

TESIS DE MAESTRÍA EN FÍSICA MÉDICA

**ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA MODULACIÓN DE
CONDUCTANCIAS SUB-UMBRALES SOBRE LA
EXCITABILIDAD DE NEURONAS
TALAMOCORTICALES MEDIANTE EL USO DE
DYNAMIC CLAMP**

Lic. Javier Portillo
Maestrando

Yimy Amarillo
Director

Marcela Nadal
Co-director

Miembros del Jurado
Dra Inés Samengo
Dr. Germán Mato
Dr. Eugenio Urdapilleta

25 de Noviembre de 2016

Física estadística e interdisciplinaria – Centro Atómico Bariloche

Instituto Balseiro
Universidad Nacional de Cuyo
Comisión Nacional de Energía Atómica
Argentina

A mi abuela Ana

Índice de contenidos

Índice de contenidos	v
Resumen	vii
Abstract	ix
1. Motivación	1
2. Potencial de membrana	3
2.1. Células excitables	3
2.2. Canales iónicos	4
2.3. Potencial de membrana en reposo	5
2.3.1. Potencial de Nernst	5
2.3.2. Conductancias y corrientes iónicas	7
2.4. Modelo de Hodgkin y Huxley	9
2.4.1. Cambios en la permeabilidad de la membrana	9
2.5. Potencial de acción	12
2.6. ¿Por qué estudiar canales iónicos?	16
3. Métodos electrofisiológicos	17
3.1. Patch clamp	17
3.2. Voltage clamp	18
3.3. Dynamic clamp	20
4. Sistema talamocortical	23
4.1. Neuronas talamocorticales: Su importancia biológica	23
4.2. Neuronas talamocorticales: su relación con la epilepsia de ausencia	24
5. Neuronas, Sinapsis y Procesamiento de información	27
5.1. Sinapsis	28

5.2. Procesamiento de la información	30
5.3. Ganancia	31
6. Modulación de la ganancia y Ruido	33
6.1. Ruido en el cerebro	33
6.2. ¿De dónde viene ese ruido?	34
6.3. El ruido como herramienta de modulación	34
6.4. Otros factores que afectan la modulación	36
6.5. Relación estímulo-EPSP	37
7. Objetivos	39
8. Trabajo en el laboratorio	41
8.1. Circuito sumador	42
8.1.1. Pruebas de funcionamiento	44
8.2. Preparación de las rodajas	45
8.3. NEURON	46
9. Resultados experimentales (I): Propensión de disparo	47
9.1. I_T	47
9.2. I_{Kir}	47
9.3. I_A	50
10. Resultados computacionales: Modulación de la ganancia	53
10.1. Verificación del ruido como herramienta de modulación	53
10.2. Ganancia en potenciales despolarizados	53
10.2.1. Corrientes que influyen sobre la ganancia: I_A	54
10.2.2. Otras corrientes que influyen sobre la ganancia	57
10.3. Ganancia en potenciales hiperpolarizados	58
11. Resultados experimentales (II): Modulación de la ganancia	61
11.1. Fluctuación en la membrana	61
11.2. Ruido	63
11.3. I_A	64
12. Conclusiones	65
Bibliografía	67
Agradecimientos	73

Resumen

El comportamiento oscilatorio de neuronas talamocorticales normalmente esta asociado al procesamiento sensorial y cognitivo. En casos patológicos, este tipo de comportamiento también puede estar asociado a, por ejemplo, distintos tipos de crisis epilépticas. Trabajos previos de nuestro laboratorio realizaron predicciones acerca de la influencia de distintas corrientes de bajo umbral sobre la propensión a oscilar de las neuronas talamocorticales. Se demostró que pequeños cambios en los parámetros que modelan distintas corrientes, podrían empujar al sistema oscilatorio talamocortical fuera del rango fisiológico y hacia el tipo de oscilaciones patológicas que se observan en estos tipos de epilepsia. Este trabajo tuvo como objetivo el estudio experimental de dichas predicciones. Para ello realizamos experimentos en neuronas talamocorticales de ratón. En particular demostramos la importancia de la corriente rectificadora de entrada de potasio I_{Kir} y la corriente de bajo umbral de calcio I_T en la generación de disparos en ráfaga, que es el modo de disparo asociado a sueño NREM y también a episodios de epilepsia de ausencia. Además se exploró el papel de las conductancias subumbrales sobre la modulación de la ganancia de estas neuronas. Encontramos que los parámetros de voltaje-dependencia de la corriente de potasio I_A son determinantes para esta modulación.

Palabras clave: DYNAMIC CLAMP, EPILEPSIA DE AUSENCIA, CORRIENTES SUBUMBRALES, RUIDO SINÁPTICO, GANANCIA

Abstract

The oscillatory behavior of thalamocortical neurons is usually linked to sensory and cognitive processing. This cellular behavior is also associated to pathological states such as epileptic seizures. Several predictions about the influence of different subthreshold ionic currents on the propensity of thalamocortical neurons to oscillate were made in previous studies carried out in our laboratory. It was shown that oscillations similar to those seen in these types of epilepsy can be induced in a computational model of a thalamocortical neuron after small changes in single parameters of several subthreshold conductances. The main objective of this thesis work was to investigate experimentally those predictions. For that, we perform in vitro experiments on thalamocortical neurons from mice. We were able to show the importance of the inward rectifier potassium current $I_{K^{ir}}$ and the low threshold calcium current I_T on the generation of repetitive burst firing: a mode of firing characteristic of absence epilepsy. In addition, we explored the role of the subthreshold conductances on the gain modulation of the input/output transformation of thalamocortical neurons. We found that the voltage-dependence of the transient potassium current I_A are determinants of this modulation.

Keywords: DYNAMIC CLAMP, ABSENCE SEIZURE, SUBTHRESHOLD CURRENT, SYNAPTIC NOISE, GAIN

Capítulo 1

Motivación

“La arena está sobrevalorada, tan solo es un conjunto de diminutas piedras”

— Joel Barish

En algún (o algunos) puntos de la historia evolutiva, las presiones selectivas llevaron a algunos organismos a permanecer unidos, pasando a formar parte de un ser mayor, un organismo multicelular[1]. De esta forma, este organismo contaba con ventajas como la reducción de la predación y una mayor competitividad. Organismos más complejos fueron surgiendo, las células dejaron de ser similares entre ellas, con el objetivo de cumplir una función específica con una mayor efectividad, lo que se conoce como *diferenciación*. La diferenciación celular permitió el surgimiento de organismos con funciones cada vez más diversas. Hasta que en un momento, en una de los más sorprendentes saltos evolutivos, la diferenciación tuvo como resultado a la primera *célula excitable*, una célula con la capacidad de producir una pequeña señal eléctrica. En coordinación con otras células de igual tipo, le otorgó grandes ventajas a los organismos que portaban estas células. La forma de “ver” el mundo exterior y actuar en consecuencia cambió de forma radical[2].

Hoy en día es posible encontrar algunos vestigios de tan increíble creación evolutiva, por ejemplo en organismos como las *ascidias*[3], cuyas escasas cien neuronas ya comienzan a mostrar una regionalización propia de cerebros de vertebrados, con neuronas excitatorias e inhibitorias, con motoneuronas y fotorreceptores. Este primitivo sistema nervioso le permite a la ascidia nadar de forma eficiente e intencionada, guiada por los sentidos.

Miles de millones de años de evolución fueron necesarios para llegar, partiendo de un sistema neuronal relativamente simple como el de la ascidia, a un sistema nervioso complejo como el de un mamífero, en el cual se incorporan elementos como la atención, intención y predicción, que además están modelados por emociones, al igual que su capacidad para tomar decisiones y otras actividades cognitivas como razonamiento,

aprendizaje, memoria, y lenguaje[4].

La ciencia aún está lejos del entendimiento de tan complejo sistema, pero hay quienes tenemos la esperanza de que tal entendimiento, algún día se pueda alcanzar, por ello, he aquí nuestro diminuto grano de arena.

Capítulo 2

Potencial de membrana

“Los hombres deben saber que el cerebro es el responsable exclusivo de las alegrías, los placeres, la risa y la diversión, y de la pena, la aflicción, el desaliento y las lamentaciones. Y gracias al cerebro, de manera especial, adquirimos sabiduría y conocimientos, y vemos, oímos y sabemos lo que es repugnante y lo que es bello, lo que es malo y lo que es bueno, lo que es dulce y lo que es insípido. Y ese mismo órgano hace que nos volvamos locos y delirantes, y que los temores y terrores nos invadan. En ese sentido, soy de los que piensan que el cerebro ejerce el mayor poder sobre el hombre”

— Hipócrates

2.1. Células excitables

Las neuronas son células excitables. Esto les permite comunicarse entre ellas a través de señales eléctricas. Para comprender cómo se generan y cómo son transmitidas estas señales es necesario comprender el comportamiento del potencial de membrana. En primer lugar se abordará el estudio del potencial de membrana cuando está en reposo. Todas las células del organismo presentan una distribución asimétrica de iones a través de la membrana y expresan distintos tipos de canales iónicos, con permeabilidad selectiva para iones específicos. Esto genera una diferencia de potencial entre el lado citoplasmático y el lado extracelular de la membrana que, por convención, se mide tomando como referencia el valor de potencial cero en el exterior. En la mayoría de las neuronas de vertebrados, el valor del potencial en reposo está entre -75 mV y -60 mV.

Por otra parte, la capacidad de los canales de ser activados e inactivados por distintos mecanismos, otorgan al potencial una dinámica compleja que permite codificar

información, transmitirla y decodificarla. Los potenciales de acción son los protagonistas en este caso, aunque no los únicos actores, ya que existen además una variedad de comportamientos del potencial de membrana, como las oscilaciones subumbrales, los potenciales sinápticos y los potenciales lentos de calcio que dan lugar a disparos en ráfagas, entre otros. El resto del capítulo estudiará los fundamentos necesarios para entender estos comportamientos.

2.2. Canales iónicos

Los canales iónicos son proteínas que forman huecos acuosos en la membrana lipídica, permitiendo el paso selectivo de ciertos iones. Dicha selectividad puede ser muy específica; por ejemplo, existen canales que preferiblemente permiten el paso de sodio, o también puede ser menos restrictiva, por ejemplo, en canales que permiten el paso de varios tipos de cationes. La estructura conformacional de las proteínas que forman el canal puede cambiar por factores que incluyen la presencia de proteínas auxiliares, cambios de voltaje a través de la membrana, y tiempo. Esto da lugar a diferentes estados funcionales intercambiables del canal: desde abierto y activado hasta cerrado, inactivo y/o bloqueado[5] (figura 2.1).

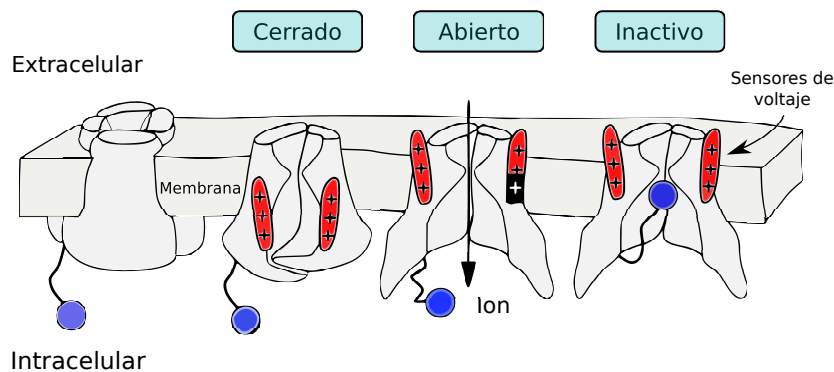


Figura 2.1: Esquema de la apertura, cierre e inactivación de ciertos canales. En este caso se muestran canales voltaje-dependientes con un sistema de inactivación tipo bola y cadena.

Cuando los canales iónicos se encuentran abiertos y activados permiten el paso de iones específicos a través de la membrana, produciendo una corriente. El movimiento de dichos iones se debe a dos factores:

- Gradiente químico: Los iones se mueven desde regiones de mayor concentración hacia regiones de menor concentración.
- Gradiente eléctrico: Los cationes (cargas positivas) se mueven hacia regiones con carga neta negativa, mientras que los aniones (carga negativa), hacen lo propio moviéndose hacia regiones con carga positiva.

Estos dos gradientes, en conjunto, forman el gradiente electroquímico.

