

Laboratorio de Electrofisiología: Excitabilidad Neuronal

Pautas generales

- Crear una copia local de los archivos correspondientes al día del laboratorio que les tocó.
- Los archivos tienen como nombre el día y su número. Por ejemplo, *180423005.axgd* fue el quinto archivo adquirido el 18/4/23 (.axgd es el formato nativo de Axograph).
- La bitácora de registros está escaneada en pdf, así como en un archivo separado por tabuladores (.tsv), con los nombres de los archivos, los protocolos de estimulación utilizados (CC: Current Clamp; VC: Voltage Clamp), timestamps y el identificador de las células (id).
- Procesar los archivos en formato Hierarchical Data Format (extensión .hdf5). Usar la librería h5py de Python (preferido), o las funciones equivalentes en Matlab.
- El primer array corresponde al tiempo (en segundos), los siguientes son los trazados registrados, que pueden ser de corriente o voltaje (Ampères o Volts), dependiendo de si se trabajó en Current Clamp o Voltage Clamp.
- Si se registraron dos neuronas simultáneamente (dos canales en el amplificador), los trazados se van alternando: trazados 1, 3, 5, 7, etc. corresponden a la célula en el canal 1, los trazados 2, 4, 6, 8, etc. a la célula en el canal 2.
- Presentar datos en mV, nA o pA, ms, etc. Usar colores para comparar condiciones de registro (reservar negro para la condición de control).

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 pA¹, etc. de 200 ms de duración, aplicados luego de una línea de base de 100 ms. Para cada célula registrada, calcular:

- Potencial de membrana de reposo (RMP: Resting Membrane Potential).
- Resistencia de entrada, usando las respuestas hiperpolarizantes (pico y estado estacionario) y despolarizantes subumbrales.
- Constante de tiempo para los pulsos hiperpolarizantes.
- Amplitud del rebote de potencial hiperpolarizante ("sag").
- Corriente mínima para generar un potencial de acción y umbral (derivada segunda).
- Amplitud, duración y tiempo al pico del primer potencial de acción.
- Diagrama de fase del potencial de acción: gráfica de la derivada primera del potencial de membrana versus potencial de membrana, indicando el umbral.
- Amplitud de la hiperpolarización posterior al potencial de acción (AHP: After-Hyperpolarization Potential).
- (Opcional) Las componentes en frecuencia de la parte plana de las respuestas a pulsos despolarizantes. ¿Pueden evidenciarse oscilaciones subumbrales?

Los protocolos *CC zap ch#1_v2* y *CC zap ch#2_v2* consisten en la aplicación de corriente sinusoidal de amplitud constante (100 pA) y frecuencia variable, a cada célula por separado. Se registró el estímulo y la respuesta de la neurona. Calcular módulo y fase de la impedancia de cada neurona.

¹ A menos que estén indicados otros valores en la bitácora. Por ejemplo, en presencia de cloruro de cesio (CsCl), la corriente mínima fue de -250 pA y el salto entre valores de 25 pA.

Equipo martes 180423: Rocío, Lía y Federica

- 1) Caracterizar las propiedades electrofisiológicas de las neuronas del Núcleo Mesencéfalo del Trigémino, en control y en presencia de cloruro de cesio (CsCl), usando los archivos:
 - a) *CC_IV curve*: 003 (Control), 013 (CsCl). Notar que los pulsos de corriente tienen distintos valores. ¿Qué propiedades cambiaron entre las condiciones?
 - b) *CC zap ch#1_v2* y *CC zap ch#2_v2*: 004 y 005 (Control), 014 y 015 (CsCl).

- 2) El protocolo *VC_IV curve_Ih* consiste en una familia de pulsos de voltaje, de valores: -45 mV, -50 mV, -55 mV, -60 mV, etc. Cada pulso tiene 2 segundos de duración, y es lanzado luego de 20 ms desde un potencial de mantenimiento de -55 mV. Luego de cada pulso, el potencial de membrana se establece en -70 mV durante 50 ms (post-pulso para calcular corriente de cola), antes de retornar a la línea de base.
 - a) Observar las corrientes crudas registradas en Control (006), cloruro de bario (BaCl_2 ; 007) y CsCl (009).

El BaCl_2 bloquea fundamentalmente una corriente de fuga de potasio, denominada Potassium Inward Rectifier (I_{KIR}).

El CsCl bloquea fundamentalmente la corriente activada por hiperpolarización, I_{H} .
 - b) Restando los archivos pertinentes, calcular I_{KIR} , a partir de la corriente instantánea, luego del artefacto del estímulo para cada valor de potencial de membrana. ¿Es una corriente de fuga? ¿Su potencial de reversión es el esperado?
 - c) Restando los archivos pertinentes, calcular I_{H} . Usando ajustes exponenciales, obtener la constante de tiempo para cada potencial. Utilizar el post-pulso para computar la curva de activación para su conductancia. El potencial de reversión E_{H} vale -28.7 mV. ¿Cómo se compara con los potenciales de reversión de sodio y potasio?

