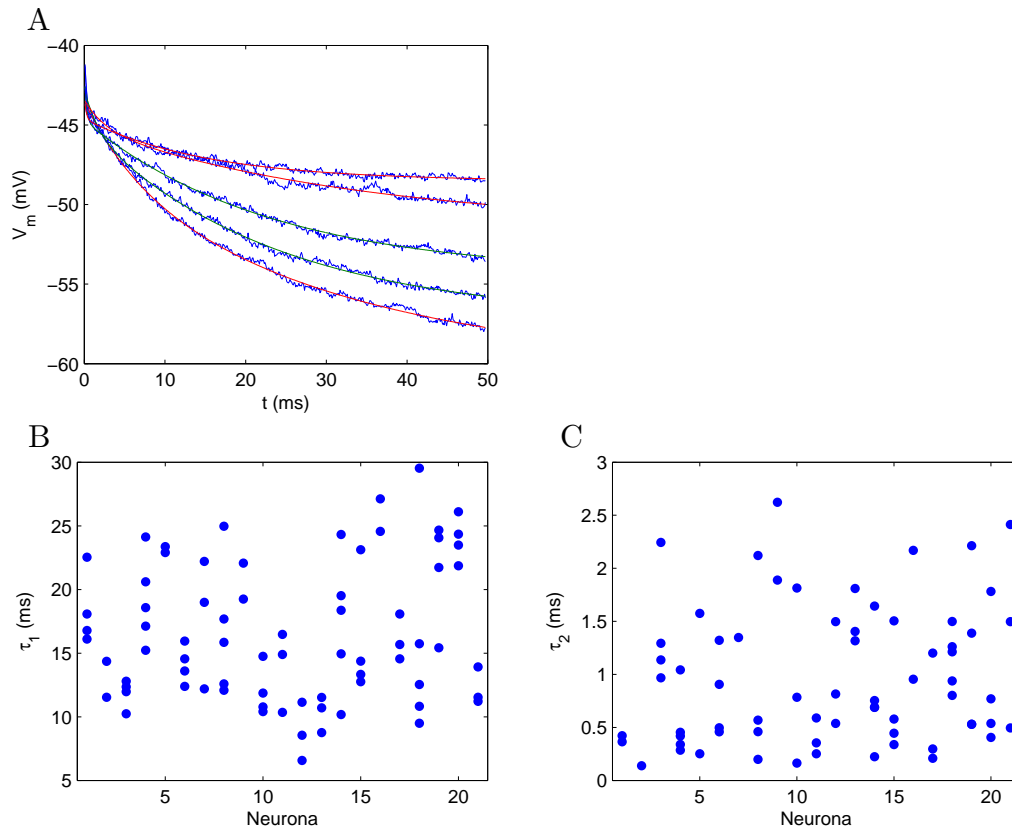


Figura 3.4: Determinación de constante temporal. A. Ejemplo de los 50 ms iniciales de las respuestas de una neurona AE (azul). Los trazos son ajustes a una suma de dos exponenciales (ver texto). Los trazos verdes corresponden a aquellos ajustes que mostraron un $R^2 > 0,99$, mientras que los rojos fueron descartados por no alcanzar ese criterio. B. Valores de τ_1 para las 21 neuronas estudiadas (eje x). Los distintos valores se obtuvieron de los ajustes a los diferentes pulsos aplicados. C. Similar a B para τ_2 .

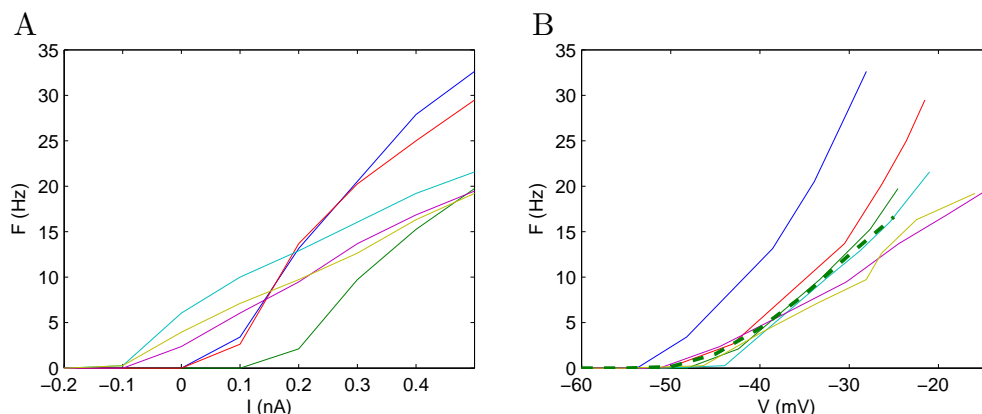


Figura 3.5: A. Frecuencia de disparo promedio durante el pulso en función de la corriente inyectada. Cada curva corresponde a una neurona. B. Frecuencia de disparo promedio durante el pulso en función del potencial durante el pulso. La línea punteada representa el promedio de los trazos, calculado cada 5 mV.

Forma de Potenciales de Acción

A partir de la detección de los potenciales de acción, podemos obtener la forma promedio para cada neurona. Consideramos únicamente los potenciales ocurridos en momentos en que no se está inyectando corriente. El proceso de detección nos indica la posición del máximo potencial alcanzado durante el PA. Para todos los PA registrados en una neurona, extraemos los 200 ms anteriores y 350 ms posteriores al tiempo en que se registró el máximo. Alineamos los registros de manera que las posiciones de los máximos coincidan y obtenemos el promedio. La Figura 3.6 muestra potenciales de acción promedio registrados en el soma de distintas neuronas AE.

Los somas de las neuronas NUT son vecinos a los de las AE, ocupando la posición 251 en el mapa del ganglio (Figura 1.2). Sus potenciales de acción registrados en el soma son similares en amplitud a los de las neuronas AE. Normalmente se puede distinguir visualmente a la neuronas AE por ser el par de mayor tamaño en su zona, y estar posicionadas en el extremo posterior del ganglio. Debido a que pueden existir variaciones en la posición exacta de las neuronas de un ganglio a otro, y que el proceso de disección podría

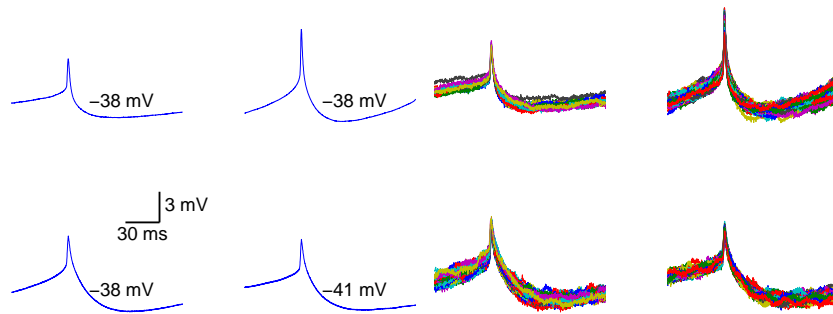


Figura 3.6: Ejemplos de potenciales de acción (PA) registrados en el soma de cuatro neuronas AE. Cada trazo en azul de la izquierda es el promedio de varios PAs, que se muestran a la derecha. Se indica en cada caso el potencial de la línea de base. Los trazos están en la misma escala para facilitar su comparación.

introducir desplazamientos de los somas, se consideró la posibilidad de que en algún caso se registrara una neurona NUT en lugar de una AE. Para analizar esta posibilidad, se registraron neuronas identificadas visualmente como NUT, para analizar la forma de sus potenciales de acción. La Figura 3.7 muestra potenciales de acción promedio registrados en el soma de dichas neuronas. Se puede observar que todas las de este grupo comparten características comunes, y que no son compartidas con las identificadas como AE, como la abrupta hiperpolarización por debajo de la línea de base luego de alcanzado el máximo (comparar con Figura 3.6). En base a esto revisamos nuestros registros y confirmamos que la población que tomamos en cuenta para el análisis correspondía muy probablemente a neuronas AE. Esta caracterización agrega un nuevo criterio fisiológico objetivo para distinguir ambos tipos neuronales.

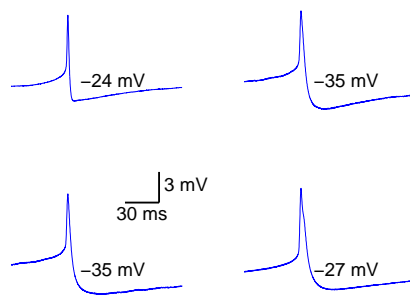


Figura 3.7: Ejemplos de potenciales de acción promedio registrados en el soma de distintas neuronas NUT, vecinas a la AE. Los trazos están en la misma escala que en la Figura 3.6 para facilitar su comparación.

Capítulo 4

Modelado

4.1 Introducción

4.1.1 Propiedades de la membrana neuronal

Las neuronas, como toda célula, están rodeadas por la membrana plasmática. Esta consiste fundamentalmente en una bicapa de fosfolípidos en la cual se insertan canales iónicos y otros tipos de proteínas (Figura 4.1).

- La bicapa lipídica tiene propiedades aislantes, por lo que funciona como una capacitancia. El valor típico es del orden de $0,01 \text{ F/m}^2$.
- Existen muchas clases de canales, que permiten selectivamente el paso de distintas especies iónicas. Cada canal en un determinado momento puede estar abierto o cerrado. Las probabilidades de apertura y cierre de un tipo de canal pueden depender típicamente de la diferencia de potencial transmembrana o de la concentración de un ligando. Cada clase de canal puede actuar entonces como una conductancia variable.
- Las concentraciones de los principales iones son distintas a ambos lados de la membrana. Por ejemplo, la concentración de iones de sodio (Na^+) en el exterior de la membrana es muy superior a la del interior. Y con los de potasio (K^+) ocurre lo opuesto. Estas diferencias de concentración son mantenidas activamente por bombas iónicas que consumen energía.

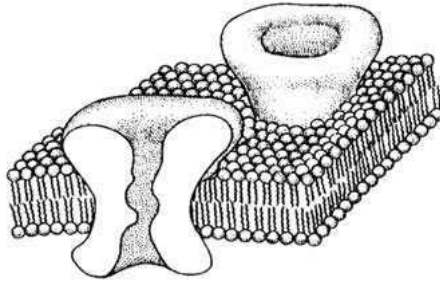


Figura 4.1: Esquema de un parche (*patch*) de membrana celular. La membrana se compone de una bicapa de fosfolípidos atravesada por proteínas que pueden constituir canales iónicos. Tomado de Hille (1992).

Las diferencias de concentración hacen que cada ion tenga su potencial de equilibrio, de acuerdo a la ecuación de Nernst:

$$V_{eq} = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[\text{ion}]_{\text{ext}}}{[\text{ion}]_{\text{int}}}$$

En donde R es la constante de los gases ideales, T es la temperatura en grados Kelvin, z es la valencia del ion (1 para el sodio y el potasio), y F es la constante de Faraday. Potenciales de equilibrio estimados para el Na^+ y el K^+ en la sanguijuela son del orden de los +45 mV y -80 mV respectivamente (Nadim et al., 1995).

De estas propiedades se deduce el circuito equivalente de la Figura 4.2 A. La capacitancia de la membrana C se dispone en paralelo con las diversas conductancias iónicas g_i presentes en la membrana. Cada conductancia puede ser variable y tiene su propio potencial de equilibrio E_i , dependiendo de qué especies permite atravesar. I_C es la corriente de carga de la capacitancia, o *corriente capacitiva*. I_m es la corriente que atraviesa los canales iónicos, o *corriente iónica*.

Aplicando las leyes de Kirchoff al circuito descrito, obtenemos la ecuación de la membrana:

$$I_C + I_m = 0$$

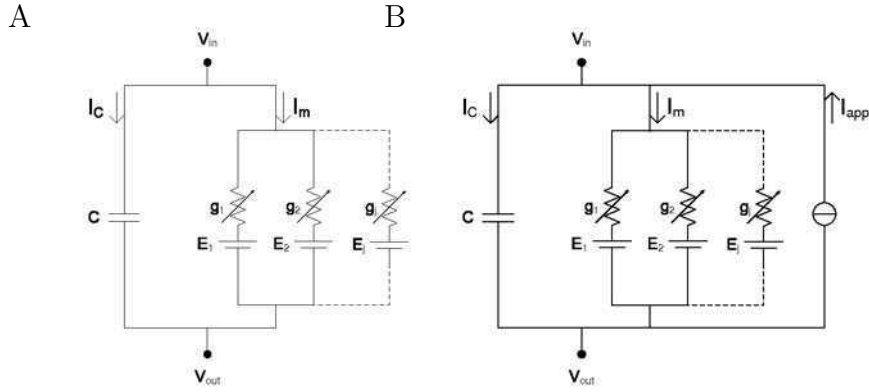


Figura 4.2: A. Circuito representando las propiedades eléctricas de la membrana celular. Una capacitancia C se dispone en paralelo con distintas conductancias iónicas variables g_i , cada una con un potencial de equilibrio E_i . B. Al circuito descrito en A se le agrega un electrodo que permite inyectar corriente en la neurona. La flecha indica la convención que se suele usar para representar el sentido de la corriente.

donde:

$$I_C = C \frac{dV}{dt}$$

$$I_m = \sum_j g_j (V - E_j)$$

Frecuentemente queremos estudiar la situación experimental en la que se introduce un electrodo que permite inyectar corriente en la célula. Lo agregamos al circuito en la Figura 4.2 B. I_{app} es la corriente inyectada por el electrodo. La ecuación de la membrana pasa a ser en este caso:

$$I_C + I_m - I_{app} = 0 \quad (4.1)$$

$$C \frac{dV}{dt} = -I_m + I_{app}$$

4.1.2 Modelo pasivo

Una primera aproximación al estudio de las propiedades de la membrana neuronal lo constituye el llamado *modelo pasivo*. En este modelo se considera a todas las conductancias como fijas, es decir, que no varían con el tiempo

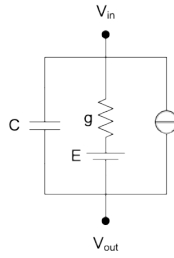


Figura 4.3: Circuito equivalente para una membrana con conductancias fijas. Todas las conductancias se pueden reducir a una única conductancia equivalente.

ni con el potencial de membrana. En ese caso todas las conductancias en paralelo se comportarán en forma equivalente a una única conductancia:

$$I_m = g(V - E)$$

en donde:

$$g = \sum_j g_j$$

$$E = \frac{\sum_j g_j E_j}{\sum_j g_j}$$

Entonces el circuito equivalente se reduce al que muestra la Figura 4.3, y la ecuación de la membrana es:

$$C \frac{dV}{dt} = -g(V - E) + I_{app}$$

Este modelo puede ser una aproximación del comportamiento de una neurona cerca de su potencial de reposo. Cuando las excursiones de voltaje se alejan mucho de este potencial, las conductancias cambian y la aproximación ya no es buena. Una ventaja de este modelo es que es un sistema lineal invariante en el tiempo (ver Sección 4.1.5). Eso permite estudiar en forma analítica muchos aspectos del sistema que no son factibles de estudiar de esta manera cuando se tienen conductancias variables o “activas”.

La constante temporal $\tau = RC = C/g$ gobierna la dinámica temporal de

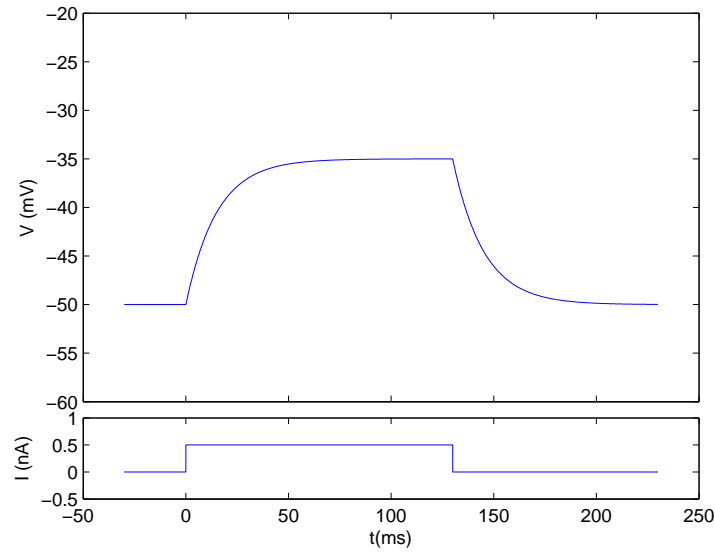


Figura 4.4: Respuesta de un circuito RC como el de la Figura 4.3, con resistencia $R = 30 \text{ M}\Omega$ y constante temporal $\tau = 15 \text{ ms}$, a un pulso cuadrado de corriente de amplitud $0,5 \text{ nA}$.

este circuito. Si partiendo del potencial de equilibrio perturbamos al circuito aplicando en el instante t_0 un escalón de corriente de amplitud I , el potencial se acercará exponencialmente a $E + I/g$ (Figura 4.4):

$$V(t) = E + \frac{I}{g}(1 - e^{-\frac{t-t_0}{\tau}})$$

Al quitar la corriente, el circuito vuelve al potencial de equilibrio, con la misma dinámica.

Este circuito se comporta como un filtro pasabajos. Por estar en paralelo, la admitancia del circuito es la suma de la admitancia de la conductancia y del capacitor:

$$\frac{1}{Z} = \frac{1}{Z_g} + \frac{1}{Z_C}$$

Para una señal de corriente sinusoidal de frecuencia angular ω :

$$\frac{1}{Z} = g + j\omega C$$

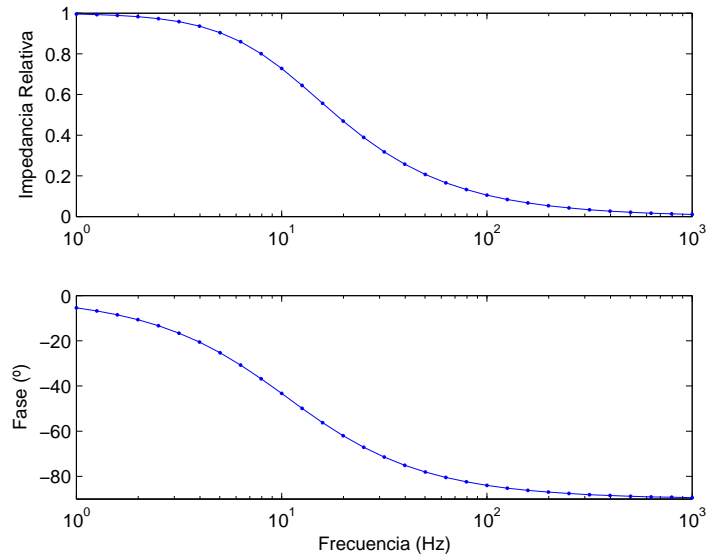


Figura 4.5: Variación del módulo y la fase de la impedancia en función de la frecuencia de la corriente de entrada para un circuito RC como el de la Figura 4.3 con una constante temporal $\tau = 15$ ms.

$$Z = \frac{1}{g + j\omega C}$$

Tomando $\tau = RC$:

$$Z = R \frac{1}{1 + j\omega\tau}$$

En la Figura 4.5 se puede ver la variación de la amplitud y la fase de la respuesta en función de la frecuencia de la corriente de entrada.

