

Neurociencia Básica

Práctico computacional 2

Daniel Herrera
dherrera@fcien.edu.uy

1 Tutorial 2: Agregar procesos neurales

En esta guía construiremos una célula con procesos neurales (dendrita y axón) conectados con el soma. También mostramos cómo definir la neurona con la línea de comando en lugar del GUI.

1.1 Especificación del sistema ejemplo

Empezamos definiendo sólo una neurona con una dendrita.

- Geometría: Soma de $30\ \mu\text{m}$ de diámetro y $30\ \mu\text{m}$ de largo, con una dendrita de $2\ \mu\text{m}$ de diámetro y $1000\ \mu\text{m}$ de largo, discretizada en 2000 segmentos ($n_{\text{seg}} = 2000$).
- Biofísica: Mecanismos pasivos en toda la célula, con $g_{pas} = 0.001\ \text{S}/\text{cm}^2$ y $e_{pas} = -65\ \text{mV}$. Mecanismo de HH en el soma, con los valores default.
- Estimulación: Inyección de un pulso cuadrado de corriente de $5\ \text{ms}$ de duración con un delay de $1\ \text{ms}$ y $1\ \text{nA}$ de amplitud, inyectado en la dendrita a $500\ \mu\text{m}$ del soma
- Datos: Graficar el V_m a lo largo de la célula durante la inyección del pulso de corriente, y el V_m del soma a lo largo del tiempo.

1.2 Implementación con del sistema ejemplo

En esta guía mostramos cómo definir el sistema a modelar mediante la línea de comando, lo que consiste en pasarle al programa las instrucciones de forma escrita mediante la terminal que dice *oc*, y que aparece al iniciar el NEURON.¹. El código que se muestra en las instrucciones de la guía permite:

¹En el anexo se muestra cómo hacerlo desde la GUI, si quiere utilice el GUI para definir la célula y retome esta guía desde la parte de **Recolección de datos**.

1. Crear las secciones de interés (soma y dendrita)
2. Conectar las secciones de la forma deseada
3. Cambiar sus parámetros geométricos
4. Insertar mecanismos biofísicos y modificar sus parámetros
5. Inyectar un pulso de corriente

1.2.1 Implementación de la célula en línea de comando

Paso 1: Creamos las secciones de la célula con la función *create*.

```
create soma
create dendrita
```

La función *create* siempre crea secciones iguales, los nombres que les ponemos son sólo para identificarlos (ej. podríamos haberles llamado *seccion1* y *seccion2* en lugar de *soma* y *dendrita*).

Paso 2: Conectamos las dos secciones con la función *connect*. Esta función le indica al programa que las secciones están conectadas, lo que le va dando ‘forma’ a la célula, y permite que la corriente fluya entre las secciones.

```
connect dendrita(0), soma(0)
```

Los números entre paréntesis le indican al NEURON en qué parte de las secciones hacer la conexión. Como vimos antes, cada sección en NEURON es un cilindro, y la zona específica del cilindro se indica con el número entre paréntesis, siendo 0 un extremo y 1 el otro. Para usar la función *connect* debemos indicar dónde específicamente hacer la conexión entre las secciones. El código de arriba conecta el extremo 0 de la dendrita al extremo 0 del soma (podríamos haber conectado a la dendrita en la mitad del soma, usando *soma(0.5)*, por ejemplo). Notemos que la distancia ‘absoluta’ indicada por el paréntesis depende del tamaño de la sección (ej. para una sección de largo 1000 μm el punto 0.25 es a 250 μm del extremo).

Paso 3: Especificamos la geometría de estas secciones. Al crear una sección, esta ya es creada con unos determinados parámetros geométricos por default. Podemos ver los parámetros de una sección escribiendo el nombre de la misma seguido de la función *psection()*:

```
soma psection()
```

Para cambiar un parámetro de una sección, podemos acceder al mismo poniendo el nombre de la sección y el parámetro separados por un punto, y poner el valor al que lo queremos hacer igual (**seccion.parametro = X**). En el ejemplo siguiente seteamos la geometría de la célula a lo que indican las instrucciones:

```
soma.L = 30
soma.diam = 30
dendrita.L = 1000
dendrita.diam = 2
dendrita.nseg = 2000
```

Para ver las propiedades de toda la célula escribimos *forall* ('para todos'):

```
forall psection()
```

Paso 4: Insertamos los procesos biofísicos que queremos en cada sección. A diferencia de la geometría que viene por default en la célula, los procesos biofísicos hay que insertarlos con la función **insert**. Ahí aparecerán nuevos parámetros en la sección que podemos modificar igual que los parámetros geométricos:

```
soma insert pas
soma insert hh
dendrita insert pas
soma.e_pas = -65
dendrita.e_pas = -65
```

