

# Laboratorio de Electrofisiología: Plasticidad de la Transmisión Sináptica Eléctrica

## Objetivos

- Caracterizar una sinapsis eléctrica entre dos neuronas del sistema nervioso central de mamíferos.
- Estudiar la plasticidad sináptica eléctrica y sus mecanismos responsables.

## Metodología

Registraremos un par de neuronas acopladas eléctricamente del núcleo mesencefálico del trigémino (MesV), en patch clamp, configuración whole cell, tanto en fijación de corriente como de voltaje<sup>2</sup>. Además de estudiar las características electrofisiológicas de las neuronas, las estimularemos de forma alternada, para medir el coeficiente de acoplamiento, el impacto del acople en la resistencia de entrada (“loading”) y la conductancia de la unión gap. Bloquearemos mecanismos (como la bomba Na/K) para evaluar su impacto en la transmisión sináptica eléctrica. Por último, vamos a estimular a las neuronas para inducir plasticidad sináptica dependiente de actividad<sup>3</sup> (protocolo *VC\_Ca\_train\_gj\_pulse*) y evaluar sus componentes de corto y largo plazo.

## Caracterización de las propiedades electrofisiológicas de las neuronas

El protocolo en current clamp denominado *CC\_IV curve* consiste en pulsos de corriente, de -450 pA, -400 pA, -350 pA<sup>4</sup>, etc, de 200 ms de duración, aplicados luego de una línea de base de 100 ms, a dos células al mismo tiempo. El protocolo *CC\_IV curve ch#1ch#2* es similar, pero aplicando el estímulo a una neurona a la vez.

Para cada célula registrada simultáneamente o aisladamente, calcular:

- Potencial de membrana de reposo (RMP: Resting Membrane Potential).
- Resistencia de entrada, usando las respuestas hiperpolarizantes (pico y estado estacionario).
- Corriente mínima para generar un potencial de acción.
- Amplitud, duración y tiempo al pico del primer potencial de acción.

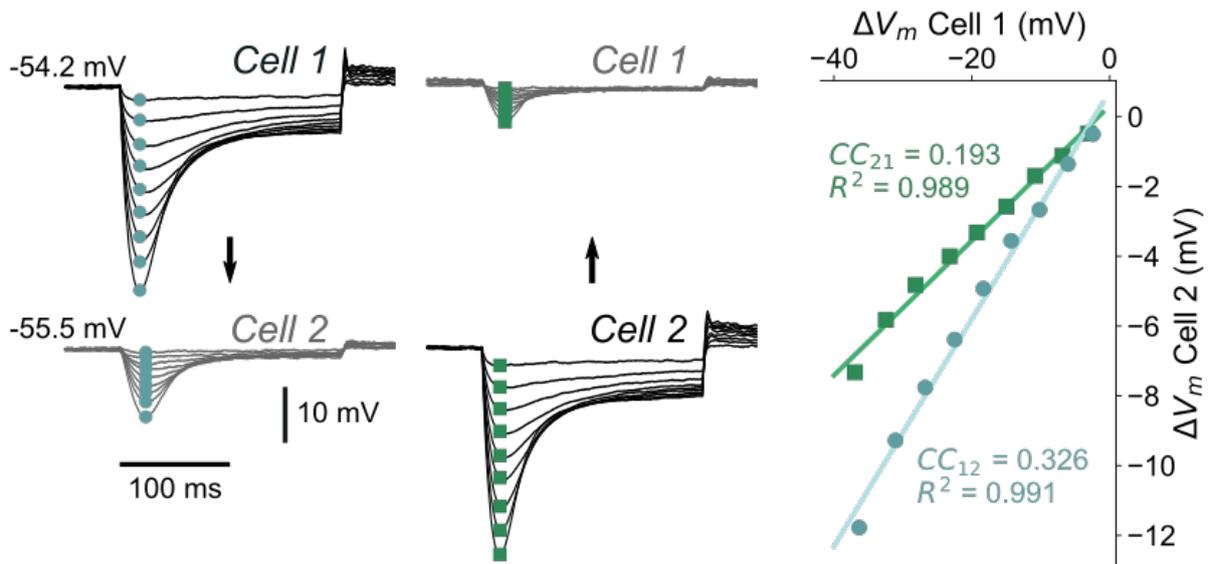
<sup>2</sup> Curti et al, 2012.

