

Longitud Electrotónica en Neuronas Peptidérgicas Intactas y Axotomizadas

R. Ávila-Pozos¹, J. Azpiroz Leehan² and R. Godínez Fernández²

¹ Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo/Área Académica de Matemáticas, ICBI, Pachuca, Hgo., MÉXICO

² Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa/Departamento de Ingeniería Eléctrica, México, D.F., MÉXICO

Abstract— En este trabajo se registró la actividad eléctrica de una población de células neurosecretoras del órgano X de acociles *Cherax quadricarinatus*, antes y después de realizar una axotomía distal. Partiendo del modelo de cilindro equivalente y del cilindro más soma, y usando las curvas de carga obtenidas con la técnica de registro intracelular, se realizaron estimaciones de propiedades eléctricas lineales, tales como la resistencia de entrada y la longitud electrotónica de neuronas intactas y axotomizadas, ajustando a los modelos matemáticos los datos electrofisiológicos obtenido experimentalmente.

Palabras claves— longitud electrotónica, neuronas peptidérgicas, registro intracelular, modelos matemáticos.

I. INTRODUCCIÓN

Entender la estructura electrotónica de una neurona, es crítico para el entendimiento de la función neuronal y la integración sináptica. Las fórmulas para estimar la longitud electrotónica de una neurona, basadas en el modelo de cilindro equivalente han sido ampliamente utilizadas [8, 19, 21]. También se han presentado fórmulas para neuronas cuya morfología no puede aproximarse mediante cilindros equivalentes [7, 13, 16, 18]. Se han publicado fórmulas apropiadas para dendritas estrechas y para uno o más cilindros con un soma. Sin embargo, los árboles dendríticos de algunas neuronas son muy complejos para ser reducidos a estructuras simples. Para esas neuronas, se necesita un enfoque diferente para la estimación de su estructura electrotónica [9, 10, 11].

La estructura electrotónica de una neurona puede especificarse por el valor de algunos parámetros. Un simple cilindro requiere solo de cinco parámetros, mientras que estructuras más complejas requieren de muchos más parámetros. En el caso más simple, en el que la neurona se puede representar como un cilindro sellado en los extremos, la estructura electrotónica está completamente especificada por los valores de la resistividad de la membrana R_m (Ωcm^2), la capacitancia de la membrana C_m ($\mu\text{F}/\text{cm}^2$), la resistividad intracelular R_i (Ωcm) y la longitud ℓ y diámetro del cilindro $2a$, como se muestra en la figura 1a). Si se agrega un soma, se deben especificar dos parámetros más: el área de la membrana del soma A_s y la resistividad de la membrana del soma R_{ms} (Ωcm^2), como se ilustra en la figura 1b).

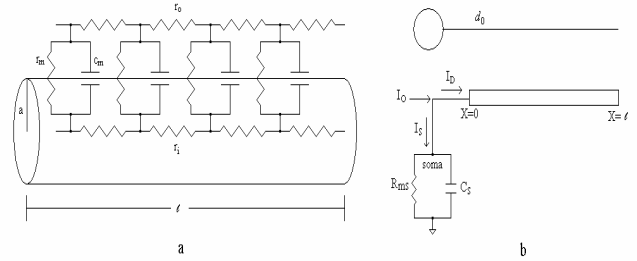


Fig. 1 a) Esquema de la membrana pasiva del cilindro equivalente al axón de una neurona. b) Esquema equivalente del axón y el soma.

En otros trabajos se han evaluado algunos de estos modelos matemáticos y se han comparado con datos experimentales obtenidos en motoneuronas, neuronas piramidales del hipocampo y cocleares [13].

Los sistemas neurosecretores se componen de un conjunto de neuronas peptidérgicas, cuyos axones llegan a una estructura terminal organizada, denominada órgano neurohemal; en este sitio las terminales nerviosas vierten las sustancias de secreción a la circulación. Las neuronas peptidérgicas tienen características comunes a otras neuronas en cuanto a su apariencia morfológica y a su actividad eléctrica, como la generación y propagación de impulsos eléctricos. Las células nerviosas que liberan neurotransmisores los sintetizan y los reciclan en la terminal presináptica del axón [1, 4], a diferencia de las neuronas peptidérgicas que sintetizan los péptidos en el soma, los empaquetan en gránulos y los transportan a los sitios de liberación [5].