Es posible diferenciar 4 tipos de canales iónicos involucrados en la producción de señales eléctricas[6]:

1. **Canales pasivos:** Los estados abierto y cerrado de estos canales alternan aleatoriamente y pueden tener distintas permeabilidades.
2. **Canales activados por voltaje:** Estos canales se abren en respuesta a un cambio en el voltaje (potencial de membrana). Estos canales están especialmente involucrados en la generación de potenciales de acción.
3. **Canales activados por ligando:** Estos canales están presentes en las sinapsis y se abren o se cierran en respuesta a estímulos químicos específicos, como neurotransmisores. Otros estímulos incluyen hormonas o iones.
4. **Canales accionados mecánicamente:** Son canales que se abren o cierran ante la presencia de un estímulo mecánico, el cual puede ser una vibración, cambios de presión o estiramiento de un tejido. Estos canales mecanorreceptores son los que están presentes en las neuronas sensoriales del sistema auditivo, por ejemplo.

2.3. Potencial de membrana en reposo

La figura 2.2 esquematiza la acumulación asimétrica de carga que ocurre a ambos lados de la membrana plasmática. Puede observarse que la misma sólo ocurre en las cercanías de la membrana; en la superficie interna de la membrana se da una acumulación de iones negativos, mientras que los iones positivos hacen lo propio en la superficie externa.

Para lograr explicar la acumulación de cargas a ambos lados de la membrana, debemos analizar la composición de iones tanto en el citosol como en el medio extracelular.

2.3.1. Potencial de Nernst

Comencemos estudiando el caso particular del potasio: Embebidos en la membrana existen canales pasivos que permiten que el potasio difunda con relativa facilidad a través de la membrana, siempre que exista un gradiente electroquímico. Para evaluar la dependencia del potencial en reposo en función de las concentraciones de potasio, es útil considerar un modelo que sólo tenga en cuenta la permeabilidad de dicho ion. Supongamos que contamos con una membrana con canales selectivos sólo para potasio. Un factor importante que contribuye a crear el gradiente electroquímico es la presencia de aniones (proteínas y ácidos nucleicos cargados negativamente) en el interior de la célula, para los cuales la membrana es impermeable. Antes de introducir el potasio y

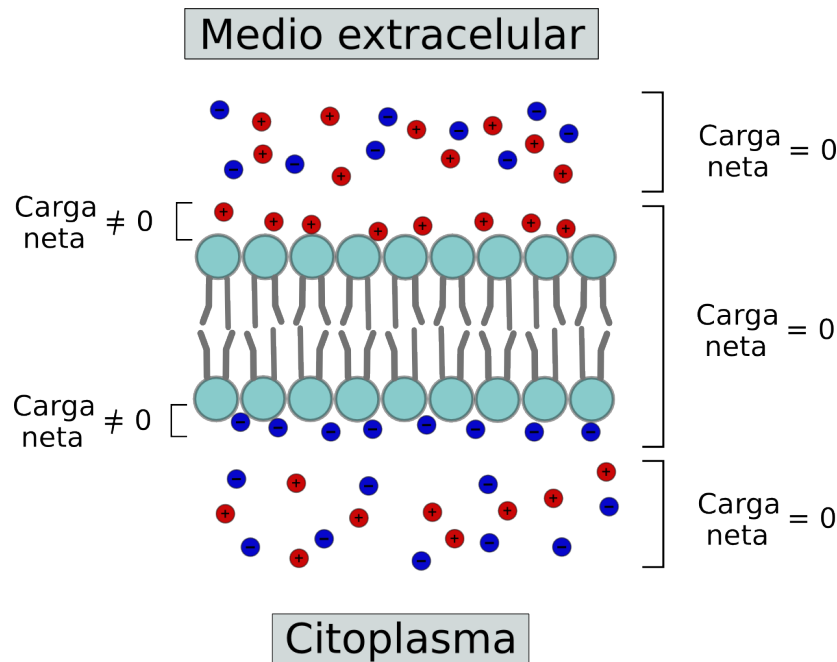


Figura 2.2: Esquema de la distribución de cargas en los medios intra y extracelular. La distribución de iones provoca que exista una carga neta en las cercanías de la membrana, pero no así en las lejanías.

los aniones, no hay gradiente eléctrico y el potencial de membrana es 0. Después de introducir el potasio y los aniones, estos últimos se quedan atrapados en el interior mientras que el potasio difunde hacia el exterior, impulsado por el gradiente químico que está dado por la diferencia de concentraciones intra y extracelular. El flujo de cargas positivas (K^+) hacia afuera genera en la membrana una diferencia de potencial, y por lo tanto, un gradiente eléctrico que tiende a oponerse a la salida de iones K^+ . A medida que dichos iones salen de la célula, el gradiente químico disminuye, y el gradiente eléctrico aumenta. Para un determinado potencial de membrana, los efectos producidos por ambos gradientes se igualan, haciendo que el flujo neto de iones K^+ sea nulo. Este valor de potencial, en el cual se anula el flujo de K^+ , se denomina potencial de equilibrio de potasio (E_K). El concepto de potencial de equilibrio no se aplica sólo al potasio, sino también a los demás iones presentes en las células (sodio, calcio y cloro) y puede ser calculado utilizando la ecuación 2.1, denominada ecuación de Nernst[4]:

$$E_{ion} = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[ion]_{out}}{[ion]_{in}} \quad (2.1)$$

donde $[ion]_{out}$ y $[ion]_{in}$ son las concentraciones externa e interna del ion, respectivamente; R la constante termodinámica de los gases; T la temperatura absoluta; z la valencia del ion (+1 para el potasio, cloro y sodio y +2 para el calcio) y F la constante de Faraday. El factor $\frac{RT}{zF}$, a temperatura ambiente ($20^\circ C$), vale aproximadamente 25 mV. Teniendo en cuenta que, por ejemplo, la concentración de potasio dentro de la célula es 30 veces mayor que en el exterior, se obtiene que el potencial de equilibrio

Ion	Concentración intracelular	Concentración extracelular	Potencial de reversión
Sodio (Na ⁺)	15 mM	145 mM	+55 mV
Potasio (K ⁺)	150 mM	5 mM	-85 mV
Cloro (Cl ⁻)	10 mM	130 mM	-65 mV
Calcio (Ca ⁺²)	70 nM	2 mM	+130 mV

Tabla 2.1: Potencial de Nernst para los iones con mayor contribución al potencial de membrana, concentraciones típicas en neuronas de mamífero y temperatura de 20 °C.

para el potasio es $E_k \simeq -85mV$, según la ecuación 2.1.

La tabla 2.1 muestra los valores de potencial de equilibrio para los distintos iones usando concentraciones típicas en neuronas y temperatura ambiente (20°C).

2.3.2. Conductancias y corrientes iónicas

Además de indicarnos el valor que tendría el potencial de membrana en presencia de un solo ion (valor que no es representativo ya que las neuronas expresan una variedad de canales), el potencial de equilibrio permite calcular la corriente para un determinado ión, en función del potencial de membrana (V):

$$I_{ion} = g_{ion}(V - E_{ion}) \quad (2.2)$$

donde g_{ion} es la conductancia del ion, y $(V - E_{ion})$ se conoce como fuerza electromotriz. La conductancia g_{ion} indica qué tan permeable es la membrana a determinado ion y depende del número de canales presentes en membrana, además del voltaje y del tiempo (estas dos últimas dependencias las trataremos en detalle más adelante). La ecuación 2.2 nos indica, entonces, que mientras más alejado esté el potencial de membrana del potencial de equilibrio (E_{ion}), mayor será el aporte de dicho ion a la corriente total.

En general, el potencial de membrana se mantiene por encima de los potenciales de equilibrio del potasio y del cloro, y por debajo de los de sodio y calcio. Esto implica, según 2.2, que las corrientes de potasio y cloro suelen ser positivas, por lo que se denominan corrientes hacia afuera¹ o **outward**, mientras las corrientes de sodio y calcio son corrientes negativas, denominadas corrientes hacia adentro o **inward**. Las corrientes outward son corrientes que **hiperpolarizan** la membrana mientras que las corrientes inward la **despolarizan**.

Que el potencial de membrana esté en reposo no implica que no haya corrientes, sino que todas las corrientes están balanceadas las corrientes inward igualan a las corrientes outward. Esto puede expresarse de la siguiente forma:

$$g_K(V - E_K) + g_{Na}(V - E_{Na}) + g_{Cl}(V - E_{Cl}) + g_{Ca}(V - E_{Ca}) = 0 \quad (2.3)$$

¹A pesar de que el cloro fluye hacia adentro

Por lo tanto, el valor de potencial en reposo puede calcularse según:

$$V_{rep} = \frac{g_K E_K + g_{Na} E_{Na} + g_{Cl} E_{Cl} + g_{Ca} E_{Ca}}{g_K + g_{Na} + g_{Cl} + g_{Ca}} \quad (2.4)$$

Vemos entonces que el potencial de membrana en reposo no solo depende de la diferencia de concentración iónica entre el citosol y el exterior celular, para cada especie iónica, sino que también depende de las conductancias. Este parámetro, a su vez, depende del número de canales iónicos embebidos en la membrana y por lo tanto puede variar considerablemente según el tipo de neurona (y su funcionalidad).

Antes de pasar a describir la dinámica del potencial de membrana, es útil volver a la ecuación 2.4 y observar que el potencial de membrana así descrito puede ser pensado como un centro de masa². En esta interpretación, las conductancias (g_{ion}) pueden ser pensadas como masas, y el potencial de equilibrio representa entonces la posición para ese determinado ion (ver figura 2.3). En la interpretación física, el centro de masa es la posición donde, si coloco un punto de apoyo, el sistema se mantiene estable. De manera análoga, la ecuación 2.4 permite calcular un valor de potencial tal que las corrientes se equilibren y el sistema se mantenga estable, es decir, el potencial se mantiene en reposo.

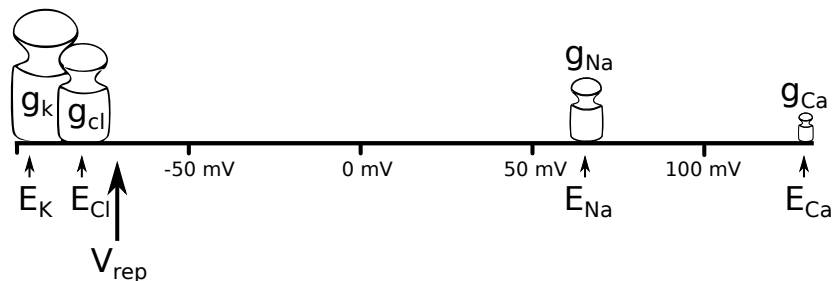


Figura 2.3: Interpretación mecanicista del potencial de membrana en reposo, las conductancias pueden ser pensadas como masas, el potencial de equilibrio como su posición y, de esta forma, el potencial en reposo representa el centro de masa.

A diferencia del caso físico, en las membranas las “masas” dependen fuertemente del centro de masa, lo que significa que las conductancias dependen del potencial de membrana. Por este motivo, a partir de aquí, debemos dejar la analogía de lado por un momento y dar lugar a dos expertos en el tema, Andrew Huxley y Alan Hodgkin, quienes lograron describir de manera muy precisa el comportamiento dinámico del potencial de membrana.

² $Xm = \sum m_i x_i / \sum m_i$

2.4. Modelo de Hodgkin y Huxley

El modelo de Hodgkin y Huxley[7], o modelo HH, fue derivado del estudio del potencial de acción en axones gigantes de calamar, donde asumieron corrientes de sodio I_{Na} y potasio I_K voltaje y tiempo dependientes y corrientes de fuga I_{leak} . Además de estas tres corrientes, deben ser tenidas en cuenta las propiedades dieléctricas de la membrana, que pueden ser caracterizadas por una capacitancia C . De esta forma, el “capacitor” que representa la membrana genera una corriente que es proporcional al cambio de potencial (dV/dt). Por lo tanto la corriente está dada por:

$$I = c \frac{dV}{dt} + g_{Na}(V - V_{Na}) + g_K(V - V_K) + g_{leak}(V - V_{leak}) \quad (2.5)$$

Partiendo de la ecuación 2.5 es posible hacer un esquema del circuito equivalente a una membrana con corrientes de sodio, potasio y corrientes de fuga (Figura 2.4), que además tenga en cuenta las propiedades dieléctricas de la membrana.