<sup>3</sup> Landisman & Connors, 2005

<sup>4</sup> A menos que estén indicados otros valores en la bitácora.

### Coeficiente de acoplamiento

Para las células activadas no simultáneamente (protocolo *CC\_IV curve ch#1\_ch#2*) calcular, en ambas direcciones, el coeficiente de acoplamiento  $CC$ : cociente entre la respuesta en potencial de la neurona post y la presináptica. Hacerlo para las respuestas hiperpolarizantes en el mínimo (ver figura debajo) y en el estado estacionario.

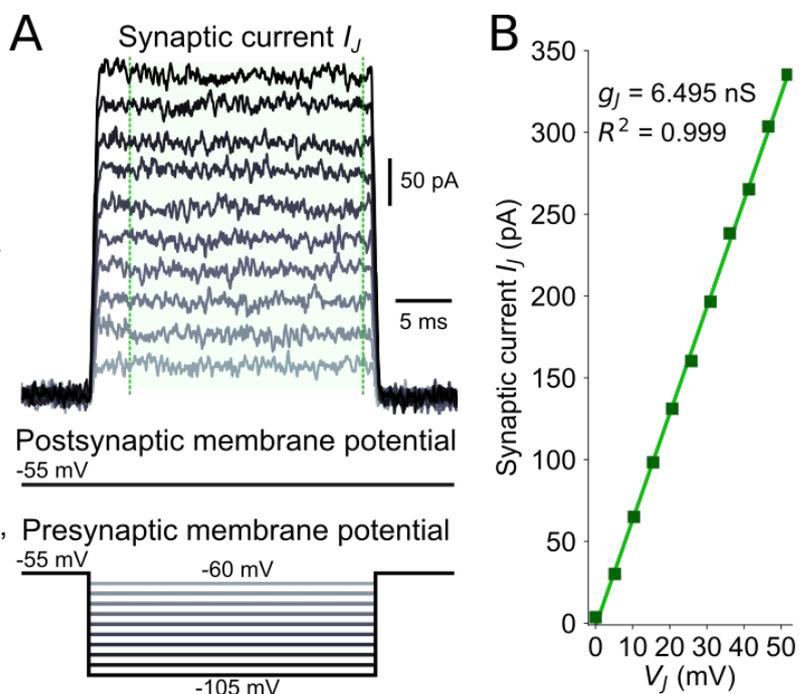


### Conductancia de unión gap

Calcular la conductancia  $g_j$  de la unión gap, a partir de las repuestas en corriente, de la neurona postsináptica, durante el protocolo *VC\_IVcurveGJ\_ch#1\_ch#2* (ver figura), en ambas direcciones.

De forma similar, calcular  $g_j$  a partir de pulsos hiperpolarizantes de -50 mV de amplitud, durante cambios de solución extracelular y la aplicación de protocolos de inducción de plasticidad.

Por otro lado, medir la resistencia de entrada de la célula presináptica, a partir de sus respuestas en corriente a los pulsos de voltaje (restar  $g_j$ ).



Equipo martes 130623: Mariana, Lía y Federica

Experimento en presencia de ouabaína 50  $\mu$ M (bloqueador bomba Na/K)

**CC\_IV curve: estimulación simultánea de ambas neuronas, en fijación de corriente**

Archivo 130623034

- Medir la resistencia de entrada  $R_{IN}$  de cada una de las dos neuronas, usando las repuestas a pulsos hiperpolarizantes (-450 pA, -400 pA, -350 pA, etc.). ¿Son similares?

**CC\_IV curve ch#1\_ch#2: estimulación alternada a cada neurona, en fijación de corriente**

Archivo 130623033

- Medir la resistencia de entrada  $R_{IN}$  de cada una de las dos neuronas, usando las repuestas a pulsos hiperpolarizantes (-450 pA, -400 pA, -350 pA, etc.) y comparar con la resistencia de entrada para estimulación simultánea (archivo 130623034).
- Calcular el coeficiente de acoplamiento CC, en ambas direcciones, para el potencial de acción, y para pico mínimo y estado estacionario de respuestas hiperpolarizantes (ver página anterior). ¿Existe direccionalidad?

**VC\_IVcurveGJ\_ch#1\_ch#2\_poco\_acople: estimulación alternada a cada neurona, en fijación de voltaje.** Mientras que una neurona se mantenía a potencial fijo, a la otra se le aplicaron pulsos de 0 mV, -5 mV, -10 mV, -15 mV, -20 mV, etc, durante 20 ms.