El sistema neurosecretor más importante de los vertebrados es el eje hipotálamo – hipófisis. En los crustáceos, el sistema equivalente es el sistema órgano X – glándula sinusal OX-GS. Un sistema particularmente elegido para estudios de la actividad neurosecretora es el sistema de los crustáceos órgano X-glándula sinusal. Este sistema contiene entre 100 y 150 células que están localizadas en la médula terminal del tallo ocular, y sus axones corren distalmente para terminar en la glándula sinusal. Cada soma tiene un axón amielínico que envía colaterales axónicas al neuropilo de la médula terminal; los axones principales forman el tracto OX-GS que asciende superficialmente en sentido longitudinal al eje del tallo ocular, llegando al nivel del segundo quiasma, entre las médulas interna y externa, para

que el conjunto de las terminales y los vasos capilares forman el órgano neurohemal llamado glándula sinusal.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

Preparación biológica: Los experimentos se llevaron a cabo en acociles machos adultos *Cherax quadricarinatus*. Los acociles se obtuvieron en la Unidad Acuícola “El Compartidor” de El Higerón, Mor., y se mantuvieron a 28 °C [6] en las instalaciones de la Planta Experimental de Producción Acuicola, DCBS, de la Universidad Autónoma Metropolitana–Iztapalapa. Los animales se encontraban en el periodo intermuda al momento de los experimentos. En todos los casos, se aísla el tallo ocular derecho [2] y se retira el exoesqueleto. Se retira la capa superficial de tejido conectivo y los músculos por medio de microdissección. La médula terminal, el órgano X y la glándula sinusal se puede ver a través de un microscopio de disección. A continuación, se retira la capa de tejido conectivo que rodea al órgano X, para dejar al descubierto los somas de las neuronas. Los experimentos se realizaron en las neuronas de la capa superficial del órgano X. El tallo ocular se colocó en el compartimiento central de una cámara de tres pozas que contienen solución normal [3]. Las tres pozas están interconectadas y la solución fluye de un extremo a otro de la cámara a razón de 1 ml/min, por medio de un sistema de perfusión continua. La preparación se deja en la perfusión durante 30 minutos antes de comenzar los registros. Todos los registros se realizaron a una temperatura de $22 \pm 2^\circ \text{C}$

Sistema de estimulación y registro: los pulsos fueron generados con el programa Estimulador (UAM-I), y con una tarjeta PCI-MIO-16E-1 (Nacional Instruments) [22] y aplicados a través de un sistema de fijación de corriente de un solo electrodo (Dagan 8100-1); las señales fueron amplificadas a través del mismo sistema de fijación de corriente. El potencial de membrana fue digitalizado con la misma tarjeta, a 20 KHz, visualizadas y guardadas en una computadora personal mediante el programa Estimulador (UAM-I).

Pipetas: Las pipetas de registro intracelular se construyeron con capilares de borosilicato IB100F-3 OD/ID 1.0/0.58mm (WPI), formadas en un estirador horizontal P-97 Flaming/Brown (Sutter Instruments Co.). La resistencia de las pipetas fue de 40 a 60 M Ω . Las pipetas se llenaron con KCl a 3 M.

Soluciones: La composición de la solución extracelular normal [3] empleada en los experimentos fue: NaCl 198 mM, KCl 5.4 mM, CaCl₂ 13.5 mM, MgCl₂ 2.6 mM y HEPES 10 mM. Se ajustó el pH a 7.4 con NaOH.

Análisis. El análisis de las curvas de carga y la obtención de los parámetros de los datos experimentales se realizó con el programa Clampfit (Axon Instruments).

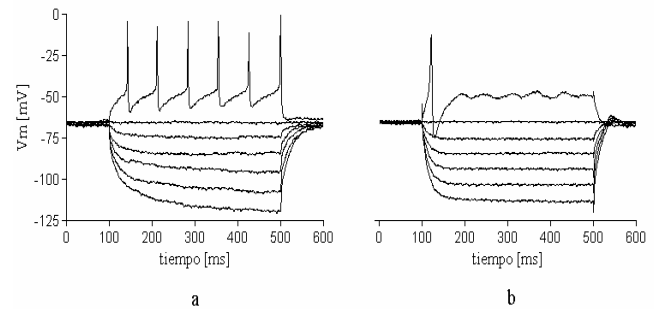


Fig. 2 a) Registro intracelular del potencial de membrana de una neurona intacta. b) Registro intracelular de una neurona peptidérgica después de la axotomía distal. Note que sólo aparece la primera espiga de potencial de acción, seguido por pequeñas oscilaciones en el potencial de la membrana.