Paso 5: Definir el pulso de corriente. Para definir una inyección de corriente, primero debemos crear un objeto vacío con la función *objref*, que llamaremos 'impulso'. Luego, convertimos este objeto en una inyección de corriente situada en la mitad de la dendrita, indicando primero la sección en donde va la inyección, luego el nombre del objeto vacío creado, y después con la función *new*, seteándolo igual a un clampeo de corriente. El 0.5 adentro del paréntesis indica la posición dentro de la sección donde va la corriente (es decir, indica la mitad de la dendrita, a 500 μm del soma).

```
objref impulso
dendrita impulso = new IClamp(0.5)
```

Finalmente, definimos los parámetros que queremos para el nuevo objeto, como lo hicimos con los parámetros geométricos de las secciones:

```
impulso.dur = 5
impulso.amp = 1
impulso.del = 1
```

Si más adelante queremos mover el estímulo, ponemos primero el nombre de la nueva sección donde lo queremos ubicar, y luego con el parámetro *loc* indicamos su nueva ubicación en esta sección. En el siguiente ejemplo movemos el impulso a 100 μm del soma y luego lo devolvemos a su lugar (500 μm del soma):

```
dendrita impulso.loc(0.1)
dendrita impulso.loc(0.5)
```

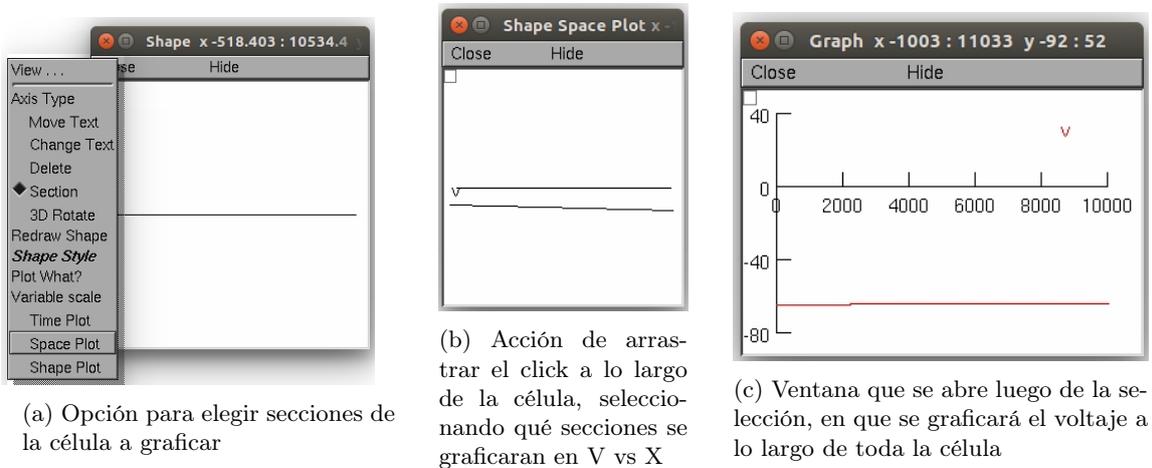


Figure 1: Instrucciones para generar el gráfico del voltaje a lo largo de la célula

1.2.2 Gráficas

Ahora que tenemos una dendrita donde el voltaje cambia en el tiempo y en el espacio, queremos visualizar el perfil espacial de voltaje, para lo que tenemos que usar un nuevo tipo de gráfica. Seleccionamos *Main Menu* → *Graph* → *Shape Plot* con lo que se abre un menú con un esquema de la neurona. Seleccionamos *Cuadrado Blanco* → *Space Plot* (Figura 1a), y ahora seleccionamos en el esquema de la célula las secciones que queremos graficar. Apretamos click en un extremo de la célula, y manteniendo apretado arrastramos al otro extremo (Figura 1b). Esto abre una nueva gráfica, donde el eje de x es la distancia a lo largo de nuestra selección de la célula, y en el eje de y, por default se muestra el voltaje de membrana (Figura 1c), aunque se pueden graficar otros parámetros.

Para graficar el voltaje del soma en función del tiempo hacemos como en el tutorial anterior: *Main Menu* → *Graph* → *Voltage axis*. Una vez abierta la gráfica seleccionamos para graficar *soma.v(0.5)* (se puede seleccionar clickeando o escribirlo en el menú de *Plot What*).

Guardar. Se puede guardar el trabajo realizado por si se quiere retomar más tarde desde este punto.