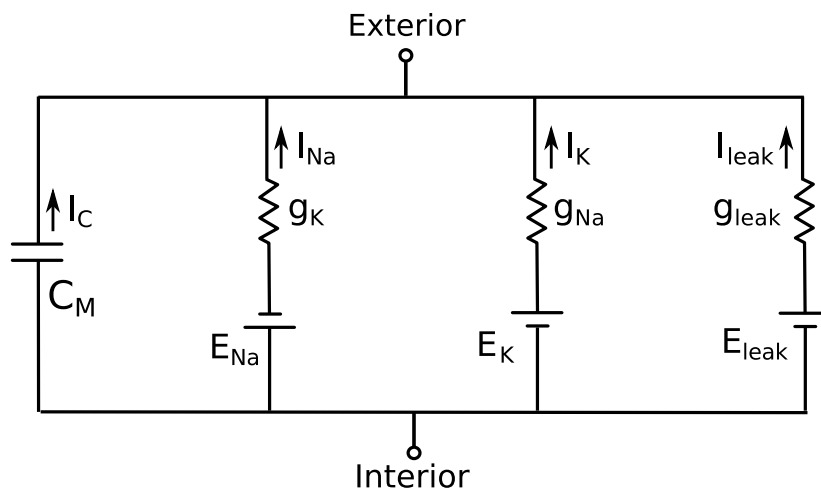


Figura 2.4: Circuito equivalente a la membrana teniendo en cuenta las conductancias de sodio y de potasio, las conductancias de fuga y la capacitancia de la membrana.

2.4.1. Cambios en la permeabilidad de la membrana

El modelo HH predice de manera satisfactoria el comportamiento de la permeabilidad de la membrana ante cambios de voltaje y su evolución en el tiempo. g_{Na} y g_K son expresados como conductancias máximas \bar{g}_{Na} y \bar{g}_K multiplicadas por coeficientes que representan la fracción de canales abiertos, y cuya dependencia en voltaje y tiempo logra explicar las propiedades cinéticas observadas experimentalmente.

Permeabilidad de Potasio

Hodgkin y Huxley observaron que la despolarización de la membrana provoca un aumento en g_K de forma sigmoide mientras que la repolarización provoca una dismi-

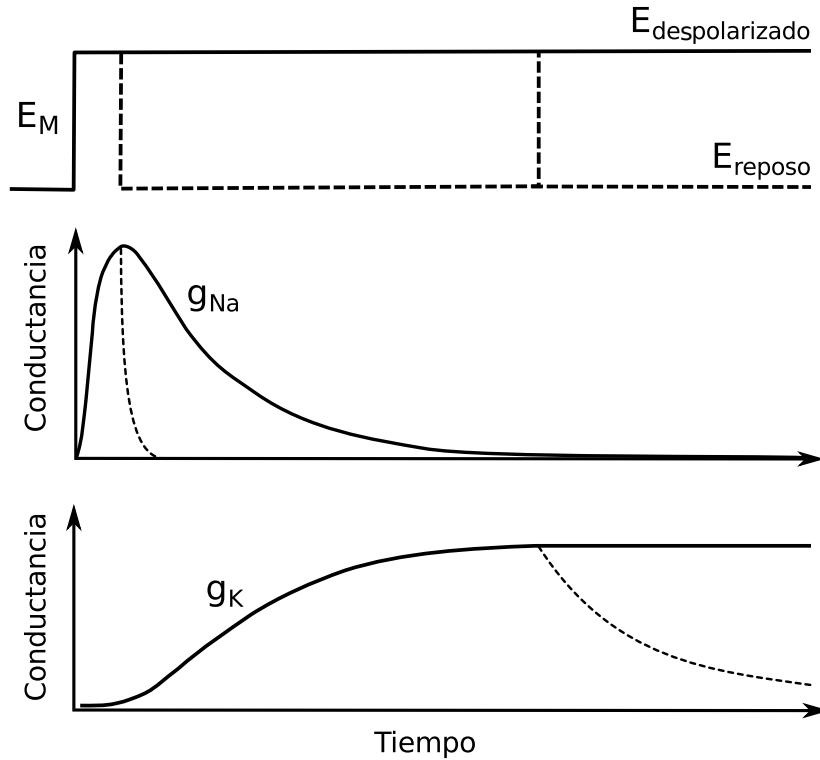


Figura 2.5: Esquema de los cambios en los valores de conductancia de sodio y potasio ante una despolarización de la membrana.

nación exponencial (Fig 2.5). Este comportamiento puede ser modelado por:

$$g_K = \bar{g}_K n^4 \quad (2.6)$$

$$\frac{dn}{dt} = \alpha_n(1 - n) + \beta_n n \quad (2.7)$$

donde n puede tomar valores entre 0 y 1 y α_n y β_n son parámetros voltaje-dependientes.

Una posible interpretación de las ecuaciones 2.6 y 2.7 puede ser que los iones de potasio solo puedan cruzar la membrana cuando 4 partículas similares ocupan cierta región de la membrana. El factor n representa la proporción de estas partículas en cierta región (por ejemplo la región interna de la membrana) y el factor $1 - n$ otra determinada región (por ejemplo la parte externa de la membrana). Bajo estos supuestos, α_n representaría la tasa de transferencia desde afuera hacia adentro, mientras que β_n la tasa de transferencia en la dirección opuesta.

Por último, es posible reacomodar los parámetros α_n y β_n de la ecuación 2.7 para obtener:

$$\frac{dn}{dt} = \frac{n_\infty - n}{\tau_n} \quad (2.8)$$

Donde n_∞ y τ_n son parámetros voltaje-dependientes que pueden ser medidos experi-

mentalmente. τ_n da cuenta de que tan rápida es la activación del canal mientras que n_∞ da cuenta del valor de n para tiempos muy grandes en comparación a τ_n (estado estacionario).

La figura 2.6 muestra de forma esquemática la variación del parámetro n en función de τ_n ante una despolarización en la membrana.

Permeabilidad del Sodio

Por su parte, el comportamiento de la permeabilidad de la membrana a iones de sodio (Fig. 2.5) puede ser modelado por:

$$g_{Na} = \bar{g}_{Na} m^3 h \quad (2.9)$$

$$\frac{dm}{dt} = \alpha_m(1 - m) + \beta_m m \quad (2.10)$$

$$\frac{dh}{dt} = \alpha_h(1 - h) + \beta_h h \quad (2.11)$$

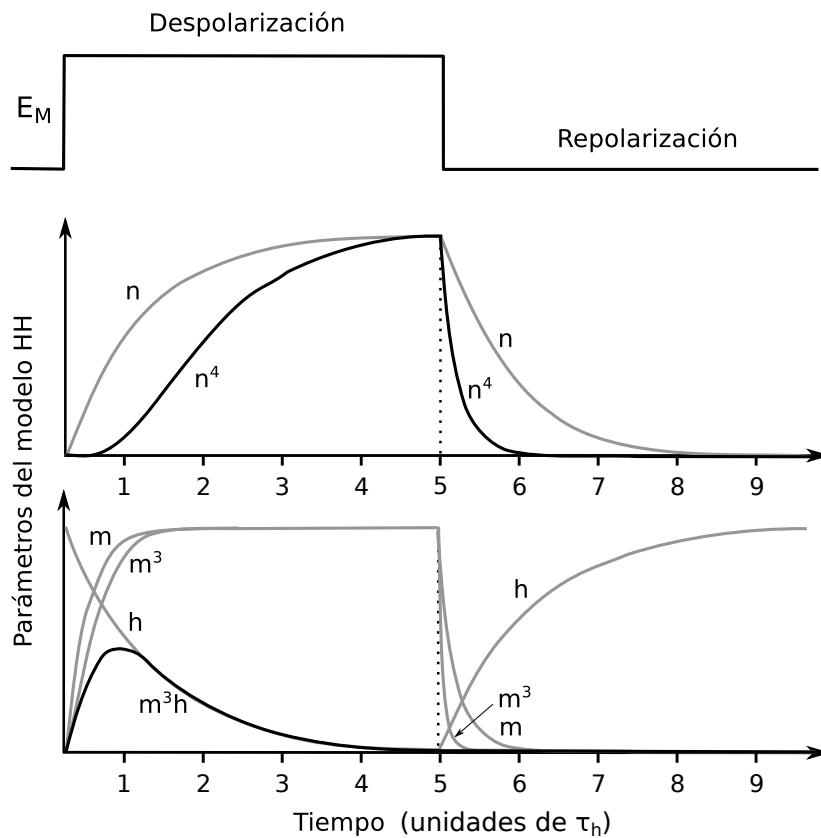


Figura 2.6: Ejemplo hipotético de la variación de los parámetros n , m y h ante una despolarización y una posterior repolarización, las constantes τ_m , τ_n , τ_h fueron elegidas arbitrariamente con una razón 1:5:4 y para simplificar se despreció la dependencia de las mismas respecto al potencial de membrana.

De la misma forma que para el potasio, una posible interpretación de las ecuaciones 2.10 y 2.11 es que los iones de sodio solo pueden cruzar la membrana cuando 3 moléculas activantes ocupen de manera simultánea una cierta región de la membrana (m^3) y a su vez ninguna partícula inactivante se encuentre presente (h). Los factores α y β representan tasas de transferencia y es posible reacomodarlos de tal forma de obtener:

$$\frac{dm}{dt} = \frac{m_\infty - m}{\tau_m} \quad (2.12)$$

$$\frac{dh}{dt} = \frac{h_\infty - h}{\tau_h} \quad (2.13)$$

Nuevamente, los valores m_∞ y h_∞ caracterizan el comportamiento de la activación e inactivación para estados estacionarios, mientras que τ_m y τ_h dan cuenta de la velocidad de activación e inactivación, respectivamente. La figura 2.6 muestra de forma esquemática la variación de los parámetros m y h ante una despolarización de la membrana.

En resumen, la corriente a través de la membrana según el modelo HH es descrita por:

$$I = n^4 \bar{g}_K (V - V_K) + m^3 h \bar{g}_{Na} (V - V_{Na}) + \bar{g}_{leak} (V - V_{leak}) \quad (2.14)$$

2.5. Potencial de acción

Volvamos de nuevo, por un momento, a la interpretación mecanicista del potencial de membrana e imaginemos esta situación hipotética (por favor, lea con atención): imagine que usted es un mozo (o moza) y está sosteniendo una bandeja con elementos de distinta masa (botellas, tazas, etc.). Utilizando sus conocimientos en física, usted pone su mano justo debajo del centro de masa para mantener el equilibrio. En un momento, otro mozo empuja su bandeja y la desestabiliza: usted actúa rápidamente moviendo su mano hacia el nuevo centro de masa pero las masas de los objetos... cambian drásticamente! La botella se vuelve pequeña; la taza, gigante. Su mano se ve obligada a moverse de un lado a otro de la bandeja para no perder el equilibrio. En ese momento, cuando usted pensó que tenía las cosas controladas, los tamaños cambian de nuevo, la botella se agranda y la taza se achica. Su mano, otra vez, se mueve de un lado a otro de la bandeja, volviendo a la posición inicial. Por suerte, su experiencia como mozo mantiene las cosas bajo control, y usted se prepara para recibir otro empujón (Figura 2.7).

Por favor relea lo anterior pero realizando los siguientes cambios:

- Cambie **mozo** por **neurona**

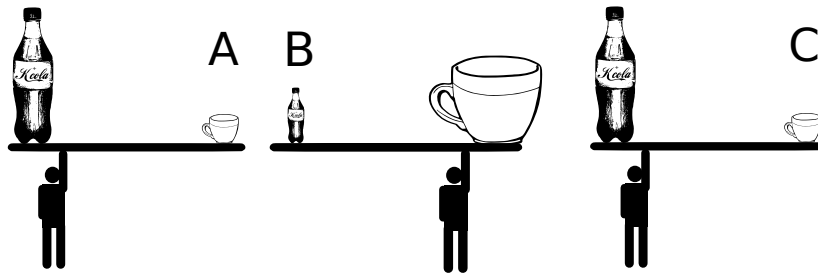


Figura 2.7: Analogía mecánica del potencial de acción.

- Cambie **posición de la mano en la bandeja** por **potencial de membrana**
- Cambie **botella** por **conductividad del potasio**
- Cambie **taza** por **conductividad del sodio**
- Cambie **empujón** por **estímulo**

Al realizar los cambios, la historia pasa de ser una situación en un bar, a ser la descripción de un fenómeno típico (y muy utilizado) por las neuronas, que es el **potencial de acción**. Los potenciales de acción son eventos discretos en los cuales el potencial de membrana cambia de forma abrupta, se despolariza primero, y se hiperpolariza después. Estos cambios estereotipados son utilizados por el sistema nervioso para codificar información, transmitirla y decodificarla. La figura 2.8 esquematiza un potencial de acción típico.