4.1.3 Variación espacial del potencial de membrana

Las ecuaciones ya vistas se refieren a un parche de membrana equipotencial. Cuando la extensión de la membrana no permite realizar esta simplificación se debe considerar la variación del potencial según la posición. Dado que las neuritas tienen forma cilíndrica, como simplificación se considera que el potencial varía únicamente a lo largo de una dirección: la del eje del cilindro. De esta manera, si consideramos secciones de cilindro de longitud Δx lo suficientemente pequeña como para asumirlas isotopotenciales, a la ecuación

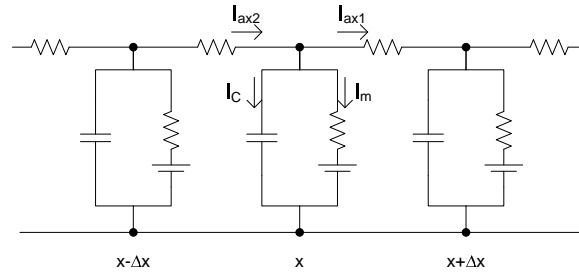


Figura 4.6: Modelo para variación espacial del potencial de membrana. El cable se divide en segmentos de longitud Δx . Cada segmento se considera isopotencial, y contiene un circuito RC. Los segmentos se unen entre sí por resistencias axiales.

4.1 tenemos que agregarle las corrientes axiales (Figura 4.6):

$$I_C + I_m + I_{ax1} - I_{ax2} - I_{app} = 0 \quad (4.2)$$

Las corrientes axiales son proporcionales a la diferencia de potencial entre los puntos e inversamente proporcionales a la resistencia entre ellos. Esta última depende a su vez de la distancia entre los puntos.

$$I_{ax1} = \frac{V(x) - V(x + \Delta x)}{r_a \Delta x}$$

$$I_{ax2} = \frac{V(x - \Delta x) - V(x)}{r_a \Delta x}$$

La resistencia axial por unidad de longitud r_a se puede expresar en función de la resistencia intracelular específica R_i . Para un cilindro de radio d :

$$r_a = \frac{4R_i}{\pi d^2}$$

Para el caso pasivo, también podemos expresar la resistencia y la capacitancia de la membrana por unidad de longitud (r_m y c_m) en función de la resistencia y la capacitancia específicas (R_m y C_m):

$$r_m = \frac{R_m}{\pi d}, g_m = \frac{1}{r_m}$$

$$c_m = C_m \pi d$$

La ecuación 4.2 para el caso pasivo se convierte entonces en:

$$c_m \Delta x \frac{dV(x)}{dt} + g_m \Delta x (V(x) - E) + \frac{V(x) - V(x + \Delta x)}{r_a \Delta x} - \frac{V(x - \Delta x) - V(x)}{r_a \Delta x} - I_{app} = 0 \quad (4.3)$$

A partir de aquí existen dos enfoques posibles. Uno es hacer tender Δx a 0, obteniendo una ecuación en derivadas parciales. El otro es discretizar el cable en segmentos que se consideran isopotenciales, obteniendo un sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias acopladas.

Ecuación del cable

La primera opción conduce a lo que se conoce como *ecuación del cable*. Dividiendo la ecuación 4.3 por Δx y tomando el límite $\Delta x \rightarrow 0$ obtenemos:

$$c_m \frac{\partial V}{\partial t} + g_m (V - E) - \frac{1}{r_a} \frac{\partial^2 V}{\partial x^2} - I_{app} = 0$$

multiplicando por r_m :

$$\tau_m \frac{\partial V}{\partial t} + (V - E) - \lambda^2 \frac{\partial^2 V}{\partial x^2} - r_m I_{app} = 0 \quad (4.4)$$

Donde

$$\lambda = \sqrt{r_m / r_a} = \sqrt{(R_m / R_i)(d/4)}$$

$$\tau_m = r_m c_m = R_m C_m$$

Poniendo distintas condiciones de contorno es posible en algunos casos encontrar soluciones analíticas. Por ejemplo, supongamos que el cable es infinito, y que en el punto $x = 0$ se aplica una corriente constante I_0 a partir de $t = 0$. Luego de un tiempo, el voltaje alcanzará una distribución estable. Para calcularla, podemos fijar $\partial V / \partial t = 0$, y la ecuación 4.4 se convierte en

una ecuación diferencial de segundo orden:

$$\lambda^2 \frac{d^2 V}{dx^2} = (V - E) - r_m I_{app}$$

Agregando como condición de contorno que $V(x)$ tiende a E cuando $|x| \rightarrow \infty$, la solución es:

$$V(x) = E + V_0 e^{-|x|/\lambda}$$

Con $V_0 = I_0 r_m / (2\lambda)$. La constante λ controla la atenuación a lo largo del espacio, así como vimos que la constante τ controla la atenuación a lo largo del tiempo.

La resistencia de entrada de un cable semi-infinito se suele escribir r_∞ y es el doble de la de un cable infinito:

$$r_\infty = r_m / \lambda = r_a \lambda = \frac{2}{\pi} \sqrt{\frac{R_m R_i}{d^3}}$$

Un caso más realista es el de aplicar corriente en un extremo de un segmento finito de cable de largo l , con sus extremos sellados (*sealed-end*). En este caso la distribución es:

$$V(x) = E + V_0 \frac{\cosh((l-x)/\lambda)}{\cosh(l/\lambda)}$$

Con $V_0 = I_0 r_\infty \coth(l/\lambda)$.

La Figura 4.7 muestra la distribución de voltaje en el equilibrio para el caso de un cable semi-infinito y cables finitos de distinto largo.

Modelos Compartimentales

Si en lugar de considerar un espacio continuo se discretiza el cable en segmentos que se consideran isopotenciales, se obtiene un sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias acopladas. Cada uno de los segmentos se denomina *compartimento*.

Las ecuaciones se suelen resolver numéricamente. Los paquetes de simulación GENESIS (Bower y Beeman, 1998) y NEURON (Hines y Carnevale,

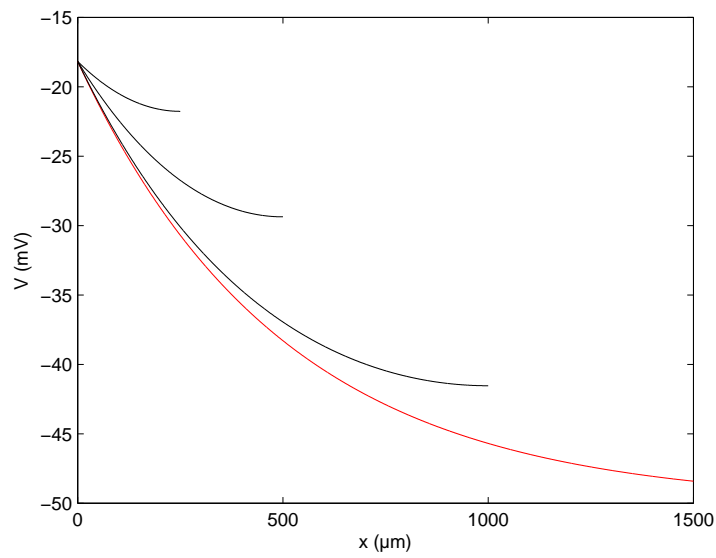


Figura 4.7: Distribución de voltaje en el equilibrio para cables cilíndricos a los que se les inyecta corriente constante en un extremo. $d = 5 \mu\text{m}$, $R_i = 250 \Omega\text{cm}$, $R_m = 5 \text{k}\Omega/\text{cm}^2$, $C_m = 3 \mu\text{F}/\text{cm}^2$. El trazo rojo corresponde a un cilindro semi-infinito. Los trazos negros a cilindros de largo 250, 500 y 1000 μm . La corriente inyectada fue ajustada para provocar el mismo potencial en el origen en los cuatro trazos.

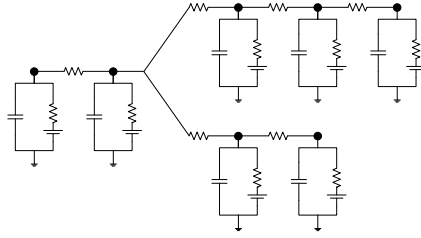


Figura 4.8: Representación de un árbol neurítico mediante un modelo compartimental. Los segmentos sin bifurcaciones se representan como una secuencia de circuitos RC que se consideran isopotenciales, como se describe en la Figura 4.6. En las bifurcaciones se interconectan los circuitos correspondientes a cada segmento.

1997) permiten elegir entre distintos métodos de integración numérica.

Una ventaja de este método es su gran flexibilidad a la hora de definir los mecanismos que actúan en cada compartimento, permitiendo por ejemplo trabajar con propiedades de membrana no homogéneas.

La discretización espacial debe ser lo suficientemente fina como para que la hipótesis de isopotencialidad sea razonable. Como regla se suele usar que la longitud de cada compartimento no exceda $0,1\lambda$ (Koch, 1999).

4.1.4 Árboles neuríticos

Las neuritas de una neurona conforman un árbol. La Figura 4.8 muestra un ejemplo de cómo se representaría un árbol mediante un modelo compartimental.

En general consideraremos al soma de la neurona como la raíz del árbol.

4.1.5 Sistemas lineales

Estudiar el modelo pasivo de una neurona como un sistema lineal nos permitirá evaluar en forma analítica importantes aspectos del mismo. Un sistema determinístico se puede describir como un operador H , que toma una entrada $x(t)$ que es función del tiempo y devuelve una salida $y(t)$. Para ser lineal, el

sistema debe ser homogéneo: para cualquier escalar α

$$H\{\alpha x(t)\} = \alpha H\{x(t)\}$$

y debe ser aditivo: para cualquier par de entradas x_1 y x_2

$$H\{x_1(t) + x_2(t)\} = H\{x_1(t)\} + H\{x_2(t)\}$$

Un sistema además puede ser *invariante en el tiempo*, es decir que si la entrada es demorada por un tiempo Δt , la salida será demorada por el mismo tiempo:

$$\text{Si } H\{x(t)\} = y(t), \text{ entonces } H\{x(t - t_1)\} = y(t - t_1)$$

Cuando un sistema es lineal e invariante en el tiempo (LTI, por *Linear Time-Invariant*) se puede caracterizar completamente por su salida cuando se le da como entrada una función δ de Dirac. Recordemos que esta función tiene las siguientes propiedades:

- $\forall t (t \neq 0 \rightarrow \delta(t) = 0)$
- $\int_{-\infty}^{\infty} \delta(t) dt = 1$

Y se cumple que:

$$\int_{-\infty}^{\infty} f(t)\delta(t) dt = f(0)$$

La respuesta del sistema frente a este impulso se denomina *función de Green*:

$$h(t) = H\{\delta(t)\}$$

Cualquier señal de entrada puede ser tratada como una suma infinita de impulsos apropiadamente escalados y desplazados:

$$x(t) = \int_{-\infty}^{\infty} x(t_1)\delta(t - t_1) dt_1$$

Las propiedades de homogeneidad, aditividad e invariancia en tiempo nos garantizan que la respuesta a una entrada arbitraria puede ser obtenida su-

mando respuestas a impulso apropiadamente escaladas y desplazadas:

$$y(t) = H\{x(t)\} = \int_{-\infty}^{\infty} x(t_1)h(t - t_1) dt_1$$

Esto no es otra cosa que la convolución entre la entrada y la función de Green del sistema, por lo que nos queda:

$$y(t) = H\{x(t)\} = (h * x)(t)$$

y si nos movemos al espacio de frecuencias:

$$\tilde{y}(f) = \tilde{h}(f)\tilde{x}(f)$$

4.1.6 La neurona pasiva como un sistema lineal

El modelo pasivo de un árbol dendrítico es un sistema LTI, por lo que el cambio de voltaje $V_j(t)$ en la ubicación j , en respuesta a una corriente de entrada arbitraria $I_i(t)$ aplicada en la ubicación i , se puede expresar como:

$$V_j(t) = K_{ij}(t) * I_i(t)$$

donde K_{ij} es la función de Green del sistema. Una manera de ver el significado de K_{ij} es en el espacio de frecuencias. $\tilde{K}_{ij}(f)$ es la transformada de Fourier de $K_{ij}(t)$ y toma valores complejos. Si aplicamos como entrada una corriente sinusoidal de amplitud 1 y frecuencia f en la ubicación i : $I_i(t) = \sin(2\pi ft)$, obtendremos como salida en V_j una sinusoidal cuya amplitud y fase corresponderán al módulo y argumento de $\tilde{K}_{ij}(f)$. Por esta propiedad se llama a la función $\tilde{K}_{ij}(f)$ *impedancia de transferencia*. Si la entrada es una corriente constante, es decir $f = 0$, $\tilde{K}_{ij}(0)$ nos dará la amplitud del cambio de voltaje en el equilibrio (“steady state”). $\tilde{K}_{ij}(0)$ recibe entonces el nombre de *resistencia de transferencia*. Cuando $i = j$, es decir, cuando se mide el voltaje en el mismo sitio donde se aplica la corriente, hablamos de *impedancia de entrada*, $\tilde{K}_{ii}(f)$, y *resistencia de entrada*, $\tilde{K}_{ii}(0)$, respectivamente.

4.1.7 Propiedades de las impedancias

Las impedancias de transferencias poseen las siguientes propiedades:

- Simetría. Una corriente aplicada en el punto i produce sobre el potencial en el punto j el mismo efecto que corriente aplicada sobre el punto j produce sobre el punto i :

$$\tilde{K}_{ij} = \tilde{K}_{ji}$$

- Positividad. El módulo de la impedancia de entrada en un punto i es siempre mayor o igual que el de la impedancia de transferencia desde i hacia otro punto j :

$$|\tilde{K}_{ii}| \geq |\tilde{K}_{ij}| \wedge |\tilde{K}_{jj}| \geq |\tilde{K}_{ij}| \quad (4.5)$$

- Transitividad. Si k es un punto en el camino entre i y j , entonces:

$$\tilde{K}_{ij} = \frac{\tilde{K}_{ik}\tilde{K}_{kj}}{\tilde{K}_{kk}} \quad (4.6)$$

- Pasabajos. El módulo de la impedancia de transferencia se reduce a medida que aumenta la frecuencia:

$$f > f' \rightarrow |\tilde{K}_{ij}(f)| \leq |\tilde{K}_{ij}(f')|$$

4.1.8 Atenuación de voltaje

La *atenuación de voltaje* es la relación entre el voltaje en el punto de aplicación de una perturbación y el voltaje en un punto de observación.

Para el caso general de una corriente sinusoidal de frecuencia f :

$$\tilde{A}_{ij}(f) = \frac{\tilde{V}_i(f)}{\tilde{V}_j(f)} = \frac{\tilde{K}_{ii}(f)I_i(f)}{\tilde{K}_{ij}(f)I_i(f)} = \frac{\tilde{K}_{ii}(f)}{\tilde{K}_{ij}(f)} \quad (4.7)$$

Notar que:

- \tilde{A}_{ij} es un número complejo, reflejando que una perturbación sinusoidal

del voltaje verá modificadas su amplitud y su fase al propagarse de i a j .

- Debido a la propiedad de positividad de la impedancia (4.5), el módulo de la atenuación es siempre mayor o igual a 1.
- La atenuación no es simétrica en general.
- Debido a la ecuación 4.7 y a la transitividad de las impedancias (4.6), si k es un punto en el camino entre i y j , entonces:

$$\tilde{A}_{ij} = \tilde{A}_{ik}\tilde{A}_{kj} \quad (4.8)$$

4.1.9 Transformada electrotónica

La multiplicatividad de la atenuación de voltaje (4.8) implica la aditividad del logaritmo de su módulo:

$$\log(|\tilde{A}_{ij}|) = \log(|\tilde{A}_{ik}|) + \log(|\tilde{A}_{kj}|)$$

Como además el módulo de la atenuación es siempre mayor o igual a 1:

$$\log(|\tilde{A}_{ij}|) \geq 0$$

Estas propiedades permiten tomar a $\log(|\tilde{A}_{ij}|)$ como una pseudo medida de distancia. Dado que la atenuación no es simétrica, no se la puede considerar como una distancia propiamente dicha.

La *transformada electrotónica* es una visualización del árbol neurítico en el que a cada segmento $i-j$ se le asigna como longitud el valor $\log(|\tilde{A}_{ij}|)$. Hay que tener en cuenta que la atenuación depende de la frecuencia, por lo que la transformada resultante dependerá de la frecuencia que se elija. Además, debido a la asimetría de la atenuación, se debe elegir un sentido para el cálculo. Lo que se suele hacer es tomar un punto como referencia (por ejemplo el soma o algún otro punto de interés) y considerar por un lado la atenuación para señales originadas en él hacia los puntos de la neurona (atenuación saliente,

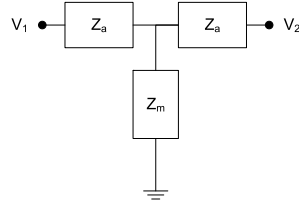


Figura 4.9: Circuito T equivalente con que se pueden representar las propiedades eléctricas de un cable cilíndrico finito.

o *output*), y por el otro, la atenuación de señales originadas en los demás puntos hasta el punto de interés (atenuación entrante, o *input*). Notar que la atenuación entre dos extremos de un segmento sin bifurcaciones sólo depende del sentido de propagación. Por lo tanto, si se dispone de ambos valores de atenuación para todos los segmentos, se pueden construir las transformadas de *input* y *output* para cualquier punto de interés.

4.1.10 Cálculo de impedancias y atenuaciones

Las propiedades eléctricas de un cable cilíndrico finito de radio uniforme se pueden representar mediante un circuito T equivalente compuesto de dos impedancias axiales Z_a y una impedancia mutua Z_m (Figura 4.9, Carnevale y Johnston, 1982). Tsai et al. (1994) derivaron los valores de las impedancias a partir de la ecuación del cable:

$$Z_a = r_\infty \frac{-1 + \cosh\left(\frac{x}{\lambda}\sqrt{1 + j\omega\tau_m}\right)}{\sqrt{1 + j\omega\tau_m} \sinh\left(\frac{x}{\lambda}\sqrt{1 + j\omega\tau_m}\right)}$$

$$Z_m = r_\infty \frac{1}{\sqrt{1 + j\omega\tau_m} \sinh\left(\frac{x}{\lambda}\sqrt{1 + j\omega\tau_m}\right)}$$

en donde x es la longitud del segmento, y $r_\infty, \lambda, \tau_m$ son las definidas en la Sección 4.1.3. Como es de esperar, los valores de las impedancias dependen de la frecuencia. En lo que sigue consideraremos una frecuencia f fija.