Iniciar la simulación. Para iniciar la simulación abrimos el menú de *RunControl* como en el tutorial anterior. Un detalle que hay que tomar en cuenta, es que cuando apretamos *Init&Run* en la gráfica espacial sólo se muestra el perfil de voltaje al final de la simulación, con lo que nos perdemos la evolución del mismo. Elija como *Tstop* el momento en que se deja de inyectar la corriente, y corra la simulación.

Correr la simulación de a poco

Avanzar la simulación de a pasos. Para ver la evolución del perfil de voltaje podemos ir corriendo la simulación de a pedazos, usando la opción

Continue for en el menú *RunControl*. Cada vez que apretamos en ese botón, la simulación avanza el tiempo indicado a su derecha, y se actualiza la gráfica del perfil espacial del voltaje, con lo que podemos ver la progresión del mismo. Si queremos reiniciar la simulación presionamos en *Init (mV)* en el menú *Run Control*.

Generar gráficas superpuestas. También podemos indicarle a una gráfica que guarde todos los trazos que se vayan haciendo. Esto puede, por ejemplo, permitirnos ver en una misma imagen diferentes simulaciones, o varios perfiles de voltaje en el tiempo. Esta opción se activa en *Cuadrado Blanco* → *Keep Lines*. Si queremos reiniciar la gráfica, podemos seleccionar *Erase* en el menú del cuadrado blanco.

1.3 Ejercicios: Soma con dendrita

Recomendación: Una forma conveniente y más prolija de hacer los ejercicios con la línea de comando es escribir los comandos en un procesador de texto (ej. Notepad/Block de notas), y de ahí copiarlas a la línea de comando. Para copiar texto a la línea de comando de NEURON en Windows, copie el texto que quiere pegar, y luego apriete click derecho sobre la terminal del NEURON.

1. Con el sistema construido en el tutorial, grafique el voltaje a lo largo de la célula cada 0.25 ms hasta 2 ms luego de que se dejó de inyectar la corriente (vea el recuadro de la guía para ver instrucciones detalladas). ¿Qué forma tiene la curva de voltaje mientras se inyecta corriente? El perfil de voltaje es asimétrico, ¿porqué?
2. Abra un nuevo *Space Plot*. Borre el gráfico de Voltaje que aparece por default (*Cuadrado blanco* → *Delete* y clickee sobre la 'v'). Entre en *Cuadrado blanco* → *Plot what?*, y en el cuadro escriba *i_pas*. Repita y escriba *i_cap*. Estas son, respectivamente, la corriente pasiva (la que pasa por los canales pasivos de membrana), y la corriente capacitiva (que va a cargar la membrana de la neurona, y cambiar V_m), en cada punto a lo largo de la misma. Póngales colores diferentes para identificarlos. Ajustemos los ejes a las nuevas variables: *Cuadrado blanco* → *View* → *Set View*, y para el eje de X ponga 0 y 1000, separados por un espacio (a veces la distancia aparece graficada al revés y debe poner -1000 y 0 en X, preste atención a esto), y para el eje de Y ponga -0.05 y 0.05 separados por un espacio. Avance la simulación de a 0.1 ms (los cambios ocurren rápido, asique es importante usar un intervalo chico), hasta 2 ms después de que se termina la corriente. ¿Porqué la corriente capacitiva aumenta cuando comienza el pulso, pero rápidamente se acerca a 0, aunque sigamos inyectando corriente? ¿Porqué la corriente pasiva tarda en llegar a su máximo luego de que se empezó a inyectar la corriente? El cambio en potencial de membrana disminuye a medida que nos alejamos del punto de inyección, ¿porqué ocurre eso y que rol juegan estas dos corrientes en ese fenómeno?
3. Determine la amplitud de *corriente* inyectada necesaria para producir un potencial de acción para pulsos inyectados a 0 μm , 100 μm , 200 μm , 500 μm