III. RESULTADOS

La parte transitoria del voltaje de la membrana registrado como respuesta a la inyección de corriente, puede expresarse como una suma de exponenciales decrecientes

$$V_m(t) = \sum_{i=0}^n A_i e^{-t/\tau_i} \quad (1)$$

donde τ_i son las constantes de tiempo de la membrana pasiva, con τ_0 la mayor de las constantes de tiempo y A_i son constantes [12]. Estos valores se obtienen en forma experimental. Generalmente solo los primeros dos términos son importantes para la interpretación de los resultados experimentales [21].

La figura 2 muestra la actividad eléctrica de dos neuronas, una intacta (Fig. 2a) y la otra axotomizada (Fig. 2b).

En la neurona intacta, al aplicar pulsos de corriente despolarizantes, se evocan espigas de potencial de acción. La frecuencia entre espigas depende de la magnitud de la despolarización [5]. En una neurona axotomizada, solo se genera una espiga, seguida de pequeñas oscilaciones en el potencial de la membrana [5].

Para calcular la resistencia de entrada, se considera el voltaje de estado estable, y a partir de la relación corriente voltaje de los datos mostrados en la figura 2, se obtiene el valor de la resistencia R_e .

Para un cilindro con ambos extremos sellados, y para una longitud electrotonica $L = \ell/\lambda$, donde λ es la constante espacial y está definida como

$$\lambda = \sqrt{\frac{aR_m}{2R_i}} \quad (2)$$

Las constantes de tiempo están dadas por la expresión

$$\tau_n = \frac{\tau_0}{1 + (n\pi/L)^2} \quad (3)$$

por lo que en términos de los datos experimentales se puede estimar la longitud electrotonica de un cilindro como

$$L = \pi \sqrt{\frac{\tau_1}{\tau_0 - \tau_1}} \quad (4)$$

Para un cilindro con soma, las constantes de tiempo son

$$\tau_n = \frac{\tau_0}{1 + k_n^2} \quad (5)$$

donde las k_n son las soluciones de la ecuación

$$k_n L \cot(k_n L) = -\rho L / \tanh(k_n L) \quad (6)$$

donde ρ es la relación entre la conductancia de entrada del cilindro y la conductancia de la membrana del soma.

Como en estas neuronas no hay dominio dendrítico ($\rho \rightarrow 0$), ni desvanecimiento de la admitancia del soma ($\rho \rightarrow \infty$), la longitud electrotonica se puede calcular como

$$L \cong \pi \sqrt{\frac{\rho/(1+\rho)}{(\tau_0/\tau_1) - 1}} \quad (7)$$

Para obtener las curvas de carga, se toma la parte transitoria del registro de voltaje que se obtiene al aplicar un pequeño pulso de corriente hiperpolarizante, con lo que se asegura que no hay conductancias activas y solamente están presentes las propiedades lineales de las neuronas. Los datos experimentales se muestran en la figura 3. Para ajustar los modelos a los datos experimentales de la figura 3, se aproxima la curva de carga a una función del tipo de la ecuación (1). La longitud electrotonica se calcula a partir de las ecuaciones (4) y (7), para una neurona axotomizada e intacta, respectivamente.

Los resultados de las propiedades lineales de las neuronas del órgano X, se resumen en la Tabla 1. Se muestran los datos para la resistencia de entrada, las constantes de tiempo de la curva de carga y la longitud electrotonica. En todos los casos se presenta la media \pm la desviación estándar. Para el caso de neuronas intactas el tamaño de la muestra fue $n=121$ y para el caso de las neuronas axotomizadas $n=18$. Las resistencias de entrada son estadísticamente diferentes ($p<0.001$) y las longitudes electrotonicas también resultaron estadísticamente diferentes ($p<0.001$). Si el valor de la rela-

ción entre las conductancias del cilindro y del soma es $\rho=1$, entonces la longitud electrotonica para la neurona intacta es $L=0.8720 \pm 0.31$, y aun en este caso, las longitudes electrotonicas de las neuronas intactas y axotomizadas siguen siendo estadísticamente diferentes ($p<0.001$).