Teniendo las impedancias equivalentes de cada uno de los segmentos que componen un árbol neurítico, se pueden calcular todas las impedancias de entrada, impedancias de transferencia y atenuaciones de voltaje que se deseen

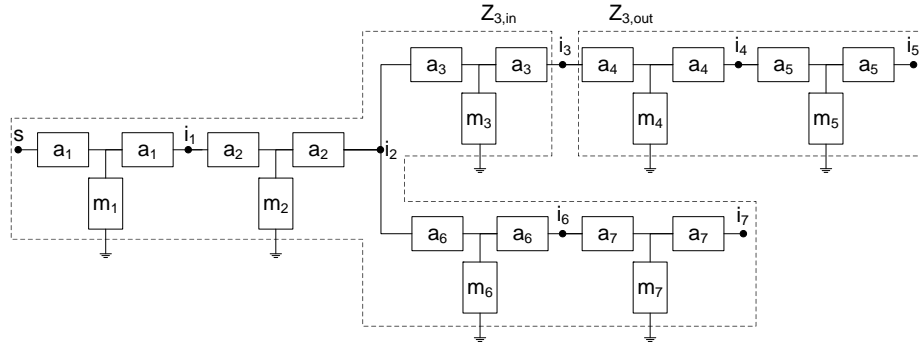


Figura 4.10: Circuito equivalente de un árbol dendrítico como el de la Figura 4.8 pero en el que cada segmento se representa con un circuito como el de la Figura 4.9. A modo de ejemplo, se delimitaron con líneas de puntos los subárboles correspondientes a $Z_{3,out}$ y $Z_{3,in}$.

(Carnevale et al., 1997), como veremos a continuación.

Cálculo de la impedancia de entrada

La Figura 4.10 muestra un ejemplo de árbol en el que cada segmento se representa mediante sus impedancias equivalentes. Elegimos un punto arbitrario como *raíz* del árbol, por ejemplo el soma (nodo s). Siguiendo la nomenclatura usual, decimos que un nodo y es *hijo* de un nodo x si están unidos directamente por un segmento, y x está más cerca de la raíz que y . Igualmente decimos que x es el *padre* de y . Por ejemplo, en la Figura 4.10, i_3 e i_6 son hijos de i_2 , y a la vez i_2 es el padre de i_3 e i_6 . También decimos que dos nodos son *hermanos* si tienen el mismo padre. En el ejemplo i_3 es hermano de i_6 . Llamamos *hoja* a un nodo sin hijos. En el ejemplo, los nodos i_5 e i_7 son hojas.

La impedancia de entrada en cada nodo puede verse como la composición en paralelo de dos impedancias: la del subárbol que se ubica distal a la raíz con respecto al nodo, y la del subárbol que se ubica proximal a la raíz. Llamaremos a la primera $Z_{i,out}$ y a la segunda $Z_{i,in}$. Por ejemplo, la impedancia de entrada en el punto i_3 se puede calcular como la composición en paralelo de $Z_{3,out}$ y $Z_{3,in}$, ambos delimitados con líneas de puntos en la Figura 4.10.

El cálculo de las $Z_{i,out}$ se puede realizar desde las hojas hacia la raíz. Para los nodos hoja, $Z_{i,out}$ es ∞ . Si un nodo j tiene un solo hijo i , $Z_{j,out}$ será a_i más la composición en paralelo de m_i con la composición en serie de a_i y $Z_{i,out}$:

$$Z_{j,out} = a_i + (m_i^{-1} + (a_i + Z_{i,out})^{-1})^{-1}$$

Si j tiene más de un hijo, se debe realizar la composición en paralelo de sus subramas. Si llamamos a los hijos i_k :

$$Z_{j,out}^{-1} = \sum_k \left(a_{i_k} + (m_{i_k}^{-1} + (a_{i_k} + Z_{i_k,out})^{-1})^{-1} \right)^{-1}$$

Una vez que se cuenta con todas las $Z_{i,out}$, se pueden calcular las $Z_{i,in}$ desde la raíz hacia las hojas. Para la raíz, $Z_{s,in}$ es ∞ . Si j es el único hijo del nodo i , el cálculo es similar al de Z_{out} :

$$Z_{j,in} = a_j + (m_j^{-1} + (a_j + Z_{i,in})^{-1})^{-1}$$

Si el nodo i es el padre de los nodos j_k , para calcular cada $Z_{j_n,in}$ hay que tener en cuenta la $Z_{i,in}$ del padre y las Z_{out} de los hermanos:

$$Z_{j_n,in} = a_{j_n} + (m_{j_n}^{-1} + (a_{j_n} + Z_p)^{-1})^{-1}$$

donde:

$$Z_p^{-1} = Z_{i,in}^{-1} + \sum_{k \neq n} Z_{j_k,out}^{-1} \quad (4.9)$$

Teniendo $Z_{i,in}$ y $Z_{i,out}$, se puede calcular la impedancia de entrada:

$$\tilde{K}_{ii}^{-1} = Z_{i,in}^{-1} + Z_{i,out}^{-1}$$

Cálculo de atenuaciones

Disponiendo de los valores $Z_{i,in}$ y $Z_{i,out}$ para todo i , se puede calcular la atenuación entre cualquier par de nodos. Si i es el padre de los nodos j_k ,

entonces:

$$\tilde{A}_{ijn} = \left(1 + a_{jn} \left(\frac{1}{m_{jn}} + \frac{1}{a_{jn} + Z_{jn,out}} \right) \right) \left(1 + \frac{a_{jn}}{Z_{jn,out}} \right)$$

$$\tilde{A}_{jni} = \left(1 + a_{jn} \left(\frac{1}{m_{jn}} + \frac{1}{a_{jn} + Z_p} \right) \right) \left(1 + \frac{a_{jn}}{Z_p} \right)$$

donde Z_p es la definida en (4.9).

De esta manera podemos calcular la atenuación a lo largo de cada segmento en ambos sentidos. Si se quiere obtener la atenuación entre dos nodos arbitrarios, basta con aplicar la multiplicatividad de la atenuación (4.8).

Cálculo de impedancias de transferencia

Disponiendo de las impedancias de entrada y las atenuaciones entre dos puntos, para obtener la impedancia de transferencia basta reescribir la ecuación (4.7):

$$\tilde{K}_{ij} = \frac{\tilde{K}_{ii}}{\tilde{A}_{ij}}$$

4.2 Métodos

4.2.1 Reducción de modelo morfológico

En las reconstrucciones morfológicas consideradas en el Capítulo 2, el diámetro de las neuritas fue medido cada $0,5 \mu\text{m}$, resultando en el orden de 25000 segmentos. Este nivel de detalle es innecesario para las simulaciones, y puede ocasionar tiempos de ejecución excesivamente largos y problemas de estabilidad numérica.

Segmentos consecutivos que no se encuentren en bifurcaciones pueden ser unidos en uno mientras el segmento resultante se pueda considerar isotencial. Entonces, dados dos segmentos de largo l_1 y l_2 , y diámetro d_1 y d_2 respectivamente, queremos obtener un segmento equivalente de largo l y diámetro d . Como criterios elegimos preservar la superficie total:

$$dl = d_1l_1 + d_2l_2$$

y preservar la fracción total de la constante de longitud (λ):

$$\frac{l}{\sqrt{d}} = \frac{l_1}{\sqrt{d_1}} + \frac{l_2}{\sqrt{d_2}}$$

Hendrickson et al. (2011) usan los mismos criterios para unir compartimentos. Despejando longitud y diámetro para ambas ecuaciones obtenemos:

$$l = \sqrt[3]{\frac{(\sqrt{d_2}l_1 + \sqrt{d_1}l_2)^2(d_1l_1 + d_2l_2)}{d_1d_2}} \quad d = \frac{d_1l_1 + d_2l_2}{l}$$

Las reglas aplicadas son conmutativas y asociativas, es decir que sin importar el orden en que se vayan uniendo los segmentos consecutivos, el resultado final será el mismo. Los segmentos se unen sólo si la longitud total no supera $0,1\lambda$ para mantener el criterio de isotopotencialidad. En caso contrario se inicia un nuevo segmento.

Las reglas para la reducción de los modelos fueron implementadas mediante rutinas en MATLAB que trabajan sobre las morfologías almacenadas en la base de datos.

4.2.2 Simulaciones

Las simulaciones se llevaron a cabo usando el paquete GENESIS (Bower y Beeman, 1998), seleccionando el algoritmo de Hines (1984) con el método de resolución de Crank-Nicholson (Crank y Nicolson, 1947). Se usó un paso temporal de 0,01 ms para ejecutar las simulaciones y de 0,1 ms para registrar la salida. Rutinas en MATLAB generan los modelos en el formato requerido por GENESIS a partir de la base de datos. Los resultados de la simulación se guardan en archivos ASCII que son luego analizados por rutinas en MATLAB.

4.2.3 Análisis electrotónico

Los cálculos de impedancias de entrada y de transferencia, y la atenuaciones de voltaje fueron realizados mediante un conjunto de herramientas llamadas *The Electrotonic Workbench*, incluidas en el paquete NEURON

(Hines y Carnevale, 1997), que se basan en cálculos similares a los descritos en la sección 4.1.10. Rutinas en MATLAB generan los modelos en el formato requerido por NEURON a partir de la base de datos.

4.3 Resultados

4.3.1 Parámetros pasivos

Reducimos los modelos morfológicos presentados en el Capítulo 2. Los modelos reducidos obtenidos tienen alrededor de 1100 compartimentos y se muestran en la Figura 4.11.

Una vez definida la morfología, para completar la definición de los modelos pasivos, es necesario definir los tres parámetros adicionales de la ecuación 4.2: la resistencia intracelular específica R_i , la resistencia de membrana específica R_m , y la capacitancia específica C_m . Asumiremos parámetros específicos homogéneos a lo largo de toda la superficie membranal e iguales para las distintas neuronas.

Para R_i tomamos de la literatura el valor $250 \Omega\text{cm}^2$ (Fromherz y Muller, 1994). Para establecer R_m buscamos que la resistencia de entrada medida en el soma fuera cercana a los $51 \text{ M}\Omega$ determinados experimentalmente en la Sección 3.2. Dado que usaremos los mismos parámetros para las distintas neuronas, y que las mismas difieren en su morfología, los modelos correspondientes a cada una tendrán distintas propiedades extensivas, en particular su resistencia de entrada. Eligiendo para R_m un valor de $14 \text{ k}\Omega/\text{cm}^2$, los modelos tienen una resistencia de entrada promedio de $51 \text{ M}\Omega$, en un rango entre 40 y $60 \text{ M}\Omega$. Para establecer C_m buscamos que el producto $R_m C_m = \tau_m$ fuera cercano al τ_1 obtenido experimentalmente. Adoptamos un valor de $1,2 \mu\text{F}/\text{cm}^2$.

4.3.2 Simulaciones en morfología

Para analizar la atenuación de señales entre el soma y el sitio de inicio de PA propuesto por Gu et al. (1991), simulamos la inyección de pulsos de corriente según el esquema de la Figura 4.12. La inyección de corriente fue

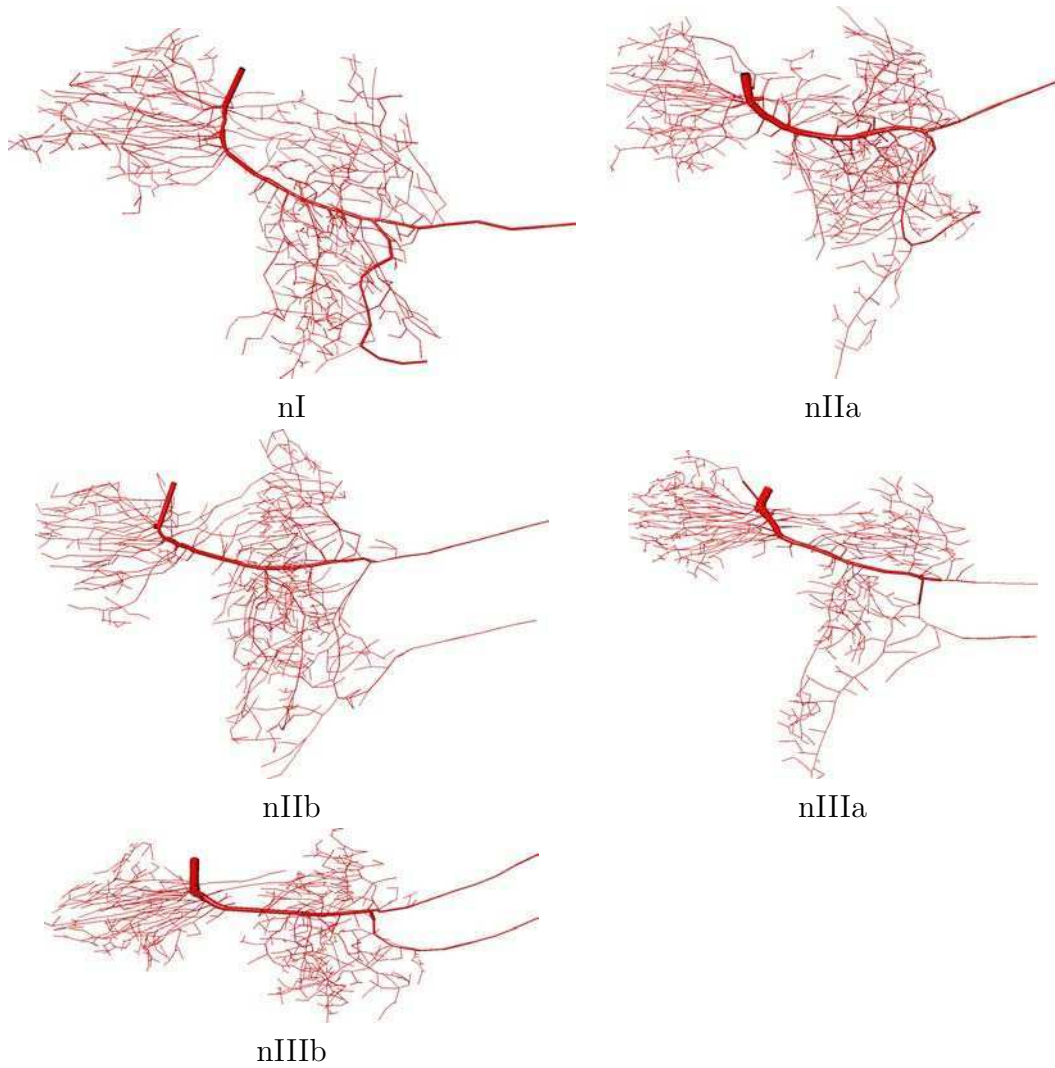


Figura 4.11: Morfologías reducidas obtenidas a partir de las reconstrucciones detalladas que se muestran en la Figura 2.9. Éstas se obtuvieron combinando compartimentos manteniendo la superficie total y la fracción de λ y de tal manera que cada uno tuviera una longitud menor a $0,1\lambda$ (ver Métodos).

en forma de un pulso breve de gran amplitud (1 ms, 3 nA) o de un escalón de corriente continua (1 nA). Ambos pulsos produjeron un cambio de potencial máximo en el origen de similar magnitud. Inyectamos corriente en el soma o en la bifurcación del tronco para comparar la propagación en ambos sentidos y para ambas condiciones de estimulación. Como ilustra la Figura 4.12, el pulso breve sufrió una atenuación mucho más marcada que el pulso continuo.

La Figura 4.13 muestra la amplitud relativa de la señal a lo largo del tronco para las cuatro condiciones posibles, para las cinco morfologías reconstruidas. Se puede observar un fuerte incremento en la atenuación al pasar de pulso continuo a breve. En general, la atenuación es mayor yendo de la bifurcación hacia el soma que en el sentido contrario, pero la diferencia depende de la morfología considerada. Existen diferencias entre las morfologías que analizaremos más adelante.

Para analizar el efecto de la frecuencia en la atenuación simulamos la inyección de corriente sinusoidal (Figura 4.14), nuevamente en el soma o en la bifurcación. La Figura 4.15 muestra la relación entre atenuación y frecuencia entre ambos extremos del tronco, en ambos sentidos. Se observa un aumento en la atenuación conforme aumenta la frecuencia de la corriente. La frecuencia de corte promedio para corriente inyectada en el soma resultó ser de 86 Hz, mientras que para corriente inyectada en la bifurcación fue de 53 Hz, mostrando un mayor efecto de la frecuencia en la atenuación en este último caso. Para las mismas simulaciones de inyección de corriente sinusoidal, analizamos la variación de la impedancia de entrada en función de la frecuencia (Figura 4.16). En este caso se observa un comportamiento muy similar para todas las morfologías. Esto es esperable ya que depende fundamentalmente de los parámetros pasivos, que son los mismos en todos los casos.

4.3.3 Variaciones en la morfología

Para analizar qué aspectos de la morfología influyen en la atenuación observada comenzamos por remover las neuritas de las morfologías, dejando solo el soma, tronco y axones. La Figura 4.17 muestra la atenuación en función de

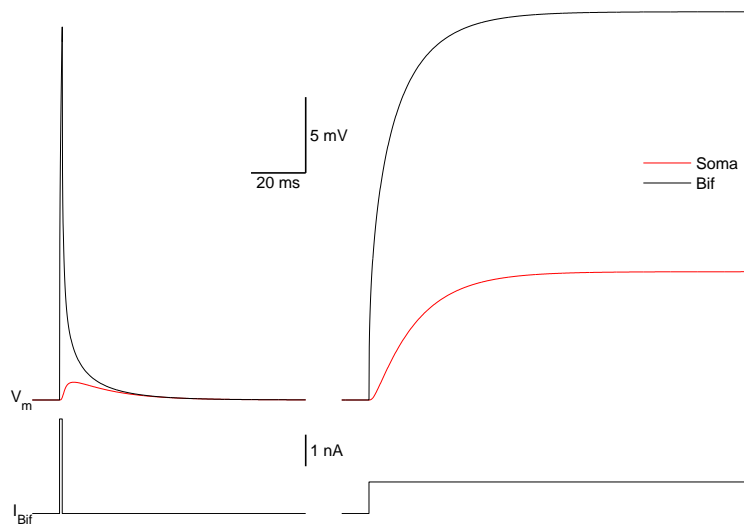
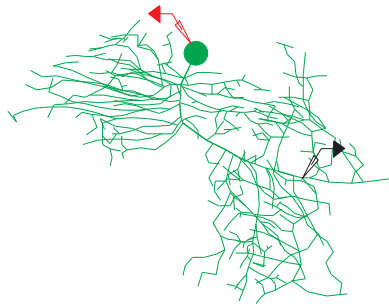


Figura 4.12: Arriba: esquema de registro para las simulaciones. Se indica en rojo el electrodo colocado en el soma y en negro el electrodo colocado en la bifurcación. Abajo: Ejemplos de simulaciones de inyección de corriente en el punto de bifurcación del tronco para la morfología nI. Izquierda: respuestas en el punto de bifurcación (línea negra) y en el soma (línea roja) para un pulso de 1 ms, 3 nA. Derecha: similar para un pulso continuo, 1 nA.