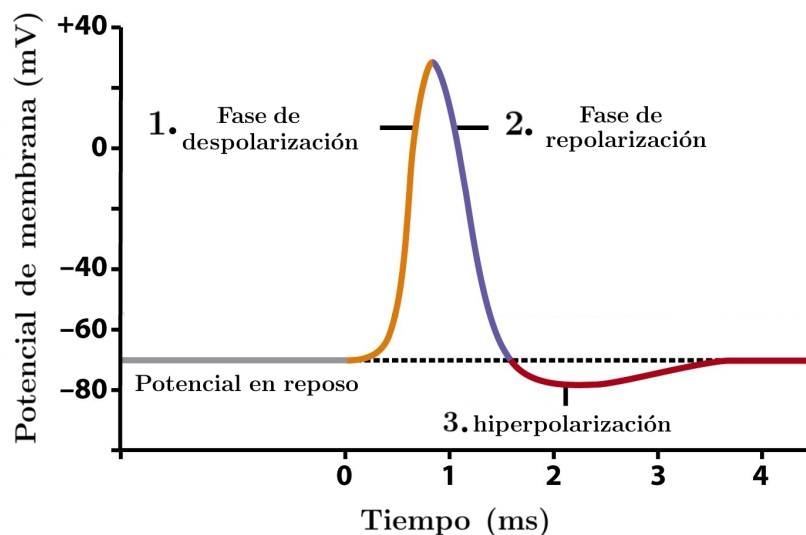


Figura 2.8: Esquema de un potencial de acción típico, se pueden diferenciar 3 fases: La despolarización, la repolarización y la hiperpolarización.

Habiendo comprendido conceptualmente el potencial de acción, pasemos a una explicación un poco más formal: Ante la presencia de un estímulo excitatorio, el potencial de membrana alcanza un valor de potencial umbral, en el cual la permeabilidad de la

membrana a iones de sodio aumenta de forma abrupta. Mientras mayor es el potencial, más canales de sodio se encuentran abiertos. Este efecto de amplificación lleva al potencial hasta valores entre 30 y 50 mV, cercanos al potencial de equilibrio del sodio (E_{Na}). Para estos valores de potencial la corriente de sodio disminuye drásticamente, en parte por una disminución en la fuerza electromotriz y en parte por la inactivación de los canales de sodio. Por otra parte, la despolarización de la membrana durante el disparo del potencial de acción activa la apertura de canales de potasio voltaje-dependientes, cuya cinética lenta hace que en un principio pierdan la pulseada frente a los rápidos canales de sodio. Sin embargo, a medida que los canales de sodio se inactivan, la despolarización creciente y el aumento de la fuerza electromotriz para el K^+ , hacen que aumente la corriente de potasio, produciendo una rápida caída hacia el valor inicial del potencial (fase de repolarización). Al llegar al valor del potencial en reposo (V_{rep}), aún quedan canales de potasio voltaje dependientes que no se cerraron, por lo que el potencial de membrana se hiperpolariza (fase de hiperpolarización post-espiga). El cierre de estos canales lleva al potencial de membrana nuevamente hacia V_{rep} . La neurona está lista para disparar otro potencial de acción.

Hay que tener en cuenta que las distintas neuronas expresan un repertorio único de canales iónicos, entre los que se encuentran miembros de la extensa y diversa familia de canales de potasio, además de variantes de canales de sodio, calcio y cloro. Las distintas combinaciones de canales posibles modulan de diferentes formas la repolarización del potencial de acción y la distancia entre espigas. La consecuencia directa de esto es una diversidad de neuronas con distintos patrones y frecuencias de disparo; estas diferencias son esquematizadas en la figura 2.9. En la figura 2.9(A) se muestra un disparo de potenciales de acción a una frecuencia constante, en respuesta a un estímulo (corriente de despolarización) sostenido. En la figura 2.9(B) se muestra otro tipo de respuesta, en la cual la frecuencia de disparo disminuye en el tiempo, a pesar de recibir un estímulo constante. Por último, la figura 2.9(C) muestra otro comportamiento observado en ciertos tipos de neuronas, el cual consiste en un conjunto de varios potenciales de acción, seguido de una pausa a la que prosigue otro conjunto de potenciales de acción; este comportamiento se conoce como disparo en ráfagas, el cual se repite de manera periódica. Por un mecanismo similar al disparo del potencial de acción mediado por canales de sodio, los canales de calcio también pueden producir espigas, aunque con una cinética mucho más lenta y de bajo umbral, llamadas LTS³, las cuales cumplen una función importante en el disparo en ráfagas en muchas neuronas.

³Por sus siglas en inglés: *Low Threshold Spike*.

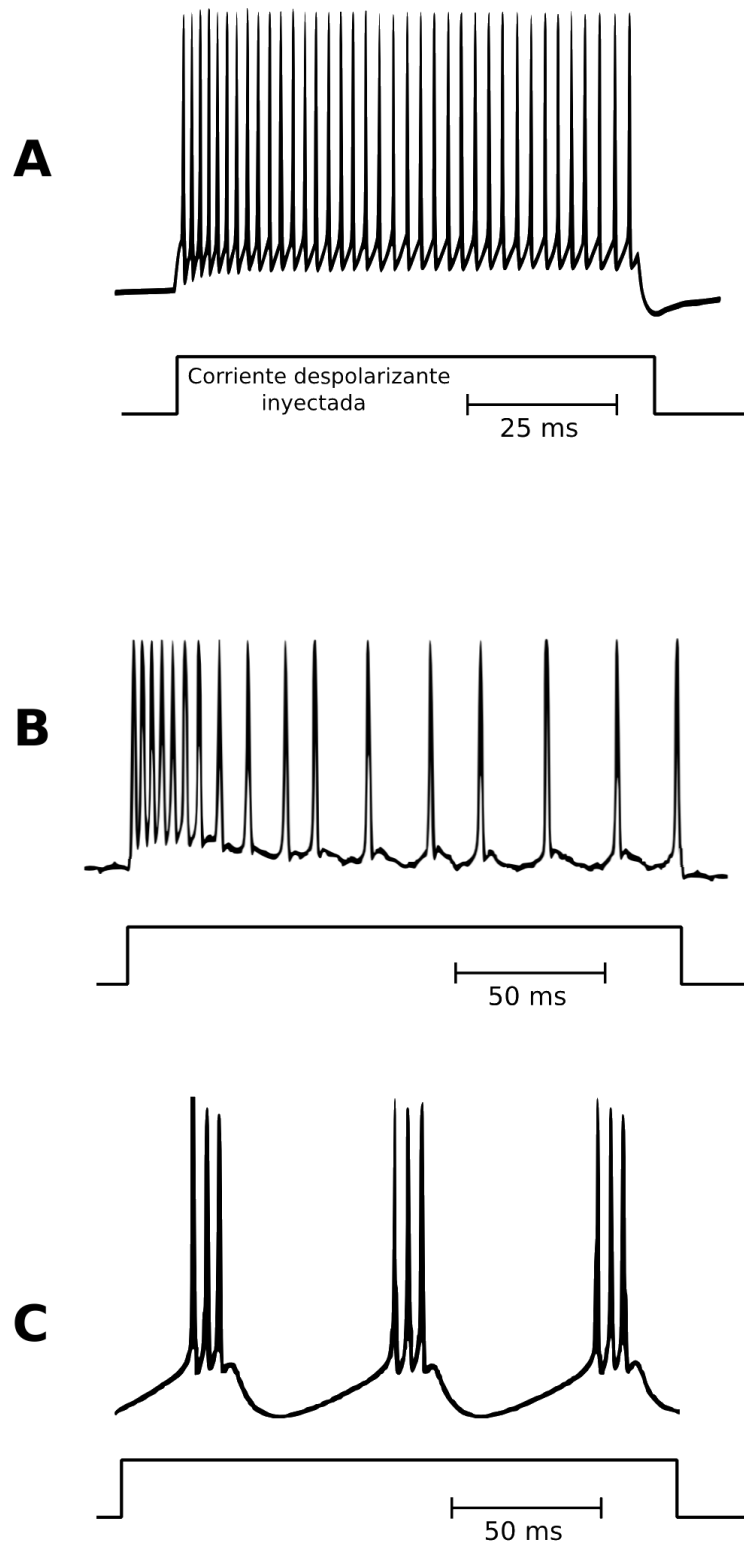


Figura 2.9: Comportamientos típicos observados en distintos tipos de neuronas. Los disparos tónicos pueden mantener su frecuencia a lo largo de todo el estímulo (A), o bien pueden disparar a una frecuencia alta al principio del estímulo, luego disminuyendola (B). también el disparo puede ser en ráfagas, como se observa en (C).

2.6. ¿Por qué estudiar canales iónicos?

Existe un extenso grupo de patologías relacionadas con el mal funcionamiento de canales iónicos. Estas patologías son conocidas como canalopatías. El hecho de que los canales iónicos cumplan diversas funciones en las membranas de todas las células (e incluso en organelas), implica que defectos en los canales están asociados a una muy amplia variedad de patologías en distintos órganos y sistemas: epilepsia, migraña, ceguera, sordera, diabetes, hipertensión, arritmia cardíaca, asma, fibrosis quística, síndrome de intestino irritable, nefropatías y cáncer[8].

En particular, dentro del sistema nervioso, existen muchos tipos de epilepsia relacionadas a patologías de canales iónicos, las cuales se explican en detalle en el capítulo 4.1. La variedad de canalopatías es muy grande; conocer en detalle el funcionamiento de los canales iónicos es fundamental para poder entender (y tratar) las disfunciones de los mismos. La electrofisiología tiene como objetivo lograr dicho entendimiento.

Capítulo 3

Métodos electrofisiológicos

“Los mensajes en el sistema nervioso están asociados a un cambio eléctrico conocido como potencial de acción. En general se cree que dicho potencial surge entre una membrana situada entre el axoplasma y el medio externo. Si esta teoría es cierta, debería ser posible medir el potencial de acción entre un electrodo dentro de una fibra nerviosa y el fluido que la rodea. La mayoría de las fibras son demasiado pequeñas para poner en práctica estas mediciones, sin embargo pudimos lograr insertar micro-electrodos dentro de axones gigantes de calamar”

— Alan Hodgkin

Existen diversas técnicas para el estudio de canales iónicos y su influencia sobre el potencial de membrana. En el presente capítulo, se mencionan las técnicas más relevantes para nuestro trabajo.

3.1. Patch clamp

Erwin Neher y Bert Sakmann desarrollaron la técnica de *patch clamp*[\[4\]](#), la cual permite medir corrientes de canales iónicos embebidos en la membrana. La técnica consiste en crear un sello entre la membrana y la punta de una pipeta de vidrio, formando un *parche* de aproximadamente $1\ \mu\text{m}$ de diámetro. Bajo condiciones adecuadas, la resistencia del sello llega al orden de Gigaohmios, lo que permite medir la corriente que pasa a través del parche sin perder corriente a través del sello (figura [3.1](#)). Las corrientes medidas para el caso más simple pueden verse en la figura [3.1A](#), donde se observan amplitudes prácticamente constantes que reflejan los estados abierto y cerrado de un único canal. Como se mencionó anteriormente, existen distintos estados

en los cuales se puede encontrar un canal; En la figura 3.1B se observan las corrientes producidas por distintos estados del mismo. Por último, la figura 3.1C muestra la complicada cinética que puede presentar un canal cuando alterna rápidamente entre estados abiertos y cerrados, lo que se conoce como parpadeo o *flickering*.

Una característica importante del patch clamp es la posibilidad de aplicar un potencial a la pipeta, y por lo tanto, a la parte externa del parche de membrana. La magnitud de la corriente obtenida en función del voltaje aplicado es graficada en la figura 3.1D.