Tabla 1 Propiedades lineales en neuronas intactas y axotomizadas

	Intacta	Axotomizada
Resistencia de entrada [$M\Omega$]	96.13 ± 3.373	74.72 ± 1.68
Constante de tiempo 1	62.31 ± 8.901	221.3 ± 3.97
Constante de tiempo 2	8.32 ± 1.322	8.26 ± 4.02
Longitud electrotonica	1.1758 ± 0.5 ($\rho = 10$)	0.6188 ± 0.09

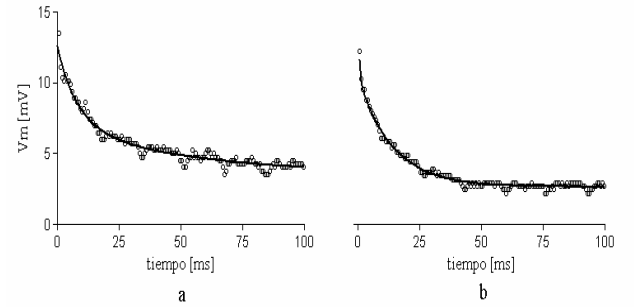


Fig. 3 a) Curva de carga para una neurona intacta. b) Curva de carga para una neurona axotomizada. Los puntos corresponden a los datos experimentales, mientras que el trazo continuo corresponde al ajuste mediante el modelo de suma de exponenciales.

IV. CONCLUSIONES

Existen diversos modelos para representar el comportamiento pasivo de las neuronas. La decisión del modelo a utilizar depende del tipo de neurona. Cuando la asimetría de las dendritas no es muy grande, el modelo de cilindro equivalente es adecuado [14]. Las fórmulas para estimar la longitud electrotonica L , han sido aplicadas a diferentes tipos de neuronas. Sin embargo, estas fórmulas son válidas únicamente para neuronas que pueden simplificarse como un cilindro equivalente con resistividad de la membrana uniforme [15]. Existen modelos compartamentales [13] y modelos mixtos [13], que cubren los casos en los que no se puede aplicar el modelo de cilindro equivalente. En el caso de las neuronas peptidérgicas, dada su morfología [17, 20], es posible realizar esta simplificación y obtener resultados a partir de los datos experimentales.

La longitud electrotonica proporciona una idea de qué tan lejos (eléctricamente) están las entradas sinápticas con respecto del soma [14]. Valores pequeños de L indican que la entrada sináptica está más cerca y por lo tanto, la corriente sináptica llega al soma. La longitud electrotonica está de-

es posible realizar esta simplificación y obtener resultados a partir de los datos experimentales.

La longitud electrotonica proporciona una idea de qué tan lejos (eléctricamente) están las entradas sinápticas con respecto del soma [14]. Valores pequeños de L indican que la entrada sináptica está más cerca y por lo tanto, la corriente sináptica llega al soma. La longitud electrotonica está determinada por la resistencia específica de la membrana R_c [11]. Esta resistencia está dada por la presencia de canales que se encuentran abiertos en el reposo [21]. En este trabajo se utilizaron registros del potencial de la membrana y las curvas de carga para determinar las propiedades lineales como la resistencia de entrada y las constantes de tiempo de la membrana pasiva. Las neuronas registradas pueden ser axotomizadas fácilmente, con lo que se puede obtener la curva de carga de una neurona intacta, y por substracción del registro de la neurona axotomizada, la curva de carga del soma y del cilindro equivalente. Al emplear las expresiones para calcular la longitud electrotonica, se obtienen los resultados esperados, pues la contribución del soma, puesto que no es una esfera isopotencial, debe incrementar el valor de la resistencia de entrada, lo que explica en parte el aumento en la longitud electrotonica. Por otra parte, el soma contribuye a incrementar la longitud física de la neurona, por lo que este hecho también determina directamente el aumento en esta propiedad lineal. Finalmente, para calcular la longitud electrotonica de la neurona intacta, variamos el valor del parámetro ρ , desde 1 hasta 1×10^{12} , para estar cerca de los casos límite, y observamos que después de que la relación entre la conductancia del cilindro y la del soma es mayor a 10, la longitud electrotonica no cambia considerablemente, con lo cual podemos realizar una estimación de otras propiedades lineales de la membrana del soma.

RECONOCIEMIENTOS

R. Ávila-Pozos fue becario del CONACYT durante parte de este proyecto. El trabajo experimental se realizó en el Laboratorio de Biofísica del Departamento de Ingeniería Eléctrica, DCBI, de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México.