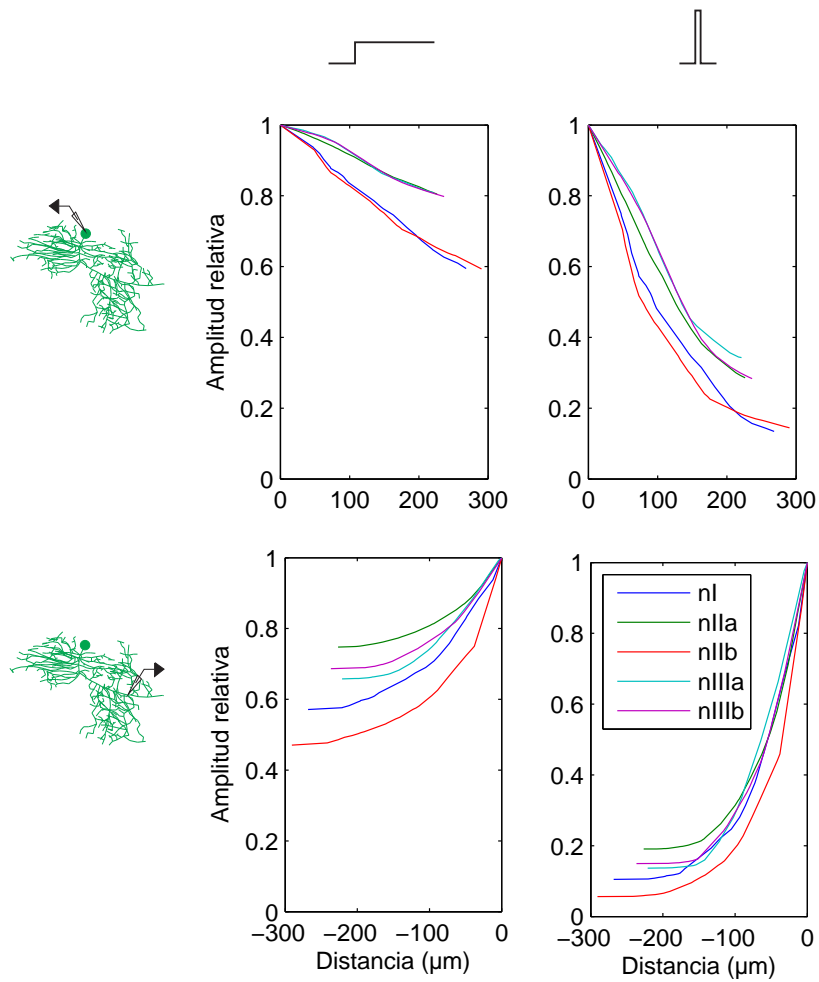


Figura 4.13: Amplitud de la señal en función de la distancia al punto de inyección de corriente a lo largo del tronco para las cinco morfologías de la Figura 4.11. Valores normalizados respecto a la amplitud en el punto de inyección. La atenuación se estudia en distintas condiciones, indicadas por los esquemas: Corriente inyectada en el soma o en la bifurcación del tronco, y corriente aplicada en forma continua o un pulso de 1 ms de duración.

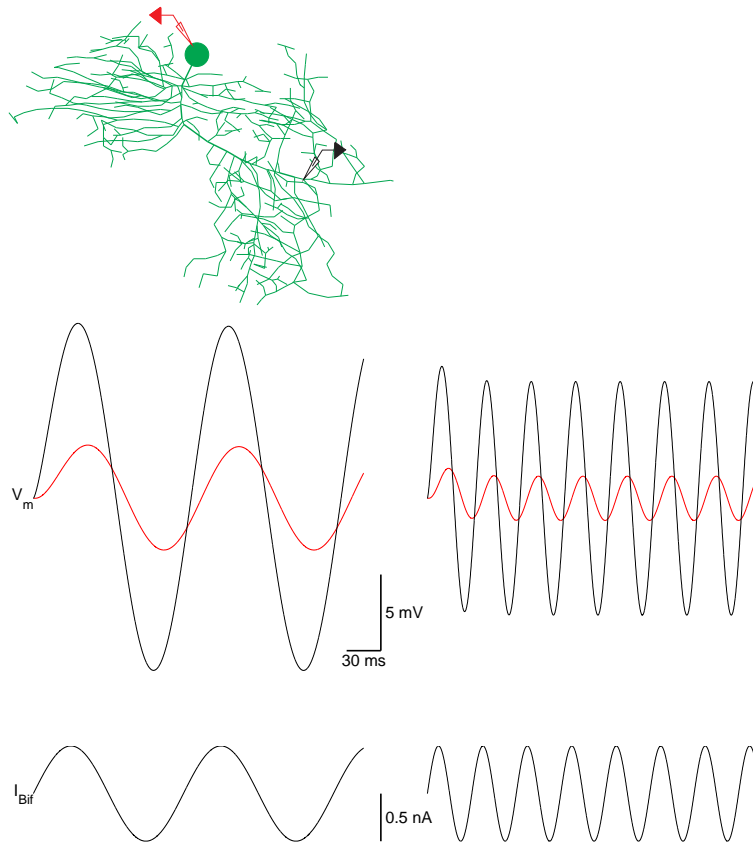


Figura 4.14: Arriba: esquema de registro para las simulaciones. Se indica en rojo el electrodo colocado en el soma y en negro el electrodo colocado en la bifurcación. Abajo: Ejemplos de simulaciones de inyección de corriente sinusoidal en el punto de bifurcación del tronco para la morfología completa nI. Izquierda: amplitud de corriente 1 nA, frecuencia 7,6 Hz. Derecha: amplitud 1 nA, frecuencia 25,6 Hz.

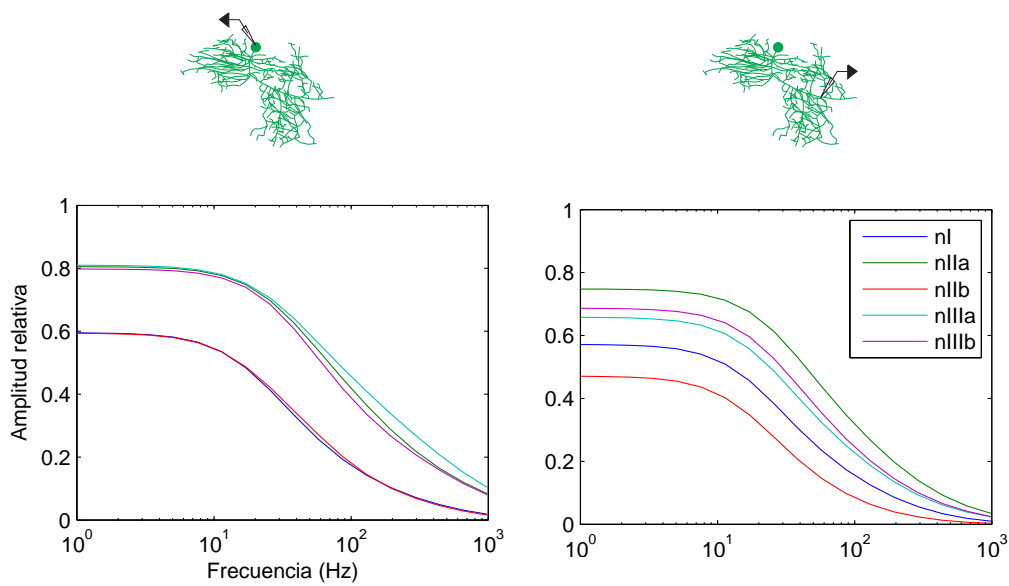


Figura 4.15: Amplitud de la se\u00f1al en funci\u00f3n de la frecuencia de corriente inyectada para las cinco morfolog\u00edas de la Figura 4.11. Se simula la inyecci\u00f3n de corriente sinusoidal de diferentes frecuencias y amplitud constante. La atenuaci\u00f3n se estudia inyectando corriente en el soma (izquierda) o en la bifurcaci\u00f3n del tronco (derecha). La amplitud es medida en el extremo del tronco opuesto al de la inyecci\u00f3n de corriente, y los valores son relativos a la amplitud en el punto de inyecci\u00f3n de corriente.

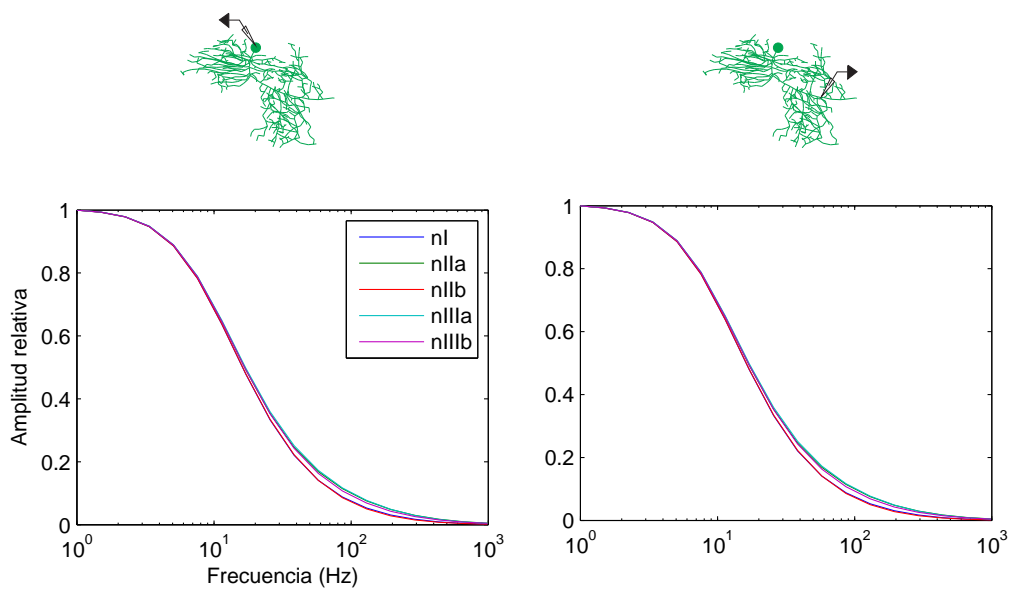


Figura 4.16: Variación de la impedancia de entrada en función de la frecuencia. Se simula la inyección de corriente sinusoidal de diferentes frecuencias y amplitud constante. La impedancia se estudia inyectando corriente en el soma o en la bifurcación del tronco, según indican los esquemas. Los valores son relativos a la amplitud para frecuencia 1 Hz.

la distancia bajo las mismas condiciones que en la Figura 4.13 pero para estas morfologías reducidas. Comparando ambas figuras se puede observar una importante disminución en la atenuación, indicando que las neuritas juegan un importante rol en la misma. Para cuantificar esta diferencia calculamos el promedio de la amplitud relativa en el punto opuesto al de inyección de corriente (soma o bifurcación), para el conjunto de neuronas reconstruidas. La Figura 4.18 compara la amplitud relativa para las morfologías completa y reducida en respuesta al escalón de corriente y al pulso breve de 1 ms, en ambos sentidos de propagación.

En la Figura 4.19 graficamos la relación entre la atenuación y la frecuencia para las morfologías sin neuritas. Comparando con la Figura 4.15 se puede ver que además de la menor atenuación, las frecuencias de corte son más altas para las morfologías sin neuritas. La frecuencia de corte promedio en las morfologías sin neuritas para corriente inyectada en el soma resultó ser de 321 Hz y para corriente inyectada en la bifurcación fue de 121 Hz, frente a los 86 y 53 Hz, respectivamente, obtenidos para las morfologías completas.

Debido a que se observan diferencias en la atenuación entre las distintas neuronas reconstruidas, nos propusimos estudiar a qué aspectos de la morfología se debían. Para ello tomamos en cuenta dos aspectos particulares:

- I. El perfil de cambio del radio del tronco en función de la distancia al soma. La Figura 4.20 describe los perfiles para cada una de las neuronas. Es similar a la Figura 2.13, pero en este caso se basa en los modelos reducidos usados en las simulaciones). Se puede observar que, con variaciones entre los diferentes casos, el tronco se afina, alcanzando en el punto de bifurcación un radio que es aproximadamente la mitad que en su nacimiento del soma. En la misma figura mostramos una aproximación del radio del tronco construida seleccionando visualmente puntos del mismo y uniéndolos con líneas rectas (línea verde), y el radio promedio de cada tronco (línea roja punteada).
- II. El perfil de conductancias que aportan las neuritas que emergen del tronco principal. Para ello calculamos la conductancia equivalente de

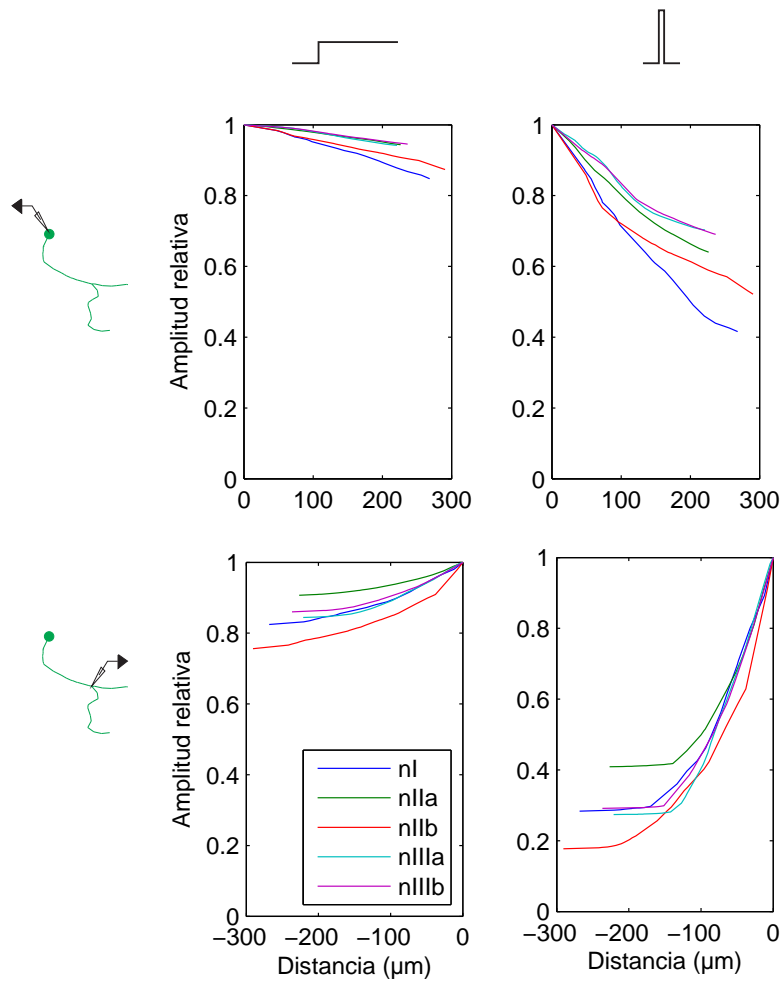


Figura 4.17: Amplitud de la señal en función de la distancia al punto de inyección de corriente a lo largo del tronco para morfologías sin neuritas secundarias. Condiciones similares a las de la Figura 4.13.

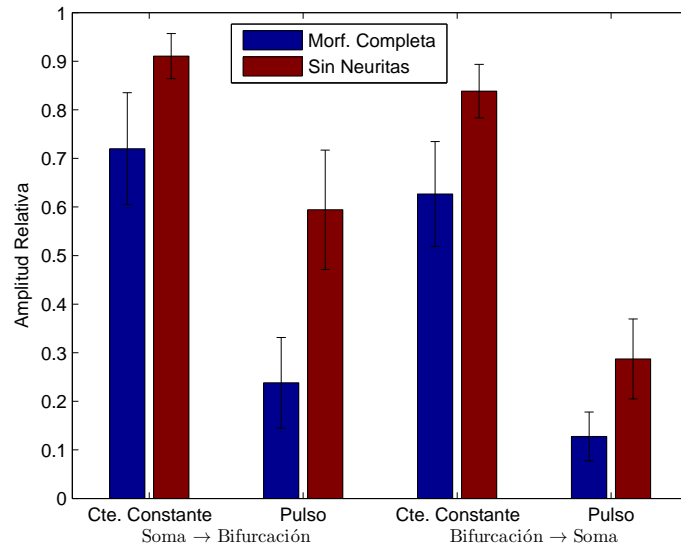


Figura 4.18: Amplitud relativa en el punto opuesto al de inyección de corriente, en la morfología completa o sin neuritas secundarias, y frente a corriente constante o pulso de 1 ms de duración. Los valores son promedio de las cinco neuronas estudiadas. Las barras de error indican la desviación standard.

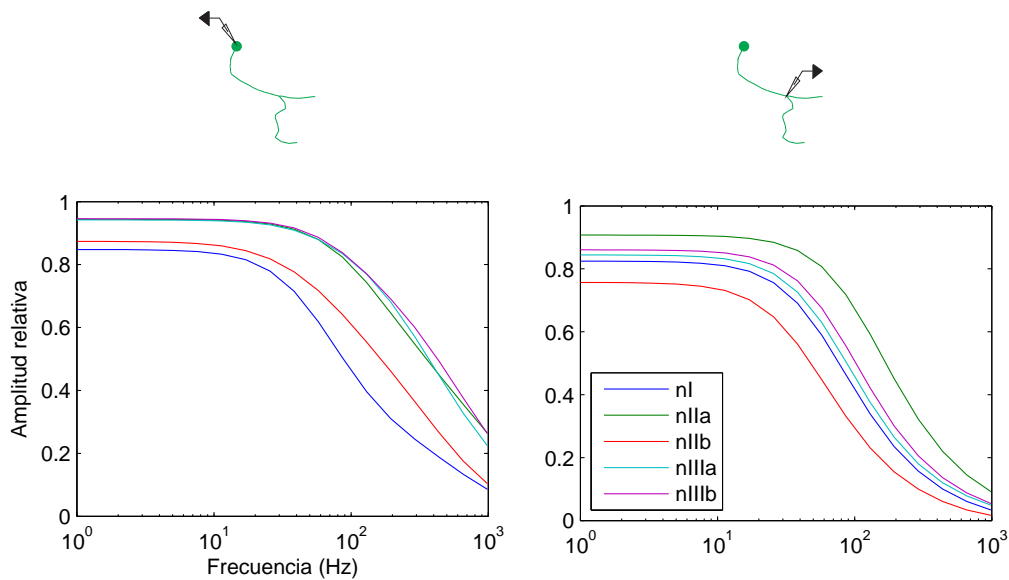


Figura 4.19: Amplitud de la señal en función de la frecuencia para morfologías sin neuritas secundarias. Condiciones similares a las de la Figura 4.15.