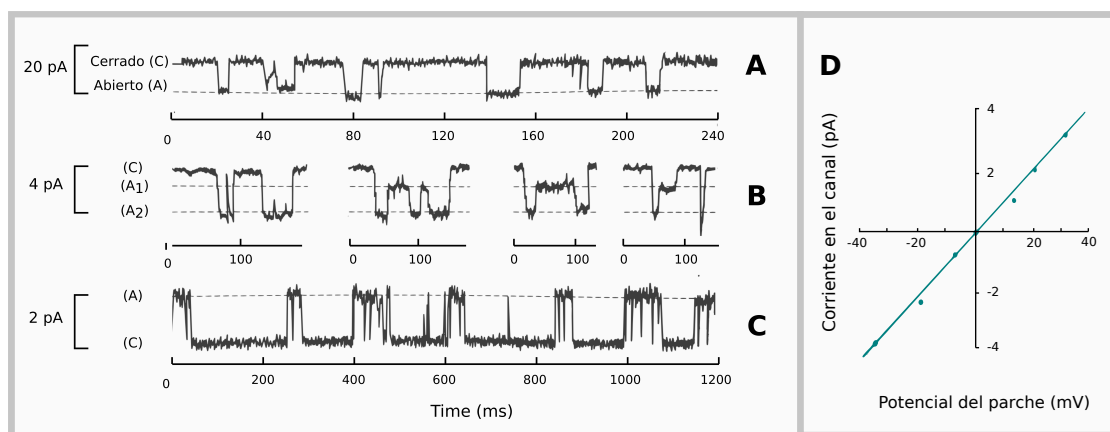


Figura 3.1: Mediciones de corriente utilizando la técnica de patch clamp. Los cambios de corriente observados corresponden a la apertura y el cierre de canales individuales. (A) En este caso se observan estados abierto y cerrado bien definidos. La apertura y cierre de un determinado canal es un proceso probabilístico (que depende de factores como el potencial de membrana). Esto hace que los tiempos de apertura y cierre sean variables. (B) Corrientes producidas por un canal con estados de apertura intermedios. (C) Rápida apertura y cierre (*flickering*) de un canal único ante la aplicación de un estímulo sostenido. Note que en este caso, a diferencia de los anteriores, la corriente es hacia afuera (outward). (D) Respuesta de la corriente en función de la tensión aplicada al electrodo. Se observa un comportamiento lineal, cuya pendiente es la conductancia del canal (g). En este caso $g = 110\text{pS}$ (picoSiemens)

3.2. Voltage clamp

En la técnica de *voltage clamp* [4, 5] se utiliza un electrodo para determinar el potencial de membrana al mismo tiempo que se inyecta una corriente comandada externamente. Un esquema del circuito de *voltage clamp* puede verse en la figura 3.2. El *comando de potencial* fija un valor de potencial sobre un amplificador; este valor es comparado con la medición del potencial de membrana. Si los potenciales son iguales, el electrodo no inyecta corriente. Si en cambio, ambos potenciales difieren, una corriente es inyectada en la célula a través del electrodo, hasta que los potenciales se igualan. En la capacidad de medir la corriente inyectada yace la gran utilidad de esta técnica: la magnitud de la corriente inyectada es una medida de la corriente que está fluyendo por los canales iónicos presentes en la membrana. Veamos esto con un ejemplo: Supon-

gamos que el potencial de reposo se encuentra en un valor $V_{rep} = -70mV$, si fijamos el valor de referencia en $V_{ref} = -15mV$, una corriente positiva será inyectada, alcanzando un potencial de membrana $V_m = -15mV$. Este potencial de membrana genera un aumento en la conductancia del sodio, provocando la entrada de iones Na^+ . El sistema inyecta una corriente de igual módulo (y signo contrario), con el fin de mantener el potencial de membrana fijo o “clampeado” en $V_m = -15mV$. Al medir el valor de la corriente inyectada, estamos midiendo en forma indirecta la corriente de sodio. De esta forma, esta técnica permite medir las corrientes iónicas inducidas por un cambio en el potencial de membrana. La variación temporal y dependiente de voltaje de esta corriente extra inyectada refleja la dependencia de voltaje y tiempo de la corriente que fluye a través de los canales; estas propiedades biofísicas son exclusivas de cada tipo de canal iónico. En las últimas décadas se ha utilizado la técnica de voltaje clamp para caracterizar prácticamente todos los canales iónicos que existen en las neuronas de vertebrados y se han construido modelos matemáticos que reproducen su comportamiento electrofisiológico. El esquema que se muestra en la figura 3.2 corresponde al sistema de voltaje clamp utilizado por Hodgkin y Huxley en sus estudios sobre los mecanismos iónicos del potencial de acción. En la actualidad la técnica de voltaje clamp se suele implementar conjuntamente con la técnica de patch clamp. Después de la formación del gigasello se tiene la opción de registrar las corrientes mediadas por canales presentes en el parche o, alternativamente se puede romper el parche (manteniendo el gigasello) y acceder al interior de la célula. En esta configuración, llamada “whole cell” es posible registrar las corrientes de toda la célula de manera similar a los experimentos clásicos de Hodgkin y Huxley.

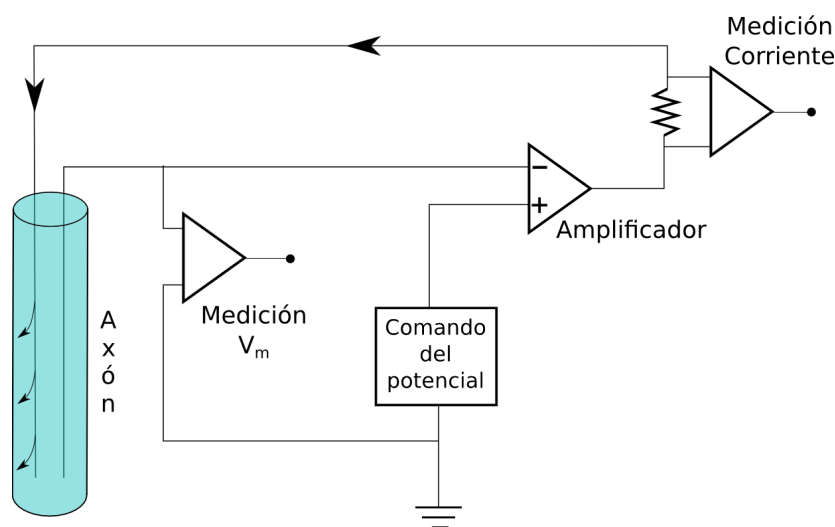


Figura 3.2: Esquema del circuito utilizado en el sistema de voltaje clamp, la medición de la corriente que se necesita para mantener el potencial de membrana constante es una herramienta para caracterizar la respuesta de los canales iónicos a los cambios del potencial de membrana.

3.3. Dynamic clamp

Gracias a la técnica de *voltage clamp* se logró la caracterización de una gran variedad de canales iónicos. Esto permitió el surgimiento de una técnica complementaria al *voltage-clamp*, la cual utiliza el conocimiento biofísico de los canales para estudiar sus roles específicos en la función neuronal y de redes neuronales. Esta técnica, llamada *dynamic clamp*[9] hace uso de los mismos principios que el *voltage clamp* pero utilizando protocolos de inyección de corriente más sofisticados: los cambios medidos en el potencial de membrana se usan para resolver las ecuaciones del modelo matemático que describe la dependencia de voltaje y de tiempo de un canal iónico específico cuya contribución se quiere determinar. El resultado, que puede incluir cambios en la magnitud y en las propiedades cinéticas del canal, es luego utilizado para comandar la inyección de corriente. De esta manera es posible, por ejemplo, eliminar selectivamente canales iónicos de un cierto tipo en una neurona al aplicar la corriente de signo opuesto que fluiría por ese canal a ese potencial. También es posible agregar canales iónicos artificiales (en los cuales se pueden controlar sus propiedades biofísicas) para estudiar potenciales efectos de modulación de los canales. Otra aplicación importante es el estudio de la dinámica de la interacción sináptica entre neuronas: la comunicación química entre neuronas se lleva a cabo mediante la liberación de neurotransmisores que activan canales iónicos activados por ligando presentes en las membranas post-sinápticas. Mediante el uso de *dynamic-clamp* es posible introducir canales sinápticos a una neurona y así simular la estimulación que “naturalmente” recibe una neurona cuando está inmersa en una red. La figura 3.3 muestra de forma esquemática la eliminación de una corriente de potasio utilizando *dynamic clamp*.

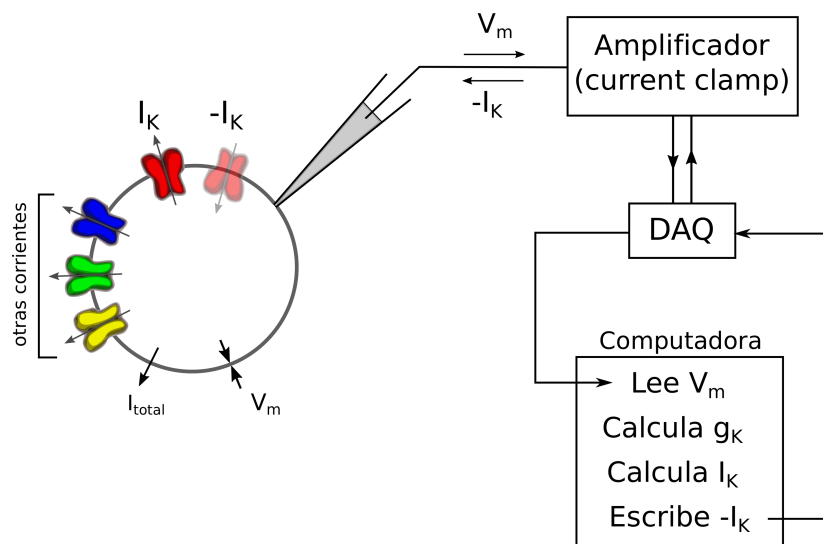


Figura 3.3: Esquema de la eliminación de una corriente de potasio mediante la utilización de dynamic clamp: Utilizando el valor de V_m medido, la computadora resuelve las ecuaciones diferenciales que rigen el comportamiento de la conductancia del canal de potasio y calcula la corriente de potasio que en ese momento fluye a través de la membrana. El amplificador inyecta el valor calculado en sentido opuesto (canal rojo transparente), cancelando el efecto de dicha corriente. Este ciclo se repite a razón de 50000 veces por segundo.

Capítulo 4

Sistema talamocortical

“El tálamo es como el holandés errante, muchos han oído hablar de él, algunos creen en él, pero muy pocos lo han visto realmente”

— J. E. Rose

4.1. Neuronas talamocorticales: Su importancia biológica

Una de las características del estado consciente es la integración funcional de la información (tanto de la almacenada en la corteza cerebral como de la que proviene del exterior a través de los sentidos). Este proceso de integración da como resultado representaciones internas de la estructura causal del exterior: en otras palabras, crea un mapa conceptual y de relaciones causales entre eventos, objetos y aspectos salientes del ambiente. La ventaja evolutiva fundamental de tener este mapa interno es la habilidad para predecir eventos, tomar decisiones y efectuar acciones que aseguren la supervivencia.

En la búsqueda del correlato neuronal de la conciencia, se encontró que el sistema talamocortical es fundamental para generar el estado consciente [10, 11]. Una de las principales funciones del tálamo es el control selectivo del flujo de información desde las fuentes sensoriales hacia la corteza cerebral (núcleos talámicos de orden primario) y entre diferentes áreas corticales (núcleos de orden superior) [12]. A nivel global, el estado de sincronización entre la corteza y el tálamo se correlaciona con estados funcionales del cerebro durante el ciclo sueño-vigilia [13, 14]. A nivel celular, estos estados funcionales se corresponden con las dos formas de disparo de las neuronas talamocorticales: en ráfagas y tónico. El modo de disparo repetitivo en ráfagas es estereotipado y se genera a potenciales hiperpolarizados (-80mV), mientras que el disparo tónico de espigas se

produce a niveles despolarizados de potencial de membrana (-60mV). En mamíferos, el modo de disparo tónico se produce típicamente cuando el animal está despierto o en sueño REM y es considerado un modo de relevo cuya frecuencia varía de acuerdo al estímulo. El modo de disparo periódico en ráfagas, en cambio, se considera refractario a la estimulación y se asocia con patrones electroencefalográficos (EEG) correspondientes a sueño profundo (NREM) o con períodos fisiológicos de inatención [15].

4.2. Neuronas talamocorticales: su relación con la epilepsia de ausencia

Las neuronas talamocorticales (TC) son excitatorias y usan glutamato como neurotransmisor. Estas neuronas proyectan a la corteza cerebral al mismo tiempo que envían colaterales axónicas al núcleo reticular del tálamo (nRT). El nRT es una red de neuronas inhibitorias que usan ácido γ -aminobutírico (GABA) como neurotransmisor y que se encuentran acopladas eléctricamente mediante uniones estrechas (gap junctions). Las neuronas del nRT a su vez emiten proyecciones divergentes a los núcleos de relevo talámico formando un circuito recurrente excitatorio-inhibitorio (Figura 4.1A).

Las propiedades de membrana de las neuronas TC[16] combinadas con la arquitectura de las conexiones sinápticas recíprocas del circuito talamocortical (inhibición recurrente del nRT y excitación recurrente de la corteza cerebral: Figura 4.1B) dan lugar a la actividad oscilatoria que está relacionada con el procesamiento de información sensorial y cortical [13, 17]. En el caso de los sistemas sensoriales, se cree que la retroalimentación excitatoria proveniente de la corteza modula y sincroniza el circuito talamocortical de tal forma que se optimice la abstracción de una representación coherente del mundo exterior[18]; en cambio, la interfaz inhibitoria del nRT es considerada una “compuerta atencional” que filtra la información sensorial, permitiendo que sólo la información relevante al comportamiento del individuo ocupe la limitada franja atencional[19]. De esta forma, las oscilaciones generadas por la actividad iterativa del circuito talamocortical se correlacionan con eventos normales del procesamiento sensorial y cognitivo.