Archivos 130623036, 130623037, 130623039, 130623041, 130623043, 130623045, 130623046, 130623049, 130623055. Para cada uno:

- Medir la conductancia  $g_J$  de la unión gap en ambas direcciones, usando la respuesta en corriente de la neurona postsináptica (ver página anterior). ¿Rectifica?
- Medir la resistencia de entrada  $R_{IN}$  de ambas neuronas, usando la respuesta en corriente de la neurona presináptica (usar valor del mínimo de la respuesta). Recordar restar la conductancia de la unión gap  $g_J$ .
- Graficar en función del tiempo, usando los *timestamps* correspondientes (ver tabla bitácora). ¿Se percibe algún cambio en  $R_{IN}$  y/o  $g_J$  entre los archivos 043 y el 045?

**VC\_Ca\_train\_gj\_pulse: protocolo de inducción de la plasticidad sináptica eléctrica, en fijación de voltaje.** Ambas neuronas fueron estimuladas 25 veces, cada 29 segundos. Durante cada estimulación, se aplicó un pulso, de -50 mV de amplitud y 20 ms de duración, a cada neurona (en  $t = 0.3$  segundos para la neurona en el canal 1,  $t = 1.0$  segundos en el canal 2).

Archivo 130623044

- Graficar la conductancia  $g_J$  de la unión gap en ambas direcciones, en función del tiempo, usando la respuesta en la neurona postsináptica a cada pulso en la presináptica.

## Equipo viernes 160623: Rocío, Tamara y Santiago

### Experimento en condiciones de control

#### **CC\_IV curve: estimulación simultánea de ambas neuronas, en fijación de corriente**

Archivo 160623021

- Medir la resistencia de entrada  $R_{IN}$  de cada una de las dos neuronas, usando las repuestas a pulsos hiperpolarizantes (-450 pA, -400 pA, -350 pA, etc.). ¿Son similares?

#### **CC\_IV curve ch#1\_ch#2: estimulación alternada a cada neurona, en fijación de corriente**

Archivo 1606230218

- Medir la resistencia de entrada  $R_{IN}$  de cada una de las dos neuronas, usando las repuestas a pulsos hiperpolarizantes (-450 pA, -400 pA, -350 pA, etc.) y comparar con la resistencia de entrada para estimulación simultánea (archivo 160623021).
- Calcular el coeficiente de acoplamiento  $CC$ , en ambas direcciones, para el potencial de acción, y para pico mínimo y estado estacionario de respuestas hiperpolarizantes (ver página anterior). ¿Existe direccionalidad?

#### **VC\_IVcurveGJ\_ch#1\_ch#2\_poco\_acople: estimulación alternada a cada neurona, en fijación de voltaje.** Mientras que una neurona se mantenía a potencial fijo, a la otra se le aplicaron pulsos de 0 mV, -5 mV, -10 mV, -15 mV, -20 mV, etc, durante 20 ms.

Archivos 160623020, 160623022, 160623023 160623025, 160623027, 160623029, 160623030, 160623031. Para cada uno:

- Medir la conductancia  $g_J$  de la unión gap en ambas direcciones, usando la respuesta en corriente de la neurona postsináptica (ver página anterior). ¿Rectifica?
- Medir la resistencia de entrada  $R_{IN}$  de ambas neuronas, usando la respuesta en corriente de la neurona presináptica (usar valor del mínimo de la respuesta). Recordar restar la conductancia de la unión gap  $g_J$ .
- Graficar en función del tiempo, usando los *timestamps* correspondientes (ver tabla bitácora). ¿Se percibe algún cambio en  $R_{IN}$  y/o  $g_J$  entre los archivos 027 y el 029?

#### **VC\_Ca\_train\_gj\_pulse: protocolo de inducción de la plasticidad sináptica eléctrica, en fijación de voltaje.** Ambas neuronas fueron estimuladas 25 veces, cada 29 segundos. Durante cada estimulación, se aplicó un pulso, de -50 mV de amplitud y 20 ms de duración, a cada neurona (en $t = 0.3$ segundos para la neurona en el canal 1, $t = 1.0$ segundos en el canal 2).

Archivo 160623028

- Graficar la conductancia  $g_J$  de la unión gap en ambas direcciones, en función del tiempo, usando la respuesta en la neurona postsináptica a cada pulso en la presináptica.