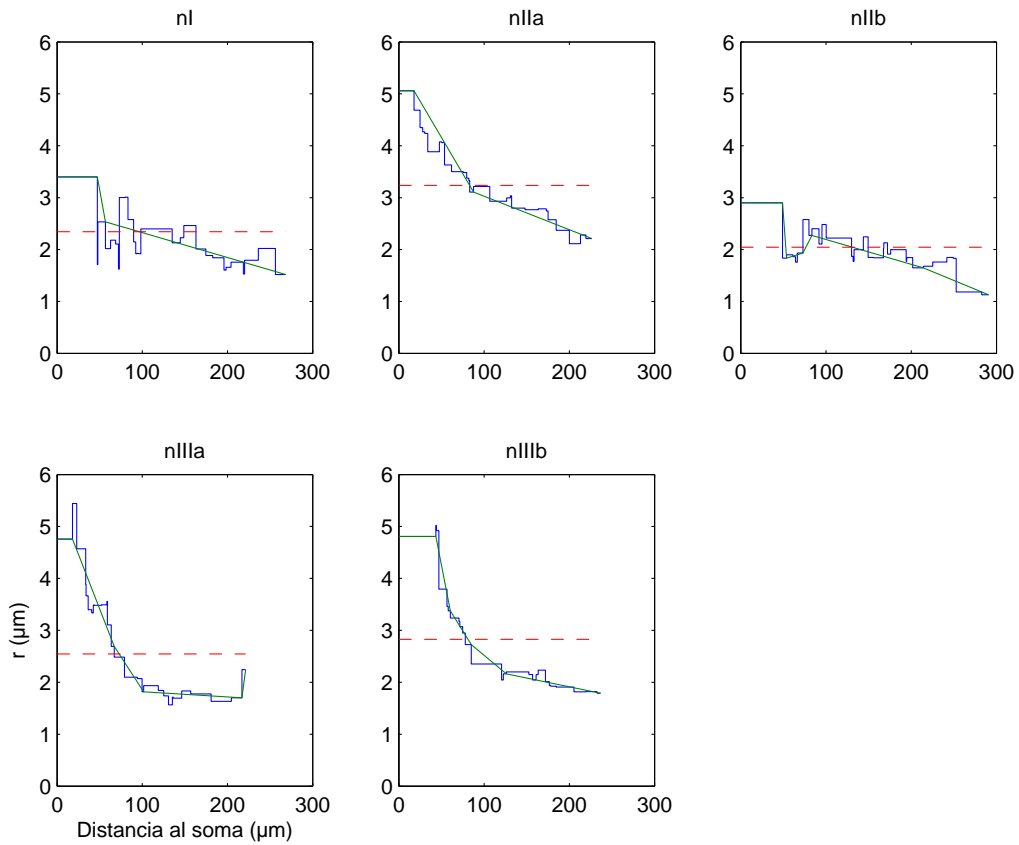


Figura 4.20: Radio del tronco en función de la distancia al soma para las morfologías reducidas usadas en las simulaciones. En verde se indica la aproximación obtenida según se indica en el texto. En línea roja punteada se indica el radio promedio en cada caso.

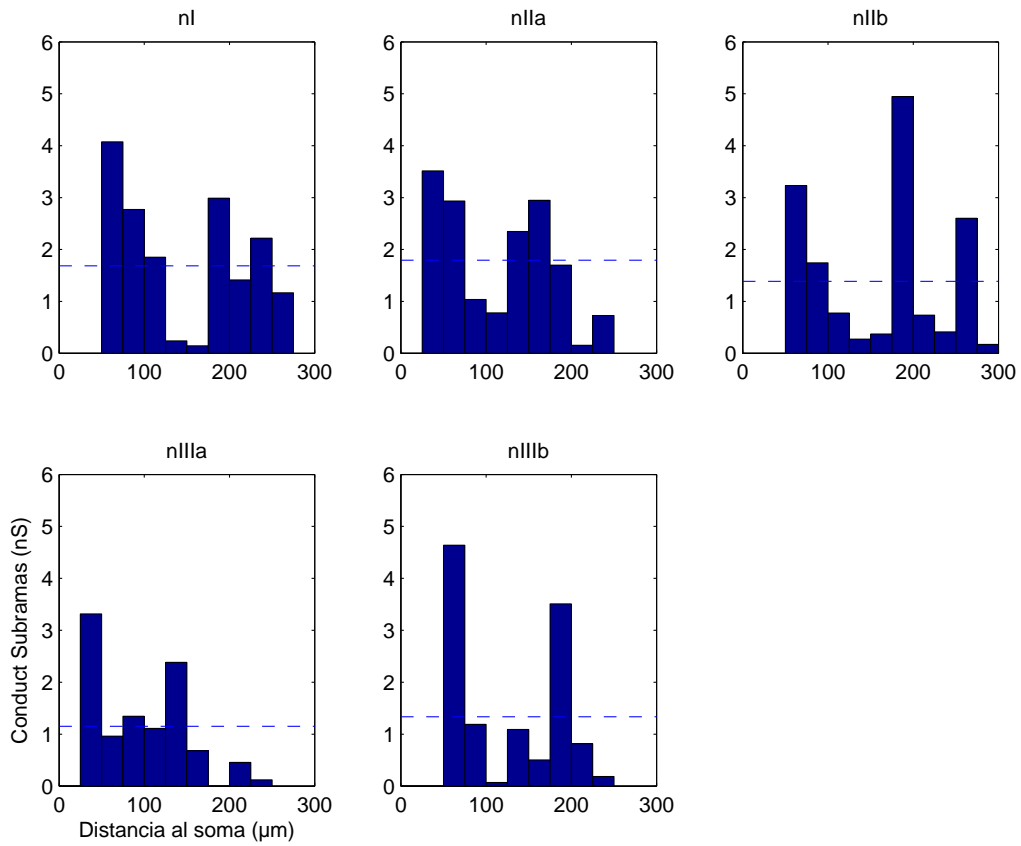


Figura 4.21: Conductancia equivalente bajo corriente constante a la de las neuritas que emergen a lo largo del tronco, en función de la distancia al soma. Las conductancias fueron sumadas en intervalos de $25 \mu\text{m}$. La línea punteada indica el valor promedio en cada caso.

las neuritas que emergen a lo largo del tronco, bajo corriente constante, sumadas cada $25 \mu\text{m}$. La Figura 4.21 muestra tales conductancias en función de la distancia al soma. Cada uno de los picos indica la emergencia de árboles neuríticos a partir del tronco principal, y los valles con conductancias cercanas a cero indican que el tronco principal carece en ese segmento de ramificaciones. En la Figura también se indica la conductancia promedio que aporta el conjunto de las ramas en cada caso.

A partir de estos datos realizamos variaciones en la morfología de cada

una de las neuronas modeladas.

Para analizar la contribución de la morfología del tronco a la atenuación calculada para cada neurona reconstruida, lo estudiamos en ausencia de neuritas secundarias e implementamos las siguientes variaciones:

1. El tronco principal es modelado como un cilindro de radio uniforme, igual al promedio del mismo, para cada caso individual (según Figura 4.20, línea roja punteada).
2. El tronco principal es modelado como un cilindro de radio variable según la aproximación que se muestra en la Figura 4.20 (línea verde).

Para analizar la contribución de la combinación de las propiedades del tronco y las ramificaciones se analizaron las siguientes variaciones:

3. El tronco principal es modelado como un cilindro de radio uniforme, igual al radio promedio del mismo (según Figura 4.20, línea roja punteada), para cada caso individual, al que se suman conductancias uniformes iguales a la conductancia promedio que aportan el conjunto de las neuritas secundarias (según Figura 4.21, línea punteada).
4. El tronco principal es modelado como un cilindro de radio variable según la aproximación que se muestra en la Figura 4.20 (línea verde), al que se le suman conductancias uniformes iguales a la conductancia promedio que aportan el conjunto de las neuritas secundarias (según Figura 4.21, línea punteada).
5. El tronco principal es modelado como un cilindro de radio variable según la aproximación que se muestra en la Figura 4.20 (línea verde), al que se suma el perfil aproximado de conductancias que aportan las neuritas que se describe en la Figura 4.21 (barras).

En las Figuras 4.22 y 4.23 se muestra la atenuación en función de la distancia para señales iniciadas en el soma y en el punto de bifurcación, respectivamente, para cada una de las variantes 1-5 detalladas arriba. En las Figuras se incluyen los resultados obtenidos para la morfología completa y para el tronco sin neuritas secundarias.

En la Figura 4.22 se puede observar que para el sentido soma-bifurcación la atenuación para el cilindro de radio uniforme (variante 1, línea azul) coincide en magnitud al final del recorrido con la del tronco sin neuritas (línea negra punteada), pero sigue un curso espacial diferente. En el caso de los cilindros de radio uniforme, el valor absoluto de la derivada es monótonamente decreciente como en la Figura 4.7, mientras que en el tronco sin neuritas la pendiente tiende a aumentar hacia el final del recorrido. Como resultado, la atenuación en el cilindro uniforme es levemente mayor para un amplio rango de puntos intermedios. En cambio, cuando la corriente es inyectada en el punto de bifurcación, el modelo de cilindro uniforme exhibe una atenuación marcadamente menor a todo lo largo del tronco. Por otra parte, hay una amplia coincidencia entre el tronco sin neuritas y el cilindro de radio variable (variante 2, línea verde), en ambos sentidos de propagación.

Esto indica que el perfil espacial de la atenuación en el tronco depende, como es de esperar, de las variaciones en el radio y que éstas pueden ser resumidas con la aproximación realizada a grandes trazos en la Figura 4.20.

La Figura 4.22 muestra que, comparada con la morfología completa (línea amarilla punteada), la atenuación para un cilindro de radio uniforme con conductancia uniforme similar a la provista por las ramas secundarias (variante 3, línea magenta) para corriente continua en la dirección soma-bifurcación resulta sustancialmente mayor en un rango amplio de puntos intermedios, aunque en el punto de bifurcación la atenuación es similar, o levemente menor. En cambio, cuando la corriente es inyectada en el punto de bifurcación (Figura 4.23), el modelo de la variante 3 exhibe una atenuación marcadamente menor a lo largo del tronco. En cambio, las mismas figuras muestran que en todos los casos la atenuación de la variante de cilindros de diámetro variable con conductancia homogénea (variante 4, línea cyan) se asemeja mucho a la de la morfología completa. La variante de diámetro variable y conductancia distribuida según el perfil correspondiente a cada neurona (variante 5, línea roja) no mejora sustancialmente el ajuste con respecto a la variante 4.

En conjunto estos datos muestran que las variaciones en el radio del tronco principal resultan un factor importante en la determinación del perfil de la atenuación también en la morfología completa, mientras que la distribu-

ción espacial de las dendritas no parece ser distinguible de una distribución uniforme.

4.3.4 Análisis electrotónico

En el análisis planteado hasta ahora se analiza la atenuación de señales iniciadas en el soma o en el punto de bifurcación. Las simulaciones nos permiten calcular fácilmente la atenuación desde un punto dado hacia los demás puntos de la neurona: basta simular una inyección de corriente en ese punto y comparar los potenciales resultantes. Sin embargo, resultaría muy costoso calcular por este método la atenuación *hacia* un punto elegido desde los demás puntos, ya que requeriría una simulación por cada punto. Los métodos analíticos descritos en la Sección 4.1.10 nos permiten realizar este cálculo con un costo computacional mucho menor. La Figura 4.24 nos muestra la atenuación entre el punto de bifurcación del tronco y los demás puntos de la neurona nI en ambos sentidos para corriente continua (0 Hz) y para señales sinusoidales a una frecuencia de 20 y 200 Hz. Las señales de 20 Hz pretenden simular señales sinápticas (Chitwood et al., 1999), y las de 200 Hz simularían potenciales de acción. La Figura 4.25 muestra lo mismo teniendo como referencia el soma. En ambos casos se puede apreciar que las señales se propagan con muy poca atenuación desde el tronco a las neuritas, mientras que sufren una gran atenuación cuando se originan en las neuritas. La atenuación a lo largo del tronco es similar en ambas direcciones.

Otra manera de ilustrar la distancia electrotónica entre diferentes regiones de una neurona es a través de las transformadas electrotónicas cuya construcción se describió en la Sección 4.1.9. La Figura 4.26 muestra las transformadas electrotónicas para la neurona nI en sentido saliente desde la bifurcación, para las tres frecuencias nombradas previamente. La neurona es relativamente compacta para señales producidas por corriente constante, y la atenuación aumenta con la frecuencia en forma más o menos homogénea en toda la neurona.

La Figura 4.27 muestra las transformadas en sentido saliente y entrante para 0 Hz. Se puede observar la enorme diferencia en la atenuación según las

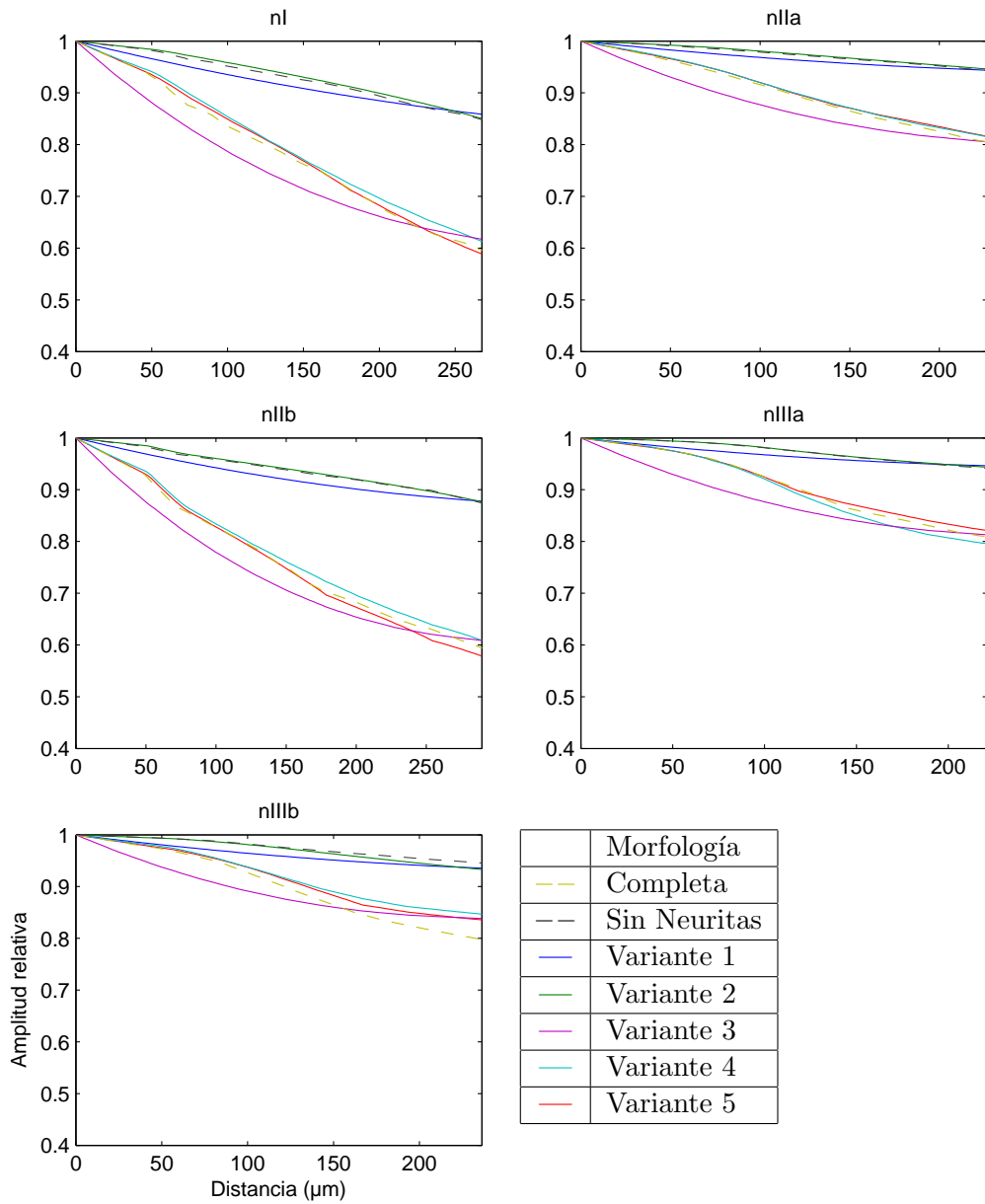


Figura 4.22: Atenuación en función de la distancia para corriente constante inyectada en el soma de cada una de las neuronas modeladas. En cada caso se compara la morfología real (líneas punteadas) y distintas variantes de modelos basados en cilindros que se describen en el texto.

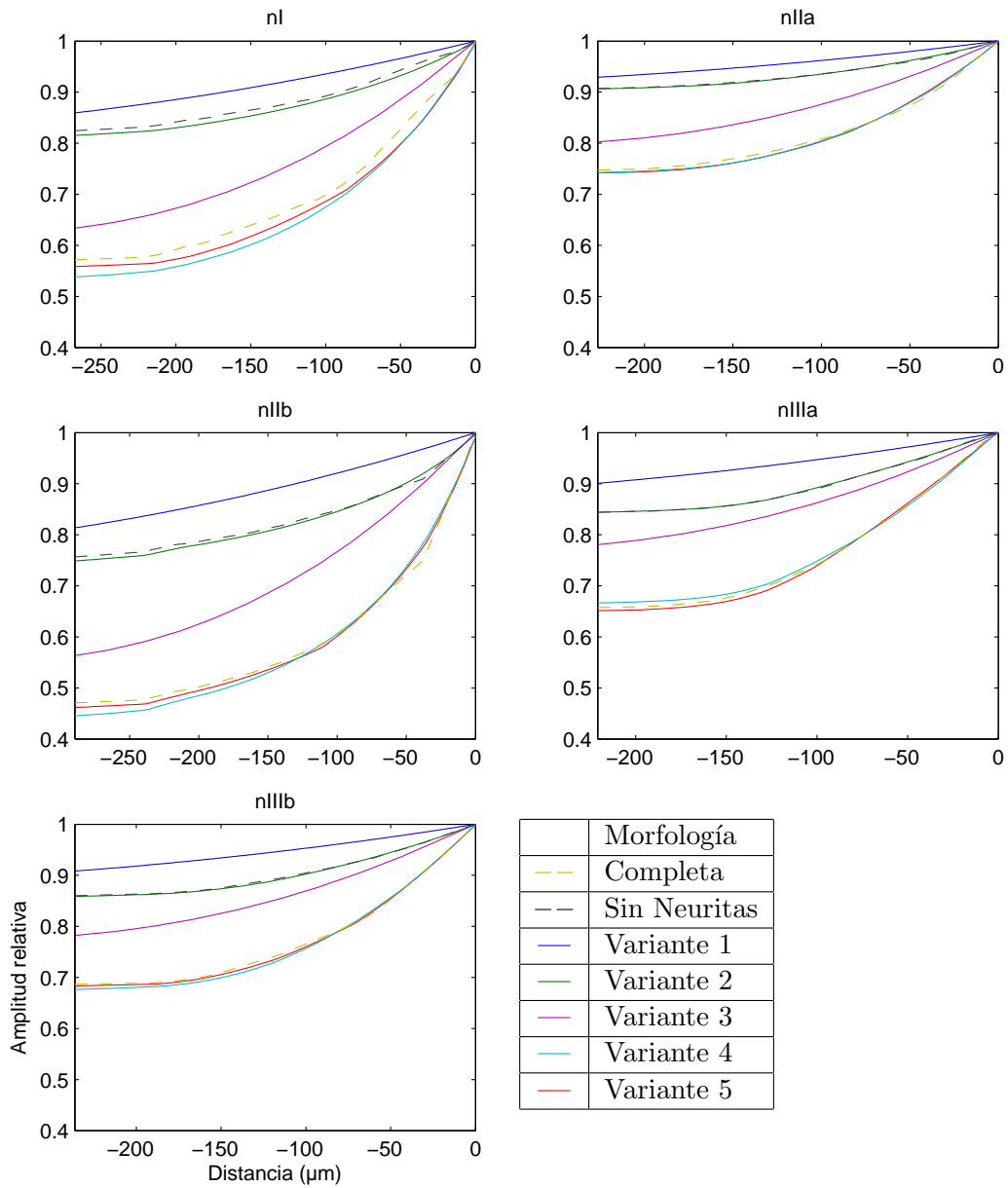


Figura 4.23: Atenuación en función de la distancia al punto de bifurcación para cada una de las neuronas modeladas según se detalla en la Figura 4.22.