- y 1000 μm de distancia del soma. Utilice para esto pulsos de corriente de 10 ms de duración. ¿Qué observación hace de la relación entre distancia y amplitud umbral del pulso? ¿Cómo se relaciona con lo visto en la pregunta anterior, y con las ecuaciones vistas en el teórico?
4. Aumente el diámetro de la dendrita a 4 μm ¿Cómo cambia la amplitud de corriente umbral a 500 μm para generar un PA? Proponga una explicación.
 5. Proponga dos modificaciones que pudiera hacer sobre los parámetros de la célula (dendrita o soma) para disminuir la amplitud umbral observada a 500 μm . Pruebe si se cumple su hipótesis y explique porqué o porqué no. Después deshaga los cambios que hizo.
 6. **(Este ejercicio no es necesario para el informe)** Devuelva a la dendrita a un diámetro de 2 μm .
 - Agregue otra dendrita al soma, con las mismas propiedades que la primera pero con un largo de $L = 5000$ y $\text{diam} = 2$ (recuerde definir propiedades pasivas, e_{pas} , n_{seg}). ¿Cambia la amplitud umbral a 500 μm que encontró para el pulso en la primera dendrita? ¿Porqué?
 - Agregue HH a la nueva dendrita (ahora es un axón) y vuelva a probar si cambia el umbral. ¿Cómo explica esta última observación?
 7. **(Este ejercicio no es necesario para el informe)** Con la célula como quedó del experimento anterior: abra un nuevo *Shape Plot* y grafique el voltaje a lo largo de la célula. Vea cómo el PA se transmite a lo largo del axón. Pruebe el efecto de reducir la capacitancia del axón.
 8. Una característica importante de los axones de mamíferos es que muchos están mielinizados, lo que ayuda a acelerar la transmisión del PA. En estos axones hay nodos donde el axón está ‘desnudo’ (sin cubierta de mielina), y que tienen alta densidad de canales de HH, y que se encuentran separados entre sí por los internodos, regiones de axón cubierto por una vaina de mielina que reduce la capacitancia y la conductividad del axón. Describa cómo podría crear en el NEURON una neurona con un soma y un axón mielinado (es decir, con nodos e internodos alternándose). La pregunta siguiente puede ayudarlo con esta pregunta.
 9. Definamos que los nodos del axón tienen mecanismos pasivos y de HH, ambos con los parámetros biofísicos por default de NEURON, y que tienen un largo de 5 μm . Definamos que los internodos no tienen mecanismo de HH, que tienen mecanismo pasivo con una conductancia 10 veces menor que el nodo ($g_{\text{pas}} = 0.0001$), y que tienen una capacitancia 20 veces menor ($cm = 0.05$)². Comience una nueva simulación y construya una neurona con: 1 soma de 30 x 30 micras, con mecanismos pasivos y de HH, y un axón de 3 μm de diámetro, con 3 nodos y 2 internodos (nodo-internodo-nodo-internodo-nodo), con las propiedades especificadas arriba. Ponga un largo en los internodos de 500 μm . Incluya un impulso de corriente sobre

²Parámetros estimados de *Cohen et al., 2020, Cell 180, 311–322*

el soma, de duración 0.5 ms y amplitud 2 nA³. Grafique el voltaje del nodo más alejado del soma. Con este sistema que acaba de definir puede ahora ver si el PA generado en el soma logra transmitirse hasta el final del axón. Utilice este sistema para estimar el largo máximo de los internodos que permite que el PA se transmita por el axón. Use sólo largos que sean múltiplos de 100 μm , para facilitar el trabajo. Si no logra implementar el sistema exitosamente, describa qué intentó hacer con palabras.

Como comentario, note que en el último ejercicio está estimando el máximo teórico del largo del internodo para las neuronas. Cuanto más largo sea el internodo, en general más eficiente será la transmisión del PA. El largo máximo teórico puede compararse con el largo experimental observado, para ver qué tanto la evolución acerca a la neurona a los máximos permitidos por la física. También podría extenderse el análisis para ver el efecto de diferentes parámetros (ej. diámetro del axón, capacitancia del internodo, densidad de canales de HH en el nodo, etc) sobre el máximo teórico, y generar hipótesis sobre qué debería observarse en el sistema nervioso.

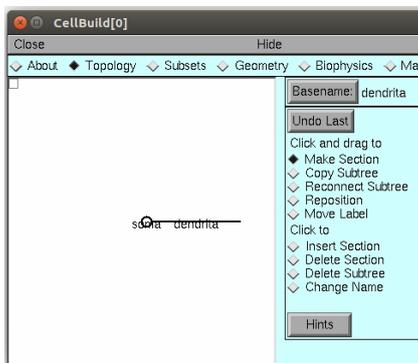
2 Anexo: Implementación de la célula con GUI

Topología. Abrimos el menú *CellBuilder* como en la guía 1. Vamos al submenú *Topology*, donde podemos crear nuevas secciones y conectarlas. Primero apretamos en *Basename* para elegir el nombre que tendrá la sección que creamos, y le llamamos ‘dendrita’. Luego, con la opción *Make Section* seleccionada en el menú de la derecha, hacemos click un par de centímetros a la derecha del soma. Vemos que la opción crea una nueva sección desde el soma hasta donde hicimos click (Figura 2a). En caso de que querramos borrar secciones, también lo hacemos en este menú seleccionando *Delete Section* y haciendo click sobre la sección que querramos borrar. Ahora tenemos un soma y una dendrita conectadas. Vale aclarar que el largo de la dendrita en el dibujo no tiene ningún efecto, las secciones siempre se crean del mismo largo.