Sin embargo, este tipo de oscilaciones también están presentes en estados patológicos, por ejemplo crisis epilépticas, las cuales están caracterizadas por complejos espigonda o SWDs¹ en el patrón de EEG[20], siendo la epilepsia de ausencia el ejemplo típico y más estudiado. Los episodios o crisis de ausencia *petit mal* tienen una duración corta, en general menor a 30 segundos, y se presentan durante estados de vigilia y durante fases superficiales del sueño. Durante estas crisis, no hay procesamiento de información sensorial y hay pérdida momentánea de la conciencia, sin pérdida de pos-

¹del inglés: Spike & Wave Discharges

tura. Por lo tanto, descubrir los mecanismos moleculares y celulares que fallan para generar este tipo de epilepsia puede aportar indicios sobre la función de las neuronas TC en la integración de información sensorial y cortical durante procesos cognitivos normales.

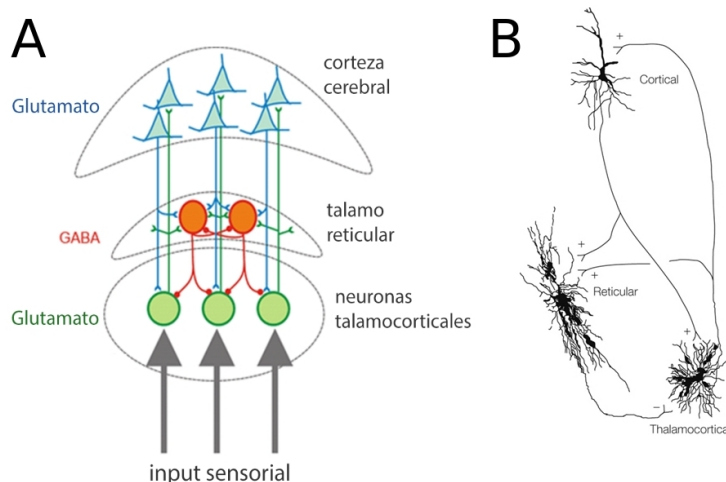


Figura 4.1: Circuito excitatorio-inhibitorio del sistema talamocortical. En (A) puede verse un esquema en el que se incluyen los neurotransmisores involucrados. (B) Esquema de la estructura neuronal de dichas interacciones

En estudios previos del laboratorio de Neurociencias del CAB[16, 21], se demostró que pequeños cambios en los parámetros del canal de calcio de bajo umbral que aumenten la disponibilidad de la corriente de calcio transitoria I_T , son determinantes para aumentar la propensión a oscilar de neuronas TC, y por lo tanto, podrían empujar al sistema oscilatorio talamocortical fuera del rango fisiológico y hacia el tipo de oscilaciones patológicas que se observan en estos tipos de epilepsia. Además, los canales tipo T son uno de los blancos moleculares de los fármacos anticonvulsivantes que se utilizan clínicamente para el control de las crisis de ausencia, lo cual apoya aún más la tesis de que las neuronas TC, y la corriente T de estas neuronas en particular, juegan un papel determinante en la fisiopatología de las crisis de ausencia[22].

En resumen, entender los mecanismos iónicos que producen las oscilaciones subumbrales de neuronas TC y los detalles de conectividad sináptica que inducen fenómenos de resonancia y llevan a la sincronización del sistema talamocortical, es clave para entender cómo se generan las oscilaciones fisiológicas y patológicas en este sistema, y qué función cumplen.

Capítulo 5

Neuronas, Sinapsis y Procesamiento de información

Una neurona típica puede ser dividida en tres partes funcionalmente distintas: las dendritas, el soma y el axón. De una manera general podríamos describir a las dendritas como el dispositivo de entrada, o input, que recibe e integra las señales de otras neuronas y las transmite al soma. El soma es el encargado de procesar esta información y enviar señales hacia otras neuronas (u otras células) a través del axón (output). La unidad de información que utilizan las neuronas es el potencial de acción. En general, la forma de los potenciales de acción no varía considerablemente, lo que implica que la forma del potencial no es portadora de información, pero sí lo son el número de disparos y el momento en el que estos son disparados. La figura 5.1 ilustra un patrón espacio-temporal de pulsos medidos en un conjunto de 10 neuronas, ¿Qué información contiene dicho patrón? ¿De qué forma codifican las neuronas esa información? ¿Cómo se realiza el procesamiento de la información? Aún no se cuenta con una respuesta definitiva a estas preguntas, sin embargo se piensa una parte de la información está contenida en la tasa de disparo media, es decir, el número de disparos (n_{disp}) dada una ventana temporal (T):

$$\nu = \frac{n_{disp}(T)}{T} \quad (5.1)$$

El primero en mostrar la importancia de la tasa de disparo fue Adrian, quien en 1926 encontró una relación entre la tasa medida en los receptores neuronales de determinado músculo y la fuerza que él mismo ejerce[23]. A partir de entonces la tasa de disparo se convirtió en una herramienta muy utilizada para describir propiedades de muchos tipos de neuronas. Es claro, sin embargo, que al realizar un promedio temporal se pierde información contenida en los tiempos precisos de disparo, por lo que esta forma de abordar el estudio del código neuronal es incompleta. A pesar de esto, la tasa de disparo media sin duda cumple un papel fundamental en la codificación de informa-

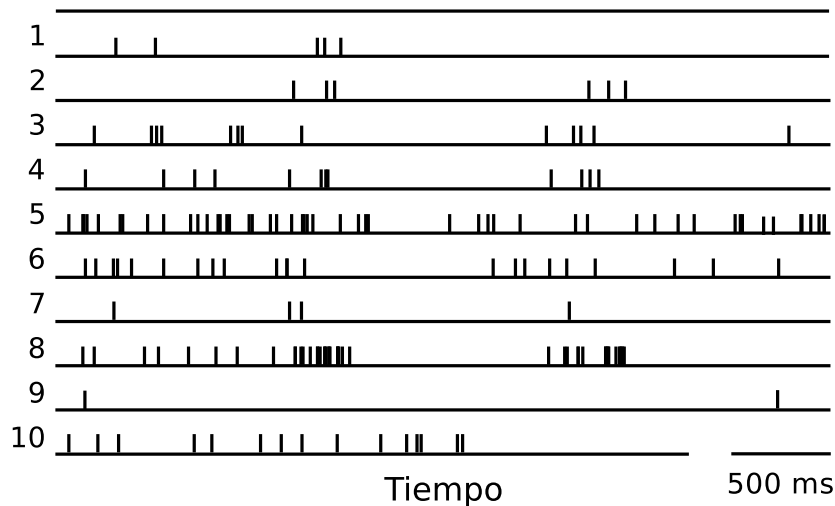


Figura 5.1: Patrón espacio temporal de pulsos medidos en un conjunto de 10 neuronas, las barras verticales representan potenciales de acción.

ción neuronal. Al finalizar el capítulo analizaremos ciertos aspectos relacionados con el procesamiento que realiza el soma, que, como se mencionó anteriormente, es encargado de tomar la información proveniente de las dendritas, integrarla y enviarla a través de los axones. Pero antes, comencemos por el principio, comencemos por la llegada de información: las sinapsis.

5.1. Sinapsis

Las sinapsis son los puntos de contacto para la transmisión de información de una neurona a otra. Las sinapsis químicas son las más abundantes en mamíferos. En este tipo de sinapsis, señales eléctricas en la forma de potenciales de acción llegan a la terminal presináptica, donde se transforman en señales químicas (neurotransmisores) que se liberan y son captadas por receptores en la membrana postsináptica de la neurona que recibe el mensaje (neurona postsináptica). Hay diversos tipos de receptores, que son específicos para distintos neurotransmisores, como glutamato (Glu), que es excitatorio porque la unión a su receptor produce la despolarización de la membrana, acercándola al umbral de disparo de potenciales de acción. O como GABA, que produce la hiperpolarización de la membrana, y por lo tanto, es inhibitorio. La respuesta de la neurona postsináptica no sólo depende del tipo de receptor que exprese sino también del valor de su potencial de membrana en el momento en el cual recibe la señal (i.e., cuán lejos está del umbral de disparo) y de la historia previa del potencial de membrana. Todo esto puede ser resumido en la ecuación que describe la corriente producida en la neurona postsináptica:

$$I_s = g(t)(V_m - E_s) \quad (5.2)$$

donde $g(t)$ representa la conductancia dada para un tipo de receptor (Glu, GABA, etc), V_m es el potencial de membrana en reposo y E_s es el potencial de equilibrio del ion o iones para los cuales es selectivo el receptor postsináptico (sodio, potasio y a veces calcio para Glu, cloro para GABA). Como se puede ver en la ecuación 5.2, la corriente sináptica es similar a las corrientes iónicas descritas anteriormente, la diferencia reside en la dinámica de apertura y cierre de los canales sinápticos y por lo tanto en dependencia temporal de $g(t)$. En muchos casos $g(t)$ se puede modelar como un aumento instantáneo de la conductancia debido a la llegada del neurotransmisor, seguido por un decaimiento exponencial a medida que los canales se cierran:

$$g(t) = g_m \exp(-t/\tau_s) \quad (5.3)$$

donde g_m es el valor de conductancia máximo y depende del número de neurotransmisores y de receptores en membrana.

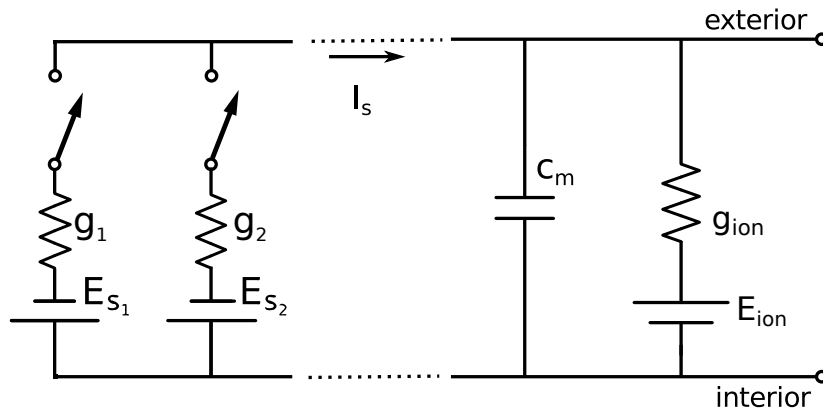


Figura 5.2: Circuito equivalente de una membrana con 2 tipos de receptores sinápticos con conductancias g_1 y g_2 y potenciales de equilibrio E_{s1} y E_{s2} , las “llaves” del circuito se cierran con la llegada de un neurotransmisor.

En la figura 5.2 se muestra un circuito equivalente que se comporta de manera similar a la membrana¹ al llegar un determinado transmisor, la membrana cuenta con distintos receptores (cuya conductancia es g_1 , g_2 , etc.) que provocan el paso de una corriente I_s (Ec. 5.2). Dicha corriente fluye en parte cargando el capacitor que representa la membrana (C_m) y en parte lo hace a través de la conductancia de la misma. El cierre de los canales provoca la descarga del capacitor volviendo de esta forma el potencial de membrana a su valor inicial.

La figura 5.3 muestra ejemplos para respuestas del potencial de membrana a estímulos de tipo excitatorio (EPSP²) e inhibitorio (IPSP³) medidos a distintos valores de potencial de membrana. Nótese el potencial de reversión (potencial al cual la corriente

¹Para el ejemplo se considera una neurona pasiva, es decir, que solo expresa canales de fuga. Si se consideraran corrientes voltaje-dependientes no se podría hacer una descripción general.

²Por sus siglas en inglés: *Excitatory PostSynaptic Potential*

³Por sus siglas en inglés: *Inhibitory PostSynaptic Potential*

es cero) relativamente positivo para los EPSPs (aprox 7 mV) y negativo para los IPSPs (aprox -57 mV).

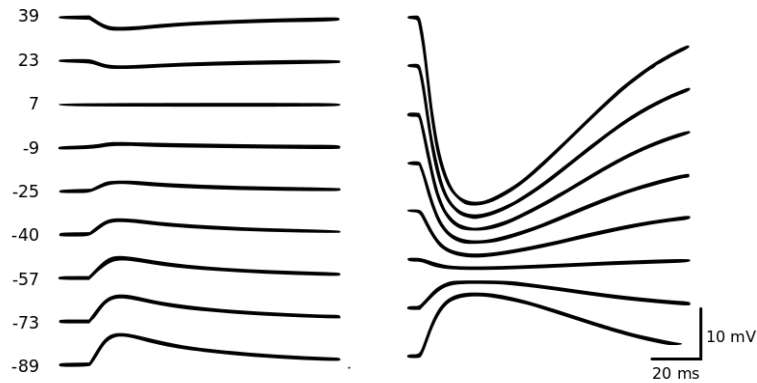


Figura 5.3: Ejemplos de potenciales sinápticos excitatorios (EPSP) e inhibitorios (IPSP) para distintos valores de potencial.