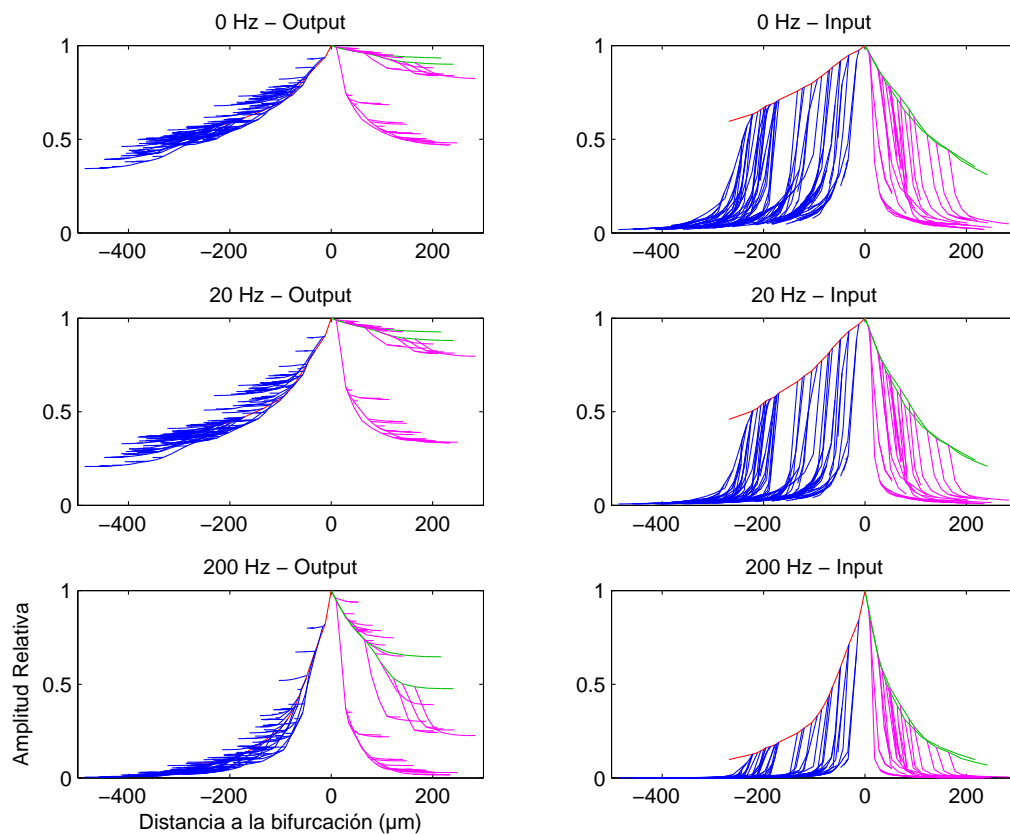


Figura 4.24: Atenuación en función de la distancia con respecto al punto de bifurcación para todas las ramas de la neurona nI. La atenuación se grafica para señales de 0 Hz (sostenidas), 20 Hz (similares a potenciales sinápticos) y 200 Hz (similares a potenciales de acción). Output: Inyectando en el punto de bifurcación y midiendo la atenuación en el punto indicado. Input: inyectando en el punto indicado y midiendo la atenuación en el punto de bifurcación. Los colores corresponden a las regiones de la neurona según la Figura 2.9: Tronco (rojo), Axones (verde), neuritas que salen del tronco (azul) y neuritas que salen de los axones (magenta)

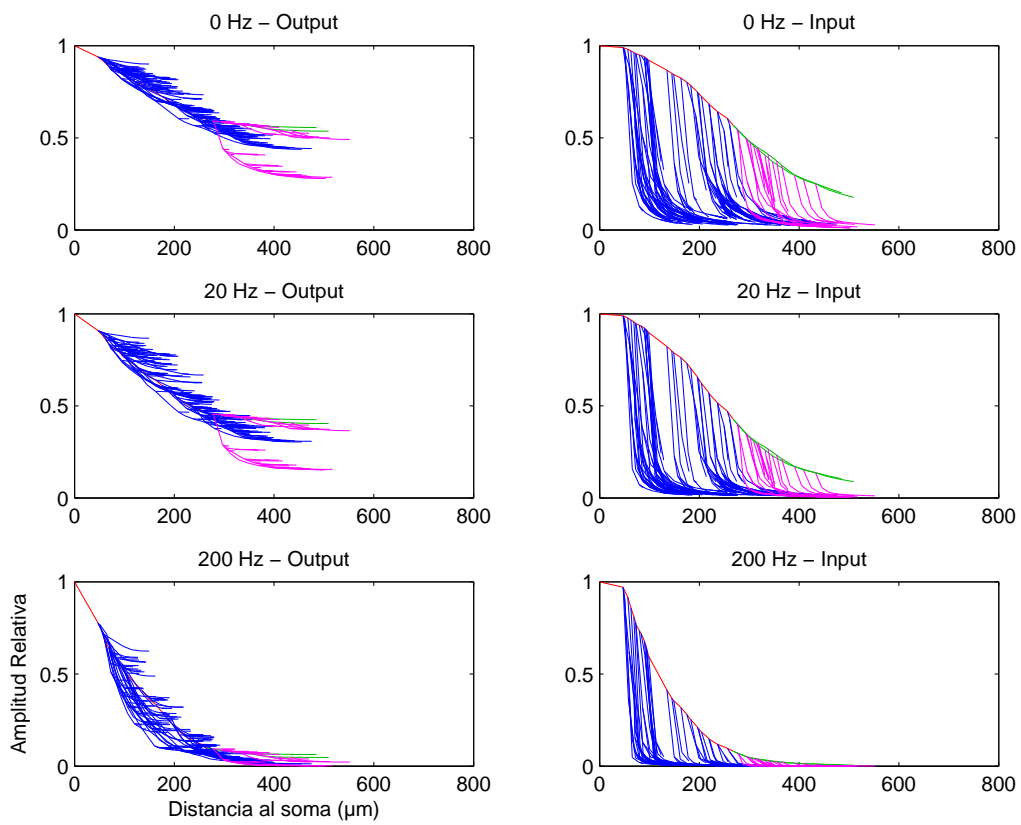


Figura 4.25: Atenuación en función de la distancia con respecto al soma para todas las ramas de la neurona nI. Consideraciones similares a la Figura 4.24.

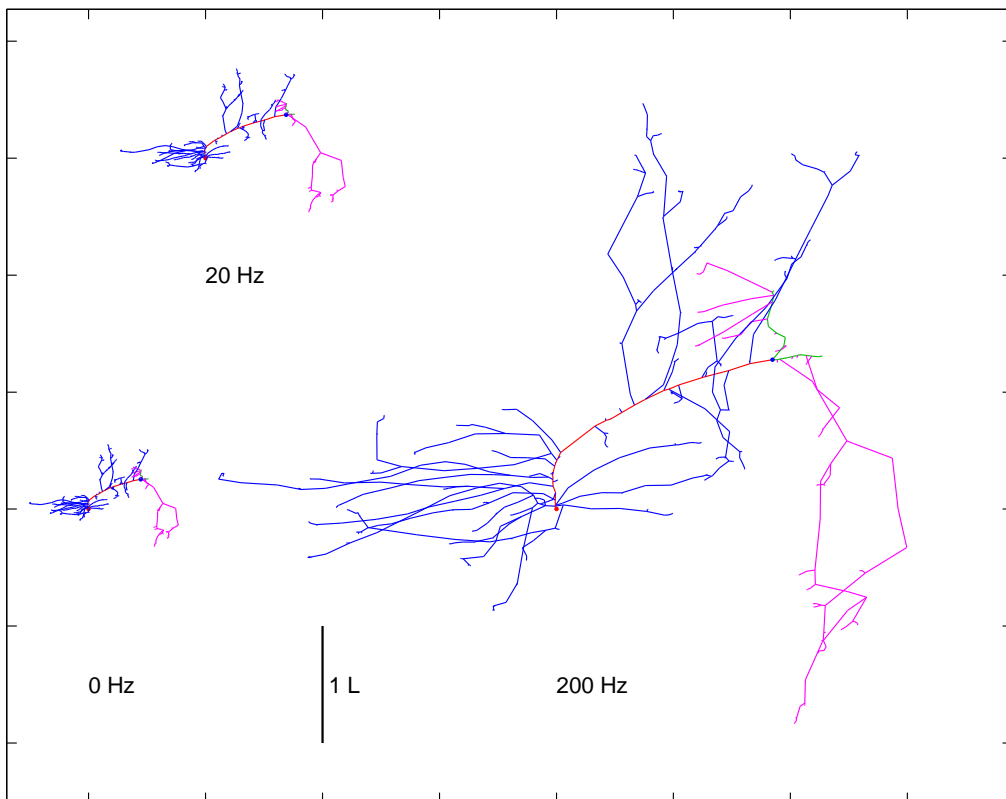


Figura 4.26: Transformadas electrotónicas de la neurona nI con origen en la bifurcación en sentido saliente. Izquierda: 0 Hz, Derecha: 200 Hz.

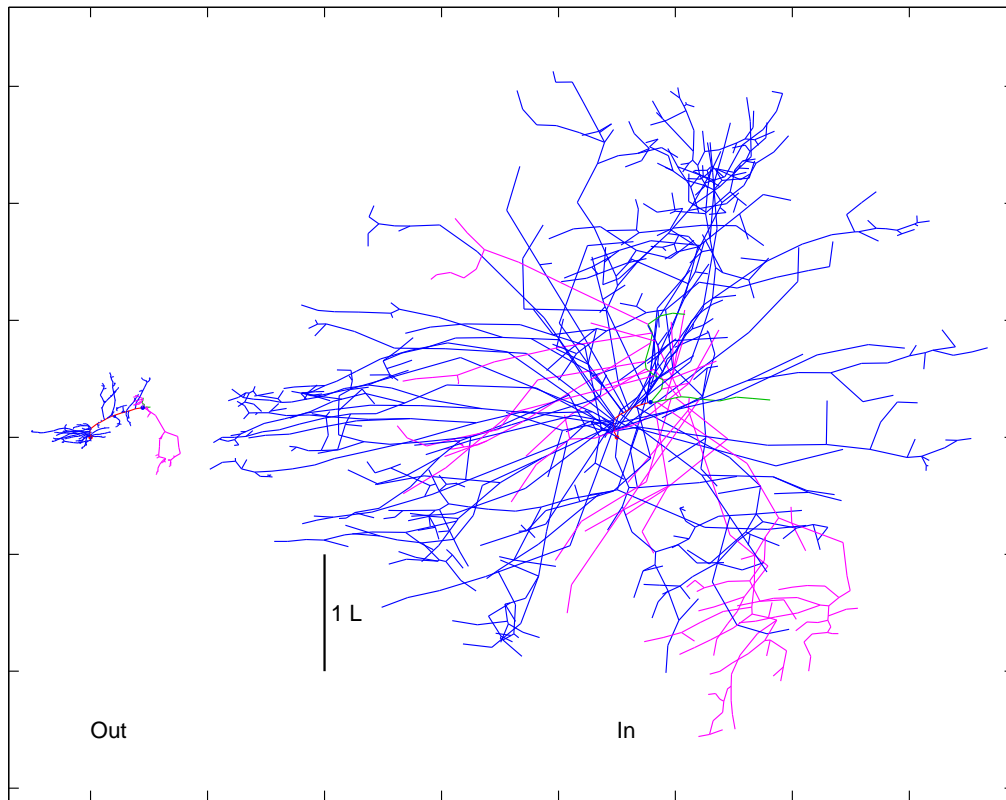


Figura 4.27: Transformadas electrotonicas de la neurona nI con origen en la bifurcación a 0 Hz. Izquierda: sentido saliente, Derecha: sentido entrante. Misma escala que en la figura 4.26.

señales se propagan desde o hacia el tronco.

4.3.5 Impedancia de entrada

Hasta aquí evaluamos cómo se atenúan las señales en función de la distancia al soma o la bifurcación. Un aspecto adicional que es importante tener en cuenta en el procesamiento de señales en el árbol neurítico es la variación en la impedancia de entrada en función de la ubicación en el mismo. La Figura 4.28 muestra la impedancia de entrada a lo largo del tronco para distintas frecuencias. Se puede apreciar que la impedancia se mantiene más o menos constante a lo largo del tronco y crece abruptamente al alejarse del mismo

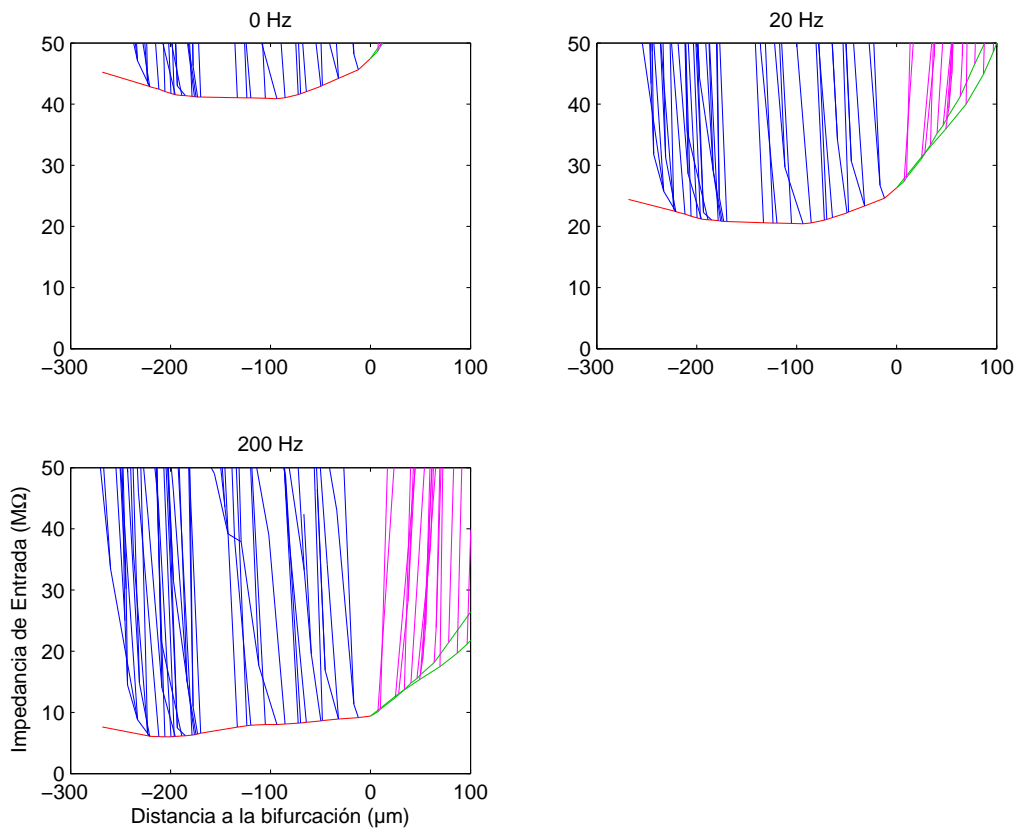


Figura 4.28: Impedancia de entrada en función de la distancia a la bifurcación para la neurona nI, en distintas frecuencias.

a lo largo de las neuritas secundarias. Como es de esperar, la impedancia de entrada se reduce con la frecuencia de la señal.

Capítulo 5

Estimación de potenciales remotos

Hasta ahora, basados en el modelo detallado de la neurona motora AE estudiamos la atenuación de señales sintéticas compuestas por escalones cuadrados o componentes frecuenciales aislados. A continuación nos proponemos investigar la propagación de señales naturales compuestas por múltiples componentes dinámicos para analizar cómo se modifica la forma de la señal en su conjunto. Para ello tomamos la proyección somática del potencial de acción como modelo de señal y desarrollamos un método de deconvolución que nos permita obtener su forma en el origen.

Deconvolución

Como vimos en la Sección 4.1.6, el cambio de voltaje $V_j(t)$ en la ubicación j en respuesta a una corriente de entrada arbitraria $I_i(t)$ aplicada en la ubicación i se puede expresar como:

$$V_j(t) = K_{ij}(t) * I_i(t)$$

y en el espacio de frecuencias:

$$\tilde{V}_j(f) = \tilde{K}_{ij}(f) \cdot \tilde{I}_i(f)$$

Si disponemos de una observación $V_j(t)$, conocemos la ubicación i donde fue aplicada la corriente que la produjo, y tenemos un modelo para calcular las impedancias, entonces podemos estimar la corriente I_i que produjo la perturbación:

$$\tilde{I}_i(f) = \frac{\tilde{V}_j(f)}{\tilde{K}_{ij}(f)} \quad (5.1)$$

Este procedimiento se denomina *deconvolución*, ya que se trata de invertir el proceso de convolución que sufrió la entrada original con la función característica del sistema.

Teniendo la corriente I_i podemos convolucionarla con la impedancia de entrada en el punto i para también hallar el potencial V_i en el punto de la perturbación:

$$\tilde{V}_i(f) = \tilde{K}_{ii}(f) \cdot \tilde{I}_i(f) \quad (5.2)$$

En el caso de las neuronas AE, disponemos de los potenciales de acción registrados en el soma obtenidos en la Sección 3.2, los modelos construidos en el Capítulo 4, y la ubicación del sitio de inicio de potenciales de acción establecida por Gu et al. (1991). Nos interesa conocer el potencial en el sitio de inicio. Tenemos todos los elementos para aplicar las ecuaciones 5.1 y 5.2 para obtenerlo, sin embargo debemos considerar el ruido presente en la señal.

La señal registrada experimentalmente se compone idealmente de una señal “original” contaminada con ruido inherente al sistema y al propio método de adquisición. Dado que el sistema que estudiamos tiene propiedades pasabajos las frecuencias más altas serán las más amplificadas al deconvolucionar, por lo que es particularmente importante eliminar el ruido presente en las mismas.

Siguiendo a Press et al. (1992, cap. 13), graficamos el espectro de potencia de la señal en escala logarítmica (Figura 5.1 B). En el espectro se observa un pico de señal emergiendo de un ruido continuo. Determinamos visualmente la frecuencia de corte f_c , marcando el punto en el que el perfil de la señal llega al nivel del ruido.