REFERENCIAS

- Andrew, R.D., Orchard, I. y Saleuddin, A. S. M. "Structural Reevaluation of the Neurosecretory System in the Crayfish Eyestalk", *Cell and Tissue Research*, 190: 235-246, 1978.
- Meade, M. y Watts, S. "Physiological Compensation in Unilateral Eyestalk Ablated Crayfish, *Cherax Quadricarinatus*", *Journal of Experimental Zoology*, 289: 184-189, 2001
- Greenaway, P. Y Lawson, B. "Sodium Balance in the Australian Crayfish *Cherax destructor*, *Euastacus keirensis* and *Euastacus spinifer* (Decapoda: Parastacoidea)", *Australian Journal of Marine and Freshwater Research*, 33: 507-515, 1982.
- Keller, R. "Crustacean Neuropeptides: Structures, Functions and Comparative Aspects", *Experientia*, 48: 439-448, 1992.
- Näsel, D.N. "Peptidergic Neurohormonal Control Systems in Invertebrates", *Current Opinion in Neurobiology*, 6: 842-850, 1996.
- Charmantier, G., Charmantier-Daures, M. y Van Herp, F. "Hormonal Regulation of Growth and Reproduction in Crustaceans", en: Fingerman, M., Nagabhushanam, R. y Thompson, M-F. (eds), *Recent Advances in Marine Biotechnology*, Vol. 1, Science Publishers Co., 109-161, New Hampshire, 1997.
- Agmon-Snir, H. "A novel theoretical approach to the analysis of dendritic transients", *Biophysical Journal*, 69: 1633-1656, 1995.
- Rall, W. "Transients in neuron with arbitrary dendritic branching and shunted soma", *Biophysical Journal*, 65:15-16, 1993.
- Holmes, W. R. y Rall, W. "Estimating the electrotonic structure of neurons with compartmental models", *Journal of Neurophysiology*, 68:1438 - 1452, 1992.
- W. R. Holmes, I. Segev, and W. Rall. "Interpretation of time constant and electrotonic length estimates in multicylinder or branched neuronal structures", *Journal of Neurophysiology*, 68:1401-1420, 1992.
- Holmes, W. R. y Rall, W. "Electrotonic length estimates in neurons with dendritic tapering or somatic shunt", *Journal of Neurophysiology*, 68:1421-1437, 1992.
- H. C. Tuckwell. *Introduction to Theoretical Neurobiology*. Vol. 1, Linear cable theory and dendritic structure. Cambridge University Press, London, 1988.
- Scott, A. "Neuroscience. A mathematical primer", Springer-Verlag, New York, 2002.
- Vetter, P., Roth, A. y Häusser, M. "Propagation of action potential in dendrites depends on dendritic morphology", *Journal of Neurophysiology*, 85: 926-937, 2001.
- Poznanski, R.R. y Bell, J. "A dendritic cable model for the amplification of synaptic potentials by an ensemble average of persistent sodium channels", *Mathematical Biosciences*, 166: 101-121, 2000.
- Evans, J.D., Kember, G.C. y Major, G. "Techniques for obtaining analytical solutions to the multicylinder somatic shunt cable model for passive neurones", *Biophysical Journal*, 63: 350-365, 1992.
- Major, G., Evans, J.D. y Jack, J.J.B. "Solutions for transients in arbitrarily branching cables: I. Voltage recording with somatic shunt", *Biophysical Journal*, 65: 423-449, 1993.
- Durand, D. "The somatic shunt cable model for neurons", *Biophysical Journal*, 46: 645-653, 1984.
- Rall, W. "Time constants and electrotonic length of membrane cylinders and neurons", *Biophysical Journal*, 9:1483-1508, 1969.
- Poznanski, R.R. "Transient response in somatic shunt cable model for synaptic input activated at the terminal", *Journal of Theoretical Biology*, 127: 31-50, 1987.
- Rall, W. "Core conductor theory and cable properties of neurons", en: Brookhart, J.M., Mountcastle, V.B., Kandel, E. y Geiger, S.R. (eds). *Handbook of Physiology. The Nervous System. Cellular Biology of Neurons*, APS, 39-97, Bethesda, 1977.
- Velasco, N. D., Ávila-Pozos, R. y Godínez, F. R. "Desarrollo de un software de estimulación y adquisición de señales eléctricas celulares, basado en una tarjeta comercial de adquisición de datos", *Rev. Mex de Ing. Biomed.*, Vol XXVI(2), 92-105, 2005.

Autor: Roberto Ávila-Pozos
 Instituto: Área Académica de Matemáticas ICBI, UAHEH
 Calle: Carretera Pachuca - Tulancingo, Km 4.5
 Ciudad: Pachuca, Hidalgo
 País: MÉXICO
 E-mail: ravila@uaeh.edu.mx