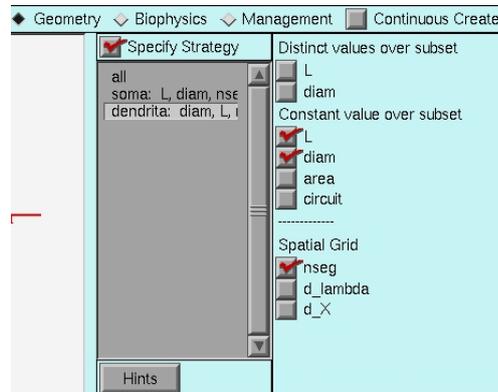
Geometría Ahora, yendo al submenú de *Geometry*, vemos que tenemos el soma y la dendrita para modificar en el panel gris (Figura 2b). Seleccionamos el soma en el panel gris y las propiedades *L* y *diam* a la derecha para modificarlas. Hacemos lo mismo con la dendrita, agregando la propiedad *nseg*. Apretamos *Specify Strategy* como en la primera guía, y modificamos los parámetros de acuerdo a lo especificado en la sección 1.1.

Biofísica. De la misma forma en que definimos la geometría de la nueva sección, en el submenú de *Biophysics* podemos seleccionar a la dendrita y modificar sus parámetros biofísicos. Seleccionamos el soma y le introducimos el mecanismo pasivo y el de HH. Seleccionamos la dendrita y le introducimos el mecanismo

³Como ayuda, un ejemplo de las primeras conexiones que debería implementar son: *connect nodo1(0), soma(0); connect internodo1(0), nodo1(1); connect nodo2(0), internodo1(1)* También le recordamos que debe definir para cada sección: *L*, *diam*, *nseg*, mecanismos biofísicos. Le recomendamos escribir todo el código para definir el sistema, y al final incluir un par de líneas nuevas de código para modificar el largo de los internodos.



(a) Esquema del soma con una dendrita en el submenú topology



(b) Submenú de Geometry, en que aparecen las dos secciones de la célula

Figure 2: Ejemplos de cómo definir la dendrita

pasivo. Apretando en *Specify Strategy* modificamos e_{pas} de ambas secciones a -65 mV. Finalizamos apretando en *Continuous Create* para que el programa tome la célula creada.

Estimulación. Para insertar la corriente especificada, debemos abrir un *Point Manager* (o si ya hay uno abierto, puede modificarse ese). Hacemos como se explica en la primera guía de NEURON para seleccionar un *IClamp* y setear su duración en 5 ms, su amplitud en 1 nA, y su delay en 1 ms.

Luego, para ubicar el clampeo de corriente, desde el *Point Manager* seleccionamos *Show* \rightarrow *Shape*. Haciendo click sobre el dibujo de la célula localizamos el pulso de corriente en el lugar deseado. Vemos un indicador arriba del esquema de la célula que dice '*at:dendrita(X)*' (Figura 3). Esto nos indica dónde está posicionada la inyección de corriente: primero el nombre de la sección, y entre paréntesis en que posición de la misma está. La posición va de 0 a 1, siendo 0 un extremo de la sección (el más cercano al soma) y 1 el otro extremo. Esto nos da una distancia en términos relativos: como la dendrita mide $1000 \mu\text{m}$ de largo, el 0.5 indica la posición a $500 \mu\text{m}$ del soma, y la posición 1 el extremo a $1000 \mu\text{m}$ del soma. Mirando esto, intentamos posicionar el pulso en la dendrita, aproximadamente a una distancia de $500 \mu\text{m}$ del soma. También notamos que la opción *Cuadrado Blanco* \rightarrow *View ...* \rightarrow *View = Plot* es útil para centrar la célula en la ventana del *Point Process Manager*, y también que agrandar la ventana permite localizar la corriente con mayor precisión.

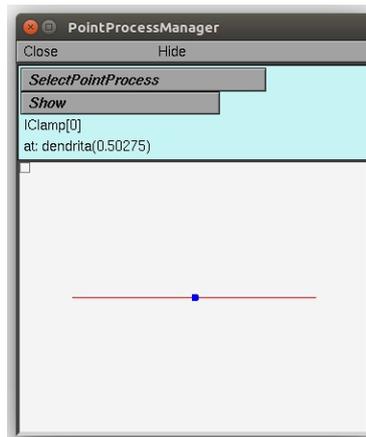


Figure 3: Menú para localizar la corriente en la dendrita