Antes de convertir la corriente y el potencial obtenidos al dominio temporal, eliminamos las componentes de frecuencia mayor a f_c asignándole 0 a

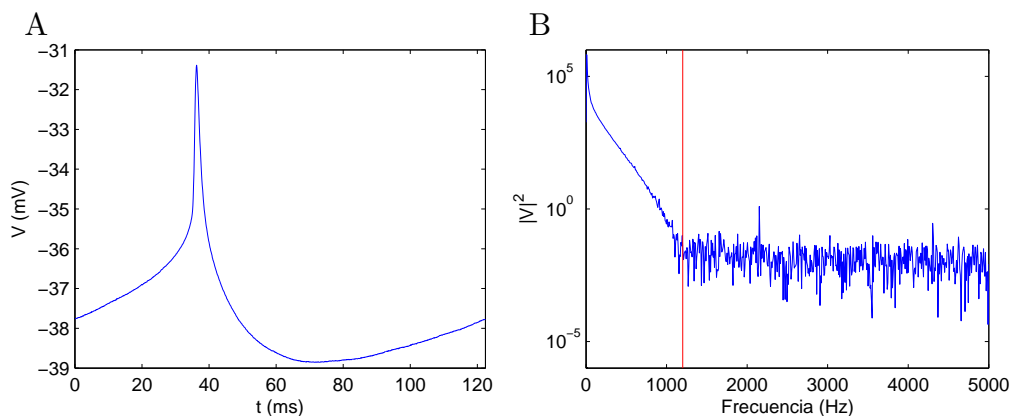


Figura 5.1: A. Potencial de acción promedio ($n = 330$) registrado en el soma de una neurona AE cuyo potencial de membrana era de -38 mV. B. Espectro de potencia del potencial de acción de A. Se obtiene graficando $|\tilde{V}(f)|^2$. La línea roja indica la frecuencia de corte determinada visualmente, en este caso 1200 Hz.

sus coeficientes.

La Figura 5.2 A muestra la corriente en el sitio de inicio de potenciales de acción (la bifurcación del tronco), obtenida por deconvolución aplicando la ecuación 5.1 al potencial somático de la Figura 5.1 A. A partir de esta corriente obtuvimos el potencial en el mismo sitio aplicando la ecuación 5.2 (Figura 5.2 B).

Para verificar que la forma en que elegimos la frecuencia de corte resulta apropiada, graficamos el potencial estimado filtrado con distintos valores de f_c (Figura 5.3). Se puede observar que la frecuencia de corte determinada a partir del espectro de potencia (en este caso 1200 Hz) resulta en la mejor reconstrucción. Para valores de frecuencia menor la señal se deforma, mientras que para valores de frecuencia mayor solo se agrega ruido.

Para comprobar que el método de deconvolución nos devuelve efectivamente la corriente buscada, simulamos la inyección de la corriente de la Figura 5.2 A en el punto de bifurcación y comparamos el potencial obtenido en el soma con el registrado experimentalmente (Figura 5.4). Se puede apreciar la concordancia entre los trazos azul y verde.

Aplicamos el método de deconvolución para distintas combinaciones de

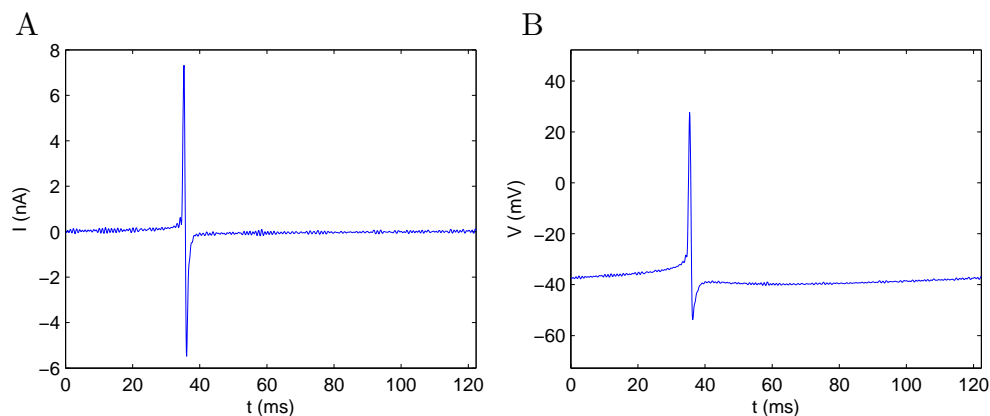


Figura 5.2: A. Corriente obtenida a partir de la deconvolución del potencial de acción de la Figura 5.1 con el modelo obtenido a partir de la morfología nI. B. Potencial en el sitio de inicio de potenciales de acción obtenido convolucionando la corriente de A con la impedancia de entrada en ese sitio.

potenciales de acción y morfologías (Figura 5.5). Como puede observarse, la amplitud (diferencia entre el máximo y el mínimo potencial de la curva) de los PAs registrados en el soma de diferentes neuronas AE varía entre 5 y 7,5 mV. Cuando estas señales son deconvolucionadas usando las cinco morfologías estudiadas la forma que adquiere la señal en el punto de bifurcación varía muy drásticamente. Estas señales resultantes se asemejan a lo esperado para un PA sólo para combinaciones específicas de señal-morfología (indicadas con un asterisco) mientras que en otras difieren drásticamente de lo biológicamente plausible.

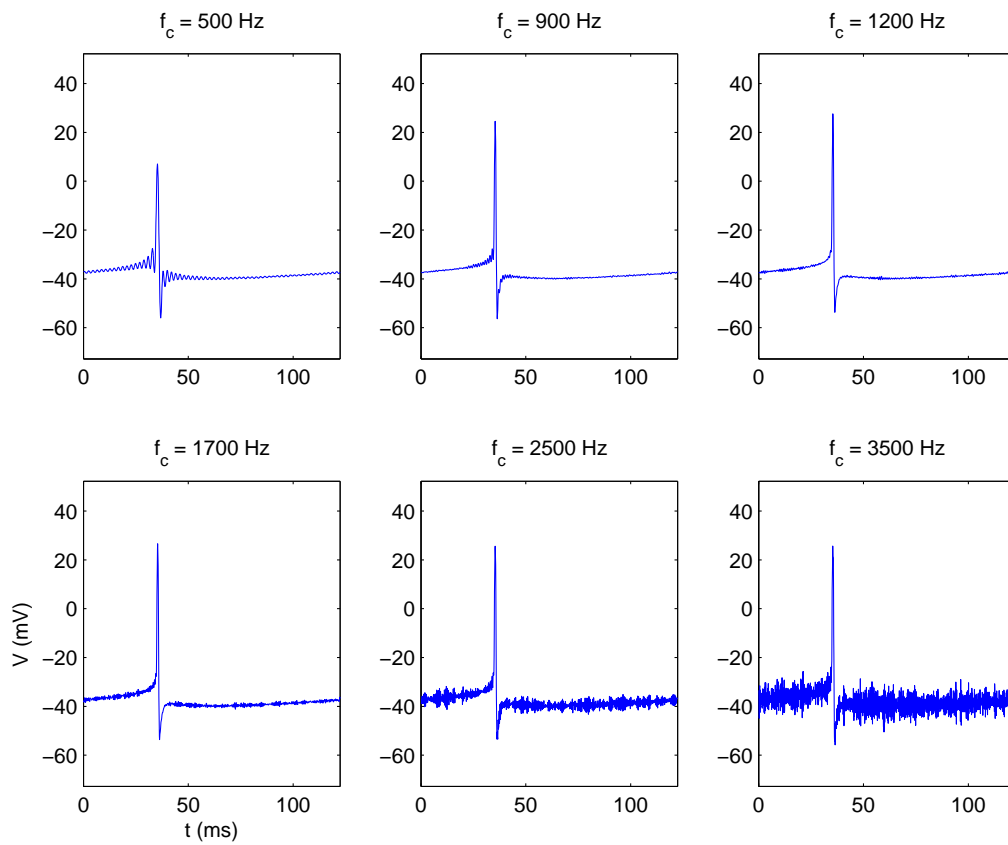


Figura 5.3: Potenciales en el sitio de origen obtenidos como en la Figura 5.2 B, pero aplicando la frecuencia de corte que se indica en cada caso.

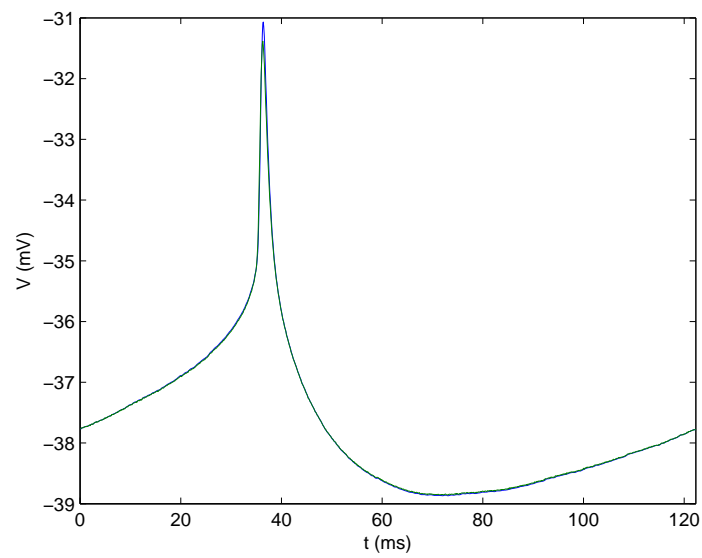


Figura 5.4: Trazo verde: mismo potencial de acción promedio registrado experimentalmente que en la Figura 5.1 A. Trazo azul: potencial de acción obtenido en el soma al simular la inyección de la corriente de la Figura 5.2 A en el punto de bifurcación de la morfología nI .

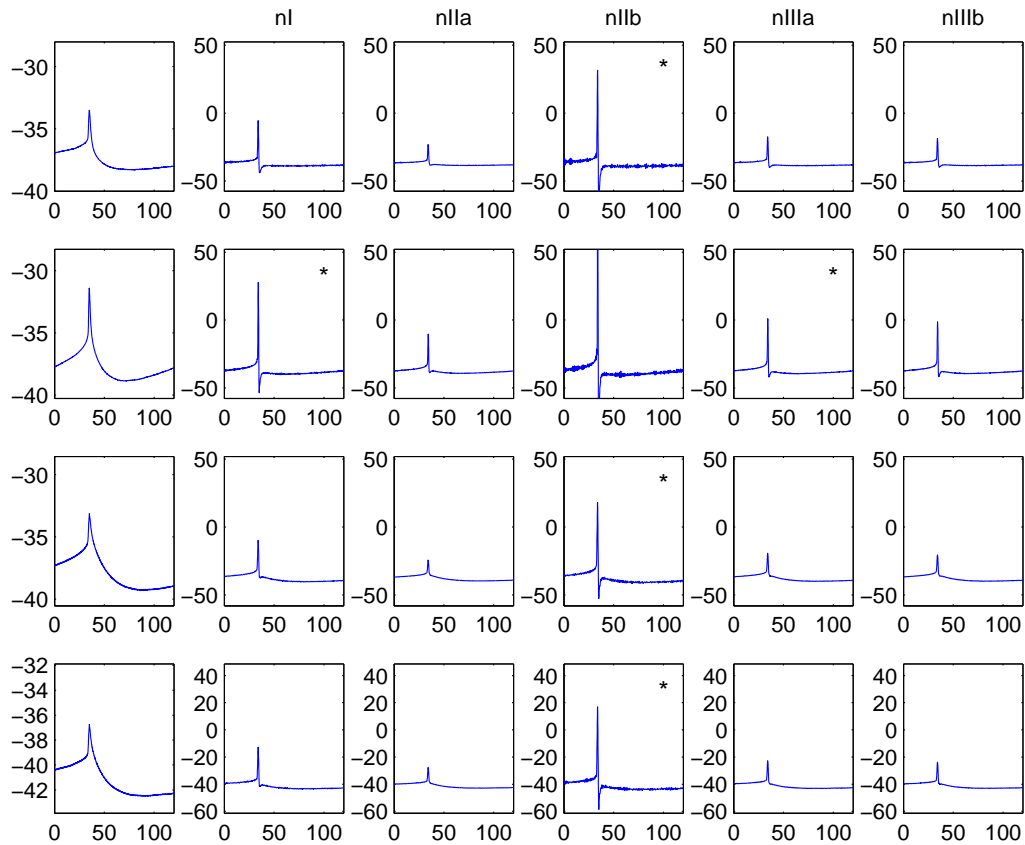


Figura 5.5: Deconvolución de distintos potenciales de acción para las distintas morfologías reconstruidas. Cada fila corresponde a un potencial de acción promedio registrado experimentalmente en el soma. La primera columna de la izquierda muestra el potencial en el soma. Las demás columnas muestran el potencial en el sitio de inicio calculado mediante deconvolución con el modelo que se indica. Se indican con un asterisco los que se consideran biológicamente plausibles como potenciales de acción.

Capítulo 6

Discusión y conclusiones

6.1 Morfología

En este trabajo presentamos la reconstrucción de cinco motoneuronas AE de la sanguijuela. Estas neuronas son monopolares y extienden una rama principal, que llamamos tronco, con un diámetro de alrededor de $5\ \mu\text{m}$ y una longitud de unos $250\ \mu\text{m}$ hasta el punto de bifurcación. Denominamos axones a las dos ramas principales que nacen de esta bifurcación ya que Gu et al. (1991) mostraron que este punto es el sitio de inicio de potenciales de acción en esta motoneurona. A partir del tronco emergen alrededor de 27 ramas secundarias que se ramifican alcanzando un orden máximo de bifurcación de alrededor de 17.

Las neuronas presentan una gran homología en su arquitectura general, coincidente con las descripciones cualitativas anteriores (Muller y McMahan, 1976; Gu et al., 1991). Sin embargo, encontramos variabilidades cuantitativas entre las neuronas, especialmente en la longitud total de las neuritas y en el diámetro promedio del tronco y axones. Esto lleva a una gran variabilidad en el área total de membrana de las neuronas AE.

Muller y McMahan (1976) muestran que los contactos hechos por las neuritas de AE son predominantemente postsinápticos.

La única reconstrucción detallada publicada de neuronas de sanguijuela anterior a este trabajo es la de una neurona HN (*heart interneuron*) de

Tobin et al. (2006). Estas neuronas participan del generador central de patrones responsable de propulsar la circulación de la sangre en el animal. Las neuronas HN también son monopolares, poseen una neurita principal de la que emergen neuritas secundarias. Los diámetros promedio de la neurita principal y de las neuritas secundarias de la neurona HN reconstruida son de órdenes similares a los de las AE ($5,3 \mu\text{m}$ y $0,75 \mu\text{m}$ respectivamente).

6.2 Fisiología

Los registros fisiológicos nos permitieron obtener los valores de R_m y C_m utilizados en la construcción de los modelos pasivos. Documentamos además la forma de los potenciales de acción de las neuronas estudiadas, aportando un nuevo criterio fisiológico para distinguirlas de neuronas con las que podían ser confundidas por su posición y características, las neuronas NUT.

El estudio electrofisiológico detallado del potencial de acción en el soma nos permitió observar que existe cierta variabilidad en la amplitud del mismo entre las distintas neuronas AE registradas. Dado que el potencial de acción registrado en el soma es una versión atenuada del potencial de acción que se genera en el sitio de inicio, la variabilidad pudo deberse a i) diferencias en la amplitud del potencial de acción original; o a ii) diferencias en la anatomía de las diferentes neuronas que produjeran variaciones en la atenuación al soma. Para resolver este problema, a futuro, deberán realizarse registros y reconstrucción en las mismas neuronas, para poder correlacionar amplitud del potencial de acción con la morfología.

6.3 Modelo

En base a la reconstrucción morfológica y los datos electrofisiológicos construimos un modelo reducido de cada una de las neuronas estudiadas, con el mismo número de ramas y puntos de bifurcación que la reconstrucción original. Estos modelos tienen alrededor de 1100 compartimentos que consideramos isopotenciales. Tener más de una neurona reconstruida nos permi-

tió apreciar el impacto de la variabilidad biológica en la morfología sobre la propagación de las señales. En este trabajo optamos por adoptar una misma resistencia de membrana específica para todas las reconstrucciones. Con esta estrategia, la morfología dictó las diferencias en la respuesta pasiva entre las distintas neuronas modeladas. Sin embargo, es posible que a nivel del desarrollo la resistencia de membrana se ajuste en función de la morfología.

Dado que nos interesaba estudiar el impacto de la morfología y las propiedades pasivas sobre la transmisión de señales, nuestros modelos no incluyeron conductancias activas. Si bien es claro que las funciones de las neuronas dependen de conductancias activas, los modelos pasivos nos permiten tener una referencia inicial a partir de la cual evaluar los cambios introducidos por los elementos no lineales (Rall et al., 1992).

La gran mayoría de los estudios morfológicos detallados hasta el presente se han centrado sobre diversas neuronas paradigmáticas del sistema nervioso central de mamíferos, tales como las neuronas piramidales de la corteza cerebral y el hipocampo (Major et al., 1994; Carnevale et al., 1997; Jaffe y Carnevale, 1999), las células de Purkinje del cerebelo (Rapp et al., 1994; Roth y Hausser, 2001), o motoneuronas de la médula espinal (Fleshman et al., 1988).

Una diferencia entre las neuronas de mamífero mencionadas y las motoneuronas de sanguijuela estudiadas en este trabajo es la ubicación relativa del soma. En las neuronas de vertebrados, el soma se encuentra adyacente al sitio de inicio de potenciales de acción. Constituye entonces un lugar de observación privilegiado para estudiar la integración de señales de entrada y la generación de la salida de la neurona. En las motoneuronas de sanguijuela, en cambio, del soma emerge un tronco principal que en un primer tramo despliega un árbol neurítico que sirve al intercambio de señales con otras neuronas, y en un segundo tramo opera como axón. El sitio de inicio de potenciales de acción se ubica al inicio de este segundo tramo (la bifurcación del tronco principal en el caso de las AE). El soma queda entonces alejado del sitio de inicio, y su ubicación parece ser marginal con respecto a la integración de señales electrofisiológicas. Sin embargo, el soma continúa siendo un sitio de referencia en los estudios electrofisiológicos debido a que las condiciones

experimentales lo convierten en el sitio de registro por excelencia. No se han obtenido hasta la fecha registros dendríticos de neuronas de la sanguijuela.

El modelo construido en este trabajo podrá ayudar entonces a acortar la distancia entre nuestro punto de observación y nuestra comprensión del procesamiento de señales en estas neuronas.