- 3) Los archivos 021, 022 y 023 fueron obtenidos de la neurona en el canal 1, utilizando una senoide de frecuencia variable de mayor duración, diseñada en base al artículo:

Tseng H & Nadim F. The Membrane Potential Waveform of Bursting Pacemaker Neurons Is a Predictor of Their Preferred Frequency and the Network Cycle Frequency. *Journal of Neuroscience* 2010, 30 (32) 10809-10819.

Se aplicó una corriente de mantenimiento para modificar el potencial de reposo en cada archivo.

 - a) Observar los trazados crudos. ¿A qué se deben las diferencias?
 - b) Calcular la impedancia de la neurona para distintos “puntos de operación” (potenciales de reposo).

Equipo sábado 220423: Tamara, Santiago y Mariana

- 1) Registramos dos tipos de neuronas: del Locus Coeruleus (LC) y del Núcleo Mesencéfalo del Trigémino (MesV). Comparar visualmente las propiedades electrofisiológicas de ambos tipos de neuronas, en condición de control.
 - a) *CC_IV curve*: 004 (LC), 006 (MesV). Notar que los pulsos de corriente tienen distintos valores y fueron también registrados en 004.
(Opcional: calcular la cantidad de potenciales de acción y la frecuencia de disparo para 004. ¿Hay acomodación en frecuencia?)
 - b) *CC zap ch#1_v2* y *CC zap ch#2_v2*: 005 (LC), 008 y 009 (MesV).
- 2) Sustituimos la solución extracelular estándar (ACSF: Artificial Cerebrospinal Fluid) por una basada en cloruro de colina (ver hoja de soluciones). Ilustrar cómo fueron cambiando las propiedades electrofisiológicas de las neuronas en el tiempo, usando los archivos 006 (Control) y 010 a 014 (sustitución paulatina del sodio por colina). Focalizar en el potencial de reposo y el potencial de acción. Calcular el potencial de reversión del sodio para ambas soluciones.
- 3) Comparar gráficamente el potencial de reposo y el potencial de acción en los archivos 006 (Control), 014 (último con cloruro de colina) y 015 (con TTX y CsCl; notar distinta amplitud de pulsos).

Una concentración de 30 μM de 4-aminopiridina (4-AP) bloquea sólo a la corriente de potasio tipo D (I_D). 4-AP 1 mM bloquea además la corriente de potasio tipo A (I_A).

- 4) Hacer lo mismo que en 3), pero para las células en los archivos 022 (Control), 026 (4-AP 30 μM) y 031 (4-AP 2 mM; notar diferente duración de los pulsos).

El protocolo *VC_IVcurve_IA_postpulse70* mide las corrientes de potasio tipo D y A, realizamos una serie de pulsos de voltaje, de valores: -70 mV, -65 mV, -60 mV, etc. Cada pulso tiene 500 ms de duración, y es lanzado luego de 20 ms desde un potencial de mantenimiento de -70 mV. Luego de cada pulso, el potencial de membrana se establece en -30 mV durante 10 ms, antes de retornar a la línea de base.

Los archivos a utilizar son: 016 (sin bloqueadores de I_D/I_A), 017 (4-AP 30 μM) y 018 (4-AP 1 mM). Excluir trazados en los que el amplificador saturó

- 5) Restando los archivos pertinentes, calcular I_A e I_D . Calcular la curva de activación, usando los picos de las respuestas y dividiendo la corriente por la "driving force". Haciendo ajustes exponenciales, computar las constantes de tiempo de activación e inactivación. Utilizar el post-pulso a -30 mV para obtener la curva de inactivación.

Soluciones utilizadas

Solución intracelular:

Gluconato de potasio 148 mM, Na₂-ATP 4 mM, Na-GTP 0.3 mM, MgCl₂ 3 mM, EGTA 0.2 mM, HEPES 10 mM. pH = 7.2

Solución extracelular estándar (ACSF):

NaCl: 124 mM, NaHCO₃ (bicarbonato de sodio) 26 mM, KH₂PO₄ 1.25 mM, MgSO₄ 2, KCl 2.69, CaCl₂ 2 mM, glucosa 10 mM. pH = 7.4

Solución extracelular basada en cloruro de colina:

Cloruro de colina: 124 mM, NaHCO₃ 26 mM, KH₂PO₄ 1.25 mM, MgSO₄ 2, KCl 2.69, CaCl₂ 2 mM, glucosa 10 mM. pH = 7.4