5.2. Procesamiento de la información

¿Cómo procesa información una neurona? La figura 5.4A muestra la medición del potencial de membrana de una neurona (postsináptica) a la cual le llegan estímulos de otras 2 neuronas (presinápticas). En el ejemplo, los potenciales de acción que llegan a las terminales sinápticas generan 4 EPSP, provocando un aumento en el potencial de membrana de la neurona postsináptica. El aumento en el potencial se puede sumar si dos señales llegan con diferencias temporales lo suficientemente pequeñas, ya sea provenientes de la misma neurona presináptica (integración temporal) o de distintas (integración espacial). Si la suma de EPSP es lo suficientemente grande como para alcanzar un valor umbral, la neurona dispara un potencial de acción (fig. 5.4B); de lo contrario, no lo hace (fig. 5.4C). En el ejemplo, los inputs que recibe la neurona son similares, sin embargo la respuesta es por completo distinta.

La respuesta ante determinados inputs depende de las propiedades de la neurona (tamaño, resistencia, capacitancia, corrientes específicas), por lo que distintas neuronas pueden responder en forma distinta a los mismos estímulos. Incluso, una misma neurona tiene la capacidad de cambiar sus propiedades biofísicas, modificando la resistencia y la magnitud de las corrientes, por lo que también puede responder en forma diferente ante los mismos estímulos. Por último y para terminar con las esperanzas del lector de poder lograr un entendimiento completo de cómo una neurona procesa información, vale decir que ante un mismo estímulo, la neurona puede responder de forma distinta (aún sin cambiar sus propiedades intrínsecas, i. e. número de canales, propiedades biofísicas, etc.). Esto último enriquece el lenguaje utilizado por las neuronas, ya que

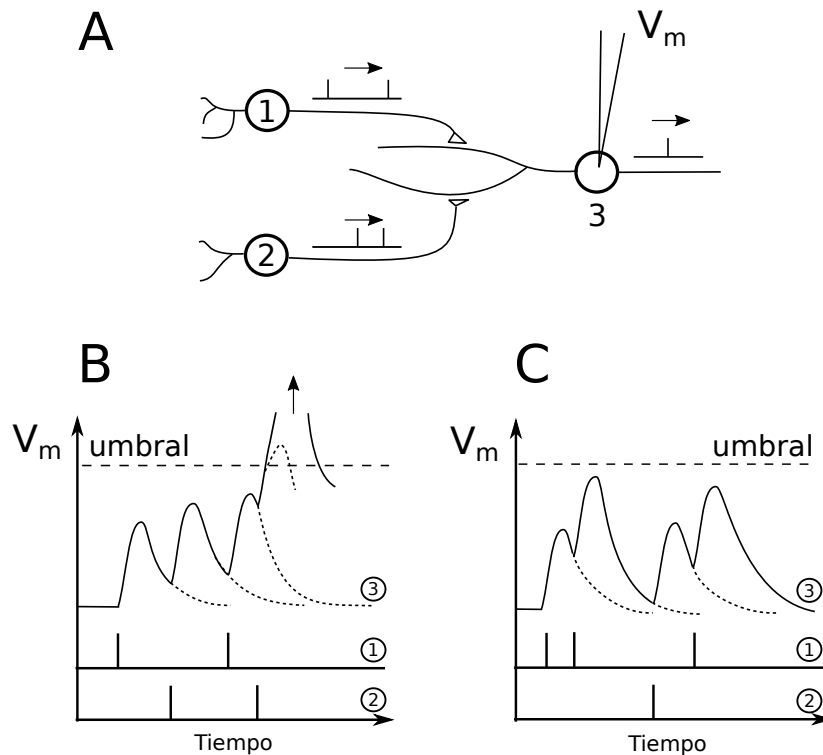


Figura 5.4: Ejemplo de del comportamiento de una neurona postsináptica ante la llegada de estímulos provenientes de neuronas presinápticas. A) Esquema de la disposición espacial de las neuronas. B) Comportamiento del potencial de membrana de la neurona postsináptica ante la llegada de 4 EPSP's con la consecuente generación de un potencial de acción C) Al cambiar los tiempos de llegada de los estímulos, no se llega al valor umbral y por lo tanto no se genera el potencial de acción.

en lugar de obtener una respuesta binaria (donde podemos asignar 0 al no disparo y 1 al disparo), existen probabilidades de disparo (es decir valores intermedios entre 0 y 1) que terminan influyendo en última instancia sobre la tasa de disparo. En adelante centraremos nuestra atención en cómo varía la probabilidad de disparo bajo ciertas circunstancias y qué mecanismos utiliza la neurona para modificar la misma.

5.3. Ganancia

La mayoría de los sistemas encargados de procesar información suelen recibir inputs que varían en un rango muy grande, mientras que el output suele mantenerse en un rango acotado. Para lograr esto, el sistema debe realizar una modulación en la relación input-output, lo que se conoce generalmente como “modulación de la ganancia”. Sistemas que permiten tal modulación están presentes en teléfonos, cámaras, televisores y un sinnúmero de dispositivos electrónicos.

Las neuronas también cuentan con un sistema de modulación de la ganancia, el cual está involucrado en procesos como el movimiento de ojos y extremidades, navegación, percepción espacial, procesamiento atencional y reconocimiento de objetos, entre otros

[24]. Por otra parte, la ganancia está involucrada de una forma más abstracta en otros procesos en el cerebro. Por ejemplo, algunos estudios sugieren que la ganancia juega un papel importante en la transferencia entre los modos de disparo en ráfagas y disparo tónico en neuronas del tálamo [25].

¿Cómo funciona la modulación de la ganancia en neuronas? Si calculamos la probabilidad de disparo para una neurona que ante el mismo estímulo responde de la misma forma, obtendremos la figura 5.5B. Dicho gráfico puede ser interpretado de la siguiente manera: Para estímulos pequeños, la neurona no dispara (output 0), al aumentar el valor del estímulo llega un momento en el cual el potencial de membrana alcanza un umbral de disparo (ver fig. 5.5A) y la probabilidad pasa a ser 1. Modular la ganancia significa para la neurona pasar del comportamiento de 5.5B al comportamiento de 5.5C; lo cual significa aumentar la probabilidad de disparo para valores de estímulo que no alcanzan el umbral, y disminuirlo para los que sí lo hacen. En el próximo capítulo se analizarán las herramientas utilizadas por la neurona para lograr este tipo de comportamiento.

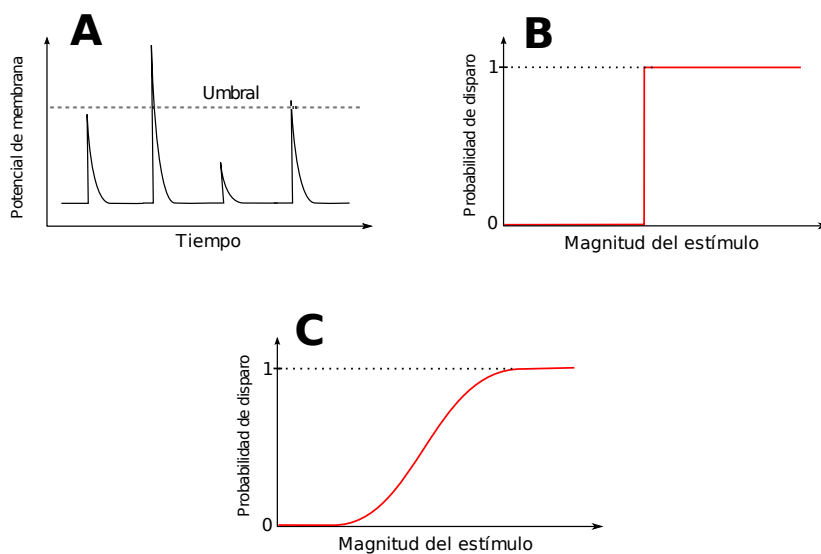


Figura 5.5: Esquema de la relación input-output; La llegada de un potencial de acción (input) provoca un disparo en la célula receptora (output) si se supera un cierto umbral (**A**). La probabilidad se esquematiza en **B** y se intentará explicar qué mecanismos pueden afectar la probabilidad para que se comporte como en **C**.

Capítulo 6

Modulación de la ganancia y Ruido

Ruido:

1. Sonido inarticulado, sin ritmo ni armonía y confuso.
2. Alboroto o mezcla confusa de sonidos.
3. Conjunto de señales extrañas y no deseadas que surgen en un sistema de comunicación o electrónico, debido a interferencias, a defectos de los dispositivos, etc.

Diccionario de la lengua española, Oxford.

6.1. Ruido en el cerebro

Es difícil encontrar una connotación positiva en la palabra *ruido*. Conocer el ruido y sus propiedades suele ser necesario, en el mejor de los casos, para lograr poder deshacernos de él. En el cerebro, sin embargo, donde el ruido está presente en todos los niveles: desde la apertura y cierre de canales iónicos hasta características macroscópicas y de procesamiento de información, el ruido parece tener una gran importancia fisiológica. Existe bibliografía dedicada exclusivamente a tratar de encontrar la relación entre el ruido y su funcionalidad en el cerebro[26][27], tanto a nivel microscópico como macroscópico. Además, muchos trabajos de investigación son dedicados a lograr una caracterización del ruido [28][29] así como a estudiar sus influencia tanto a nivel neuronal[30][31][32][33] como a nivel cerebral[34]. Lejos de ser algo “no deseado” el ruido pasa a ser una herramienta necesaria para el tratamiento de información.

6.2. ¿De dónde viene ese ruido?

El cerebro está sujeto a diversas fuentes de ruido. A escalas microscópicas gran parte del ruido proviene de colisiones moleculares; este ruido se conoce como ruido térmico o de Johnson y tiene consecuencias sobre la apertura y cierre de canales. El flujo de iones a través de la membrana genera diversos tipos de ruido, como el ruido de parpadeo (o flicker), el ruido de disparo (o shot), el ruido de avalancha o el ruido de ráfaga. Por último, existe un ruido asociado a la actividad sináptica: el bombardeo constante de señales sinápticas enviadas comúnmente desde la corteza hacia zonas sub-corticales del cerebro produce la fluctuación aleatoria del potencial de membrana de las neuronas que reciben estas señales. A este ruido se lo conoce como ruido sináptico. Las fluctuaciones del potencial de membrana provocados por el ruido sináptico pueden ser modeladas como ruido gaussiano[33] y son de gran importancia en la modulación de la ganancia.[30]

6.3. El ruido como herramienta de modulación

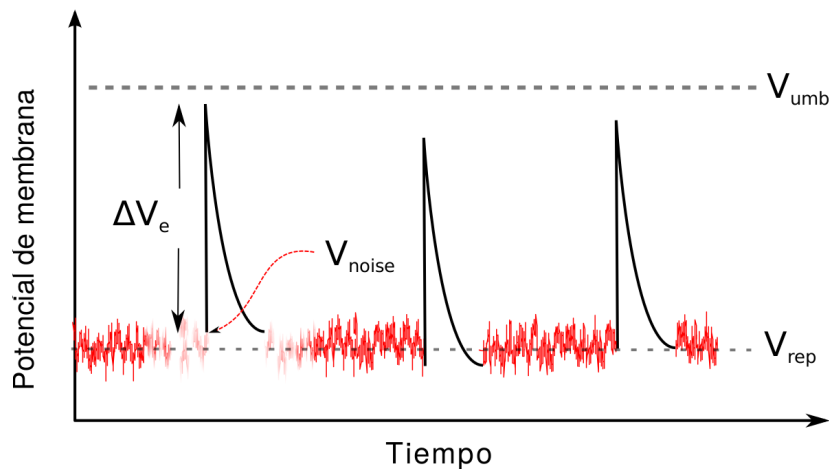


Figura 6.1: Esquema del comportamiento del potencial de membrana debido al input sináptico (color rojo) y al input sensorial (color negro) en conjunto. Las fluctuaciones inducidas por el input sináptico modifican la probabilidad de disparo.

La figura 6.1 representa de forma esquemática el comportamiento del potencial de membrana debido al ruido sináptico (rojo) y al input sensorial (negro). El input sensorial proviene de sinapsis de tipo glutamérgicas, por lo que son estímulos de tipo excitatorio. Dicho estímulo provoca en la neurona receptora la generación de un EPSP, cuya magnitud (i.e. el cambio en el potencial de membrana) definiremos como ΔV_e , mientras que V_{noise} es un valor que fluctúa debido al ruido sináptico. Dicha fluctuación se da alrededor de V_{rep} , valor del potencial en reposo. Si asumimos que V_{noise} es pequeña en comparación de ΔV_e , podemos considerar que ambos valores se suman linealmente

en el momento que llega el estímulo. Por lo tanto, para que la neurona dispare (i.e alcance el umbral V_{umb}) se debe cumplir que:

$$\Delta V_e + V_{noise} > V_{umb} : \quad (6.1)$$

o bien:

$$V_{noise} > V_{umb} - \Delta V_e \quad (6.2)$$

La inecuación 6.1 explica, cualitativamente, cómo el ruido puede ser utilizado para modular la ganancia: Los valores de ΔV_e que, en ausencia de ruido, no lograban superar el umbral, ahora pueden hacerlo con cierta probabilidad, gracias al término V_{noise} . Usando el mismo razonamiento, existe cierta probabilidad de que valores supraumbral de ΔV_e , en presencia de ruido, no superen el umbral.