6.3.1 Propagación de potenciales de acción

Una primer cuestión que nos interesó analizar es en qué medida la morfología es responsable de la atenuación de la amplitud de los potenciales de acción iniciados en la bifurcación y registrados en el soma. Un potencial de acción típico, medido a partir de un potencial de reposo de -40 mV debería tener una amplitud máxima de aproximadamente 85 mV, considerando un potencial de equilibrio del sodio de $+45$ mV (Nadim et al., 1995). En las neuronas AE el potencial de acción registrado en el soma tiene una amplitud de aproximadamente 5 mV. Considerando los datos de la Figura 4.18, la atenuación desde la bifurcación al soma para señales producidas por un escalón de corriente constante sería de aproximadamente 40 %, y de aproximadamente 90 % para una señal debida a un pulso breve de corriente de 1 ms. Considerando que un potencial de acción se asemeja más a esta última, se esperaría que la amplitud se reduzca al 10 % de su valor de origen, es decir una amplitud de aproximadamente 8,5 mV. Este valor es ligeramente superior al registrado, indicando que la morfología puede ser responsable de gran parte de la atenuación.

Debido a que la atenuación depende fuertemente de las componentes frecuenciales, la atenuación de un potencial de acción puede ser distinta a la calculada para un pulso de 1 ms de duración, dependiendo de la dinámica de la espiga.

También pueden existir mecanismos activos que contribuyan a la atenuación. Wessel et al. (1999) muestran que una corriente de potasio activada por calcio puede estar involucrada en la reducción de la amplitud de los potenciales de acción registrados en el soma de las neuronas AP de la sanguijuela. Las neuronas AP tienen algunas similitudes fisiológicas y morfológicas con

las AE.

Por su parte, en neuronas piramidales se demostró que la propagación retrógrada de potenciales de acción está magnificada por conductancias de Na^+ voltaje dependientes (Stuart y Sakmann, 1994), mientras que en células de Purkinje del cerebelo esta propagación es pasiva (Stuart y Hausser, 1994). Diferentes neuronas del sistema nervioso central de mamíferos muestran diversidad con respecto a este fenómeno (Stuart et al., 1997), en correspondencia con la distribución de conductancias activas en el árbol dendrítico (Migliore y Shepherd, 2002).

Se han propuesto distintas funciones para la propagación retrógrada de potenciales de acción, fundamentalmente actuando en los mecanismos de plasticidad sináptica de corto y largo término, y en la estabilización de contactos sinápticos recién creados (Waters et al., 2005). Al igual que en las células de Purkinje, en el caso de las motoneuronas de sanguijuela la arquitectura neuronal no parece favorecer la propagación retrógrada, por lo que es probable que la misma no posea un valor fisiológico en estas neuronas.

6.3.2 Inyección de corriente en el soma

Una manipulación experimental típicamente utilizada en diversos estudios electrofisiológicos es la inyección de corriente constante en el soma de la neurona para alterar su potencial de membrana. Una cuestión siempre presente a la hora de interpretar los resultados es cuán efectiva resulta esta manipulación en la extensión del árbol dendrítico. Nuestros resultados muestran que en ese escenario, la atenuación del cambio de potencial se produce principalmente a lo largo del tronco principal, los axones y neuritas más gruesas, mientras que la señal se propaga casi sin atenuación por las neuritas más finas. La atenuación máxima en los puntos más alejados del soma es del orden del 50 %, excepto una rama que emerge de uno de los axones que alcanza atenuaciones mayores. (Figura 4.25, 0 Hz, Output, ver también Figura 4.26). Estos resultados sugieren que la inyección de corriente en el soma de las neuronas AE resulta una maniobra efectiva para modificar el potencial de membrana de toda la neurona, en coincidencia con lo observado para las

neuronas de mamífero que se han modelado (Jaffe y Carnevale, 1999; Roth y Hausser, 2001).

6.3.3 Propagación de potenciales sinápticos

Los potenciales sinápticos se originan en las neuritas secundarias y se propagan hacia el soma, donde podemos registrarlos, y hacia el punto de bifurcación, donde pueden tener efecto sobre la iniciación de potenciales de acción. Las Figuras 4.24 y 4.25 (20 Hz, Input) muestran que estas señales pueden sufrir una drástica atenuación en su propagación a esos sitios.

La amplitud máxima en el origen de un potencial sináptico excitatorio desde un potencial de reposo de -40 mV puede ser de 60 mV, considerando un potencial de reversión de $+20$ mV, mientras que un potencial sináptico inhibitorio podría tener una amplitud máxima de 40 mV, considerando un potencial de reversión de -80 mV. Señales sinápticas con estas amplitudes que surgieran en los extremos distales de las neuritas serían aproximadamente del orden de 1 mV registradas en el soma, y aun menores en la bifurcación.

Sin embargo, resultados experimentales muestran que pueden registrarse potenciales postsinápticos inhibitorios en el soma de las neuronas AE, de entre 5 y 10 mV de amplitud, con un potencial de reversión de alrededor de -60 mV, y que sus efectos tienen influencia en la frecuencia de disparo de potenciales de acción (Iscla et al., 1999; Rodriguez et al., 2004). Por otra parte, se registran potenciales excitatorios de unos 3 mV de amplitud (Gu et al., 1991; Iscla et al., 1999).

Los experimentos de fotoablación de Gu et al. (1991) sugieren que la conexión monosináptica P-AE está compuesta de múltiples contactos en distintas ramas. Esto podría explicar que los potenciales observados sean superiores a los esperados para una sinapsis en una única rama debido a la sumación espaciotemporal de los aportes de cada rama.

La mayor amplitud de los potenciales inhibitorios sobre los excitatorios podría deberse por un lado a que los primeros tienen una duración más prolongada (Iscla et al., 1999), por lo que estarían asociados a frecuencias más bajas y por lo tanto menos atenuadas. Una posibilidad adicional es que

las conexiones inhibitorias se produzcan en sitios más próximos al tronco que las excitatorias.

También es posible que el modelo puramente pasivo no pueda explicar la propagación de potenciales sinápticos desde las neuritas de diámetro más fino al soma y al sitio de bifurcación. En diversas neuronas de mamífero se halló que la señal sináptica activa respuestas voltaje dependientes que la magnifican y contribuyen a su propagación (Magee, 2000; Reyes, 2001). Futuros estudios deberán determinar con más detalle las características de las entradas sinápticas en las neuronas AE, su distribución en el árbol, y en consecuencia su capacidad de sumarse linealmente en el tronco.

6.3.4 Variaciones en la morfología

Para analizar qué aspectos de la morfología influyen en la atenuación observada, y en las diferencias existentes entre las distintas neuronas reconstruidas, impusimos variaciones a las morfologías originales.

En primer lugar comparamos las morfologías completas con las resultantes de remover todas las neuritas secundarias. Observamos que esta manipulación produjo una drástica disminución en la atenuación en ambos sentidos (Figuras 4.13, 4.17 y 4.18), que fue altamente sensible a la frecuencia de la señal (Figuras 4.15 y 4.19). Estos resultados muestran que el profuso árbol neurítico absorbe una gran parte de la carga, disminuyendo la constante de espacio para altas frecuencias.

Para analizar a qué aspectos de la morfología se debían las diferencias entre las neuronas reconstruidas construimos distintas variantes basadas en cilindros y conductancias puntuales. El radio promedio y la longitud del tronco, junto a la conductancia promedio que aportan el conjunto de neuritas secundarias, permiten reproducir la magnitud de la atenuación desde el soma hacia el punto de bifurcación. Sin embargo, el perfil espacial de la atenuación es bien diferente (Figura 4.22). En el sentido punto de bifurcación-soma, en cambio, esta combinación produce una atenuación total sensiblemente menor que la de la morfología detallada (Figura 4.23). Representando el tronco como un cilindro de radio variable que aproxime las variaciones en el radio de los

troncos reconstruidos, pudimos reproducir la magnitud y el perfil espacial de la atenuación en ambos sentidos.

Las ramas secundarias aportan conductancias distribuidas a lo largo del tronco principal cuyo perfil identificamos para cada una de las neuronas reconstruidas (Figura 4.21). Como ya se dijo, eliminarlas tuvo un efecto marcado en ambas direcciones. Pero alcanzó con restituir las como una conductancia uniformemente distribuida a lo largo del tronco para recobrar la atenuación del modelo completo. El detalle de su distribución espacial no tuvo mayor efecto, indicando que las neuritas se comportan de una manera muy similar a conductancias uniformemente distribuidas.

6.3.5 Deconvolución

Desarrollamos una técnica de deconvolución que nos permite estimar transitorios de corriente y de potencial remotos en un modelo pasivo a partir de la observación del potencial de membrana en un punto y conociendo el sitio de origen de la señal. Validamos el correcto funcionamiento del método simulando la inyección de la corriente obtenida y verificando que su inyección produce el efecto registrado en el sitio de observación.

Creemos que esta es una estrategia original ya que no hemos encontrado antecedentes de su uso en la literatura.

En los análisis anteriores estudiamos la atenuación de frecuencias individuales. Con el método de deconvolución pasamos a estudiar el comportamiento de todo el espectro de la señal en su conjunto, con lo que podemos obtener no sólo la amplitud sino la forma precisa que debería tener el potencial de acción en el origen para producir el observado en el soma.

La variabilidad en la amplitud y forma de los potenciales de acción registrados en el soma, y en la morfología de las neuronas reconstruidas dan lugar a un gran abanico de posibles señales de origen (Figura 5.5). Algunas de ellas representan potenciales de acción plausibles biológicamente y otras no.

Estos resultados nos muestran que, a pesar de tratarse de neuronas identificadas que son notablemente similares de animal en animal, la variabilidad

existente no permite tratarlas como indistintas. Sería necesario obtener los datos fisiológicos de las mismas neuronas de las que se obtiene la morfología para poder reducir esta incertidumbre. Mas allá de esta observación el proceso de deconvolución mostró claramente que existieron combinaciones de morfología y registros somáticos que permitieron deducir un potencial de acción en el sitio de origen con propiedades muy similares a las esperadas para un potencial de acción en neuronas de sanguijuela.

Bibliografía

- J. M. Bower y D. Beeman. *The Book of GENESIS: Exploring Realistic Neural Models with the GEneral NEural SIMulation System*. Springer-Verlag, 1998.
- P. J. Broser, R. Schulte, S. Lang, A. Roth, F. Helmchen, J. Waters, B. Sakmann y G. Wittum. Nonlinear anisotropic diffusion filtering of three-dimensional image data from two-photon microscopy. *J Biomed Opt*, 9(6):1253–64, 2004.
- R. C. Cannon, D. A. Turner, G. K. Pyapali y H. V. Wheal. An on-line archive of reconstructed hippocampal neurons. *J Neurosci Methods*, 84(1-2):49–54, 1998.
- N. T. Carnevale y D. Johnston. Electrophysiological characterization of remote chemical synapses. *J Neurophysiol*, 47(4):606–21, 1982.
- N. T. Carnevale, K. Y. Tsai, B. J. Claiborne y T. H. Brown. Comparative electrotonic analysis of three classes of rat hippocampal neurons. *J Neurophysiol*, 78(2):703–20, 1997.
- R. A. Chitwood, A. Hubbard y D. B. Jaffe. Passive electrotonic properties of rat hippocampal CA3 interneurons. *J Physiol*, 515 (Pt 3):743–56, 1999.
- B. D. Clark, E. M. Goldberg y B. Rudy. Electrotonic tuning of the axon initial segment. *Neuroscientist*, 15(6):651–68, 2009.
- J. Crank y P. Nicolson. A practical method for numerical evaluation of solutions of partial differential equations of the heat-conduction type. *Proc Cambridge Phil Soc*, 43(01):50–67, 1947.

- J. F. Evers, S. Schmitt, M. Sibila y C. Duch. Progress in functional neuroanatomy: precise automatic geometric reconstruction of neuronal morphology from confocal image stacks. *J Neurophysiol*, 93(4):2331–42, 2005.
- J. Fernandez. Structure of the leech nerve cord: distribution of neurons and organization of fiber pathways. *J. Comp.Neurology*, 180:165–192, 1978.
- J. W. Fleshman, I. Segev y R. B. Burke. Electrotonic architecture of type-identified alpha-motoneurons in the cat spinal cord. *J Neurophysiol*, 60(1):60–85, 1988.
- P. Fromherz y C. O. Muller. Cable properties of a straight neurite of a leech neuron probed by a voltage-sensitive dye. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 91:4604–4608, 1994.
- J. Golowasch, G. Thomas, A. L. Taylor, A. Patel, A. Pineda, C. Khalil y F. Nadim. Membrane capacitance measurements revisited: dependence of capacitance value on measurement method in nonisopotential neurons. *J Neurophysiol*, 102(4):2161–75, 2009.
- X. Gu, K. J. Muller y S. R. Young. Synaptic integration at a sensory-motor reflex in the leech. *J.Physiol.*, 441:733–754, 1991.
- E. B. Hendrickson, J. R. Edgerton y D. Jaeger. The capabilities and limitations of conductance-based compartmental neuron models with reduced branched or unbranched morphologies and active dendrites. *J Comput Neurosci*, 30(2):301–21, 2011.
- B. Hille. *Ionic Channels of Excitable Membranes*. Sinauer Associates, 1992.
- M. Hines. Efficient computation of branched nerve equations. *Int J Biomed Comput*, 15(1):69–76, 1984.
- M. L. Hines y N. T. Carnevale. The NEURON simulation environment. *Neural Comput*, 9(6):1179–209, 1997.

- A. L. Hodgkin y A. F. Huxley. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol*, 117(4):500–44, 1952.
- I. R. Iscla, P. D. Arini y L. Szczupak. Differential channeling of sensory stimuli onto a motor neuron in the leech. *J.Comp.Physiol.*, 184:233–241, 1999.
- D. B. Jaffe y N. T. Carnevale. Passive normalization of synaptic integration influenced by dendritic architecture. *J Neurophysiol*, 82(6):3268–85, 1999.
- C. Koch. *Biophysics of Computation: Information Processing in Single Neurons*. Oxford University Press, 1999.
- C. Koch y I. Segev. *Methods in neuronal modeling: From ions to networks*. The MIT Press, 1998.
- W. B. Kristan, R. L. Calabrese y W. O. Friesen. Neuronal control of leech behavior. *Prog Neurobiol*, 76(5):279–327, 2005.
- J. C. Magee. Dendritic integration of excitatory synaptic input. *Nat Rev Neurosci*, 1(3):181–90, 2000.
- G. Major, A. U. Larkman, P. Jonas, B. Sakmann y J. J. B. Jack. Detailed passive cable models of whole-cell recorded CA3 pyramidal neurons in rat hippocampal slices. *J. Neuroscience*, 14(8):4613–4638, 1994.
- P. S. Mangan, G. A. Curran, C. A. Hurney y W. O. Friesen. Modulation of swimming behavior in the medicinal leech. III. Control of cellular properties in motor neurons by serotonin. *J Comp Physiol A*, 175(6):709–22, 1994.
- M. Migliore y G. M. Shepherd. Emerging rules for the distributions of active dendritic conductances. *Nat Rev Neurosci*, 3(5):362–70, 2002.
- K. J. Muller y U. J. McMahan. The shapes of sensory and motor neurones and the distribution of their synapses in ganglia of the leech: a study using

- intracellular injection of horseradish peroxidase. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 194(1117):481–99, 1976.
- K. J. Muller, J. G. Nicholls y G. S. Stent. *Neurobiology of the leech*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1981.
- F. Nadim, O. H. Olsen, E. De Schutter y R. L. Calabrese. Modeling the leech heartbeat elemental oscillator. I. Interactions of intrinsic and synaptic currents. *J Comput Neurosci*, 2(3):215–35, 1995.
- J. G. Nicholls y D. A. Baylor. Specific modalities and receptive fields of sensory neurons in CNS of the leech. *J Neurophysiol*, 31(5):740–56, 1968.
- J. G. Nicholls, A. R. Martin y B. G. Wallace. *From Neuron to Brain: A Cellular and Molecular Approach to the Function of the Nervous System*. Sinauer Associates, 3rd edición, 1992.
- W. H. Press, S. A. Teukolsky, W. T. Vetterling y B. P. Flannery. *Numerical Recipes in C*. Cambridge University Press, 1992.
- R. Q. Quiroga, Z. Nadasdy y Y. Ben-Shaul. Unsupervised spike detection and sorting with wavelets and superparamagnetic clustering. *Neural Comput*, 16(8):1661–87, 2004.
- W. Rall, R. E. Burke, W. R. Holmes, J. J. Jack, S. J. Redman y I. Segev. Matching dendritic neuron models to experimental data. *Physiol Rev*, 72 (4 Suppl):S159–86, 1992.
- M. Rapp, I. Segev y Y. Yarom. Physiology, morphology and detailed passive models of guinea-pig cerebellar Purkinje cells. *J Physiol*, 474(1):101–18, 1994.
- L. Rela y L. Szczupak. Coactivation of motoneurons regulated by a network combining electrical and chemical synapses. *J Neurosci*, 23(2):682–92, 2003.
- A. Reyes. Influence of dendritic conductances on the input-output properties of neurons. *Annu Rev Neurosci*, 24:653–75, 2001.

- A. Rodriguez, D. Ehlenberger, K. Kelliher, M. Einstein, S. C. Henderson, J. H. Morrison, P. R. Hof y S. L. Wearne. Automated reconstruction of three-dimensional neuronal morphology from laser scanning microscopy images. *Methods*, 30(1):94–105, 2003.
- M. J. Rodriguez, I. R. Iscla y L. Szczupak. Modulation of mechanosensory responses by motoneurons that regulate skin surface topology in the leech. *J Neurophysiol*, 91(5):2366–75, 2004.
- A. Roth y M. Hausser. Compartmental models of rat cerebellar Purkinje cells based on simultaneous somatic and dendritic patch-clamp recordings. *J Physiol*, 535(Pt 2):445–72, 2001.
- N. Spruston. Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration. *Nat Rev Neurosci*, 9(3):206–21, 2008.
- A. E. Stuart. Physiological and morphological properties of motoneurons in the central nervous system of the leech. *J Physiol*, 209(3):627–46, 1970.
- G. Stuart y M. Hausser. Initiation and spread of sodium action potentials in cerebellar Purkinje cells. *Neuron*, 13(3):703–12, 1994.
- G. Stuart, N. Spruston, B. Sakmann y M. Hausser. Action potential initiation and backpropagation in neurons of the mammalian CNS. *Trends Neurosci*, 20(3):125–31, 1997.
- G. J. Stuart y B. Sakmann. Active propagation of somatic action potentials into neocortical pyramidal cell dendrites. *Nature*, 367(6458):69–72, 1994.
- A. E. Tobin, S. D. Van Hooser y R. L. Calabrese. Creation and reduction of a morphologically detailed model of a leech heart interneuron. *J Neurophysiol*, 2006.
- K. Y. Tsai, N. T. Carnevale, B. J. Claiborne y T. H. Brown. Efficient mapping from neuroanatomical to electrotonic space. *Network: Computation in Neural Systems*, 5(1):21–46, 1994.

- J. Waters, A. Schaefer y B. Sakmann. Backpropagating action potentials in neurones: measurement, mechanisms and potential functions. *Prog Biophys Mol Biol*, 87(1):145–70, 2005.
- R. Wessel, W. B. Kristan y D. Kleinfeld. Dendritic Ca²⁺-activated K⁺ conductances regulate electrical signal propagation in an invertebrate neuron. *J. Neuroscience*, 19(19):8319–8326, 1999.