Debemos ahora formalizar lo dicho anteriormente. Sabemos que el ruido puede ser modelado como ruido gaussiano, lo que implica que su densidad de probabilidad posee una distribución normal:

$$f(V) = \frac{1}{\sigma_{noise}\sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{V - V_{rep}}{\sigma_{noise}}\right)^2\right) \quad (6.3)$$

donde σ_{noise} representa la dispersión de la fluctuación. La probabilidad de disparo en función del estímulo $P(\Delta V_e)$ está dada por:

$$P(\Delta V_e) = \int_{(V_{umb} - \Delta V_e)}^{\infty} f(V) dV \quad (6.4)$$

donde V_{umb} es el potencial umbral. Realizando el cálculo de la integral se obtiene:¹

$$P(\Delta V_e) = \frac{1}{2} \left[1 + erf\left(\frac{\Delta V_e - \mu}{\sqrt{2}\sigma_{noise}}\right) \right] \quad (6.5)$$

donde $erf()$ es la función error y μ se define como $V_{umb} - V_{rep}$. El parámetro σ_{noise} , que representa la dispersión del ruido, también indica que tan brusca es la transición entre las probabilidades de disparo 0 y 1. Resumiendo, la ecuación 6.3 permite caracterizar el comportamiento de la membrana ante estímulos ruidosos, mientras que la ecuación 6.5 caracteriza el comportamiento de la probabilidad de disparo; ambas funciones se relacionan a través del parámetro de dispersión σ_{noise} . Todo esto es esquematizado en la figura 6.2.

¹Nótese que el límite inferior de la integral en 6.4 ($V_{umb} - \Delta V_e$) puede leerse como “lo que le falta al estímulo para llegar al umbral”, por este motivo se integra desde ese valor hasta ∞ , obteniendo de esta forma la probabilidad.

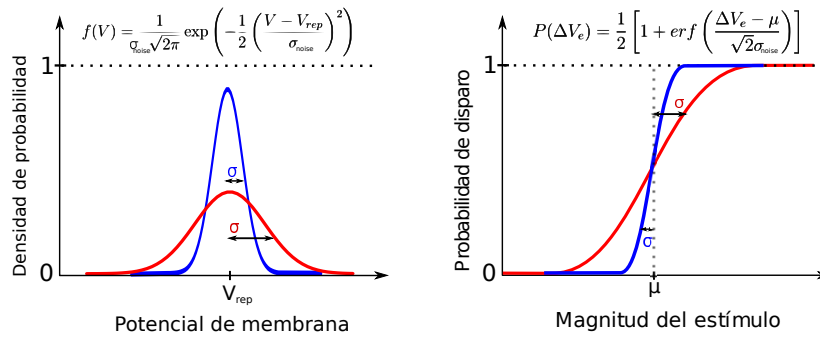


Figura 6.2: **A:** Densidad de probabilidad en función del potencial de membrana; la dispersión σ_{noise} depende de los inputs corticales y de la conductividad de la membrana. **B:** probabilidad de disparo en función de la magnitud del cambio de potencial de membrana (ΔV_e). La dispersión σ_{noise} relaciona la probabilidad de disparo con la fluctuación de la membrana. Esto muestra que el ruido puede ser utilizado como herramienta para la modulación de la ganancia.

6.4. Otros factores que afectan la modulación

En la sección anterior vimos la importancia de los inputs moduladores (ruido sináptico) sobre la ganancia. Veamos ahora qué factores actúan sobre los inputs sensoriales. Como se vió anteriormente, los EPSP son generados por una corriente del tipo:

$$I(t) = g_{max} e^{t-t_0/\tau} (V - E_{rev}) \quad (6.6)$$

esta corriente, provoca un cambio en el potencial (ΔV_e) que depende de diversos factores; la conductancia máxima g_{max} (dada por el número de receptores disponibles para ser activados por el neurotransmisor) es sin duda un factor importante, pero otros factores también tienen un rol fundamental:

- Las corrientes iónicas voltaje-dependientes: Una corriente despolarizante, por ejemplo, potencia el efecto de la sinapsis produciendo un ΔV_e mayor mientras que una corriente hiperpolarizante produce el efecto contrario.
- La conductividad de la membrana: El estímulo produce una corriente, el cambio de voltaje en la membrana depende proporcionalmente de la conductividad (ley de Ohm).
- El potencial en reposo de la membrana: Por un lado determina la fuerza electromotriz de la sinapsis y por el otro influye en el comportamiento de las corrientes voltaje-dependientes.

Lograr una caracterización input(g_{max})-output(probabilidad de disparo) y determinar cómo la gran cantidad de factores involucrados pueden afectar la relación input-output nos permite entender cómo las neuronas logran una regulación de dicha relación.

6.5. Relación estímulo-EPSP

Para estudiar la dependencia de la magnitud de EPSP (ΔV_e) ante la llegada de un estímulo de una magnitud dada g_{max} se utilizó un modelo de neurona TC implementado en NEURON[35][16] en el cual se variaron los parámetros de conductancias pasivas (de fuga) y la magnitud de conductancias voltaje-dependientes (I_A , I_h). El resultado se observa en la figura 6.3

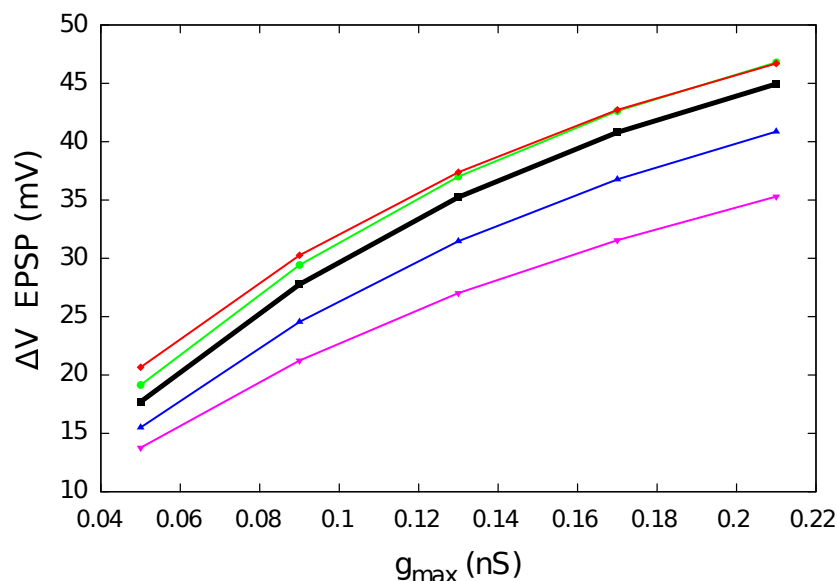


Figura 6.3: Relación entre el cambio de voltaje del EPSP en función de la conductancia máxima g_{max} . Las distintas condiciones son: control (negro); disminución de la corriente de fuga (verde); aumento de la corriente de fuga (azul); aumento de la corriente hiperpolarizante I_A (fucsia); y aumento de la corriente despolarizante I_h (rojo).

Un aumento en la conductancia pasiva (de fuga) produce un desplazamiento hacia abajo en la curva (ante un mismo estímulo, el cambio de potencial es menor)². Lo opuesto ocurre para una disminución de esta conductancia pasiva. Los cambios en la curva debido a cambios en las corrientes voltaje-dependientes dependen de la cinética del canal, pero de una manera general podemos decir que un aumento en las corrientes despolarizantes produce un desplazamiento hacia abajo de la curva, mientras que un aumento de las corrientes hiperpolarizantes tiene el efecto contrario. En este caso, el efecto se debe a la amplificación (corriente despolarizante) u oposición (corriente hiperpolarizante) al desplazamiento del potencial de membrana inducido por el EPSP.

¿Cómo influye todo esto sobre la probabilidad de disparo? Con el fin de hacer un análisis puramente cualitativo, es posible realizar la aproximación a orden lineal de $\Delta V_e(g_{max})$ para valores de ΔV_e cercanos al umbral; i.e. $\Delta V_e(g_{max}) = mg_{max} + b$. Por lo tanto la ecuación 6.5 se puede escribir:

²Este efecto, conocido como “shunting”, se debe a que este tipo de conductancia independiente del voltaje disminuye la resistencia global de la membrana

$$P(g_{max}) = \frac{1}{2} \left[1 + \operatorname{erf} \left(\frac{(mg_{max} + b) - \mu}{\sqrt{2}\sigma_{noise}} \right) \right] \quad (6.7)$$

reacomodando:

$$P(g_{max}) = \frac{1}{2} \left[1 + \operatorname{erf} \left(\frac{(g_{max}) - (\mu - \delta)}{\sqrt{2}(\sigma_{noise}/m)} \right) \right] \quad (6.8)$$

La dispersión de la ganancia puede ser definida como $\sigma = \sigma_{noise}/m$; por lo tanto, la pendiente m influye directamente sobre la dispersión de $P(g_{max})$: mientras menor sea el valor de m , mayor será σ , por lo que la transición entre valores de probabilidad de disparo 0 y 1 será más gradual (menor será la ganancia). Lo opuesto ocurre para valores crecientes de m .

El valor de m puede pensarse, conceptualmente, de la siguiente forma: Si aumento el estímulo en una cantidad Δg_{max} ¿Qué tanto aumenta la magnitud del EPSP (ΔV_{EPSP})?. La figura 6.4 nos da una idea de cómo se comporta la pendiente de la curva al cambiar valores de distintas conductancias (los trazos gruesos de los voltajes cercanos al umbral pueden ser tomados como la recta con la cual aproximamos la curva, m es la pendiente de dicha recta).

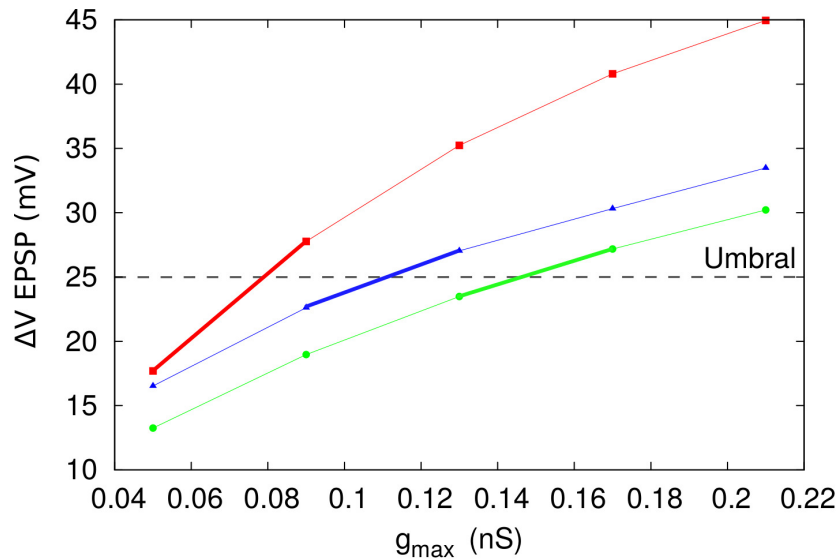


Figura 6.4: Ejemplos de variación del factor m para un aumento en una corriente hiperpolarizante (verde) y un aumento en una corriente despolarizante (rojo). El valor control se muestra en azul.

Capítulo 7

Objetivos

“Espacio cerebrito”

— Clancy Gorgory

La producción de señales en neuronas talamocorticales (TC) está dada por una diversidad de corrientes. Canales de potasio, sodio y calcio determinan el complejo comportamiento del potencial de membrana. Utilizando técnicas de patch clamp en neuronas de ratón, junto con un modelo computacional, en el laboratorio de Neurociencias del CAB se logró caracterizar siete corrientes subumbrales de neuronas talamocorticales, así como la cuantificación de su contribución a la conductancia total[16]:

La corriente catiónica activada por hiperpolarización (I_h), la corriente de calcio de bajo umbral (I_T) y la corriente persistente de sodio (I_{NaP}) tienden a llevar al potencial de membrana a valores más positivos, alejándolos del potencial de equilibrio de las corrientes de fuga de sodio y de potasio ($I_{K_{leak}}$) e ($I_{Na_{leak}}$). Esta despolarización es contrarrestada por la corriente transitoria de potasio tipo A (I_A) y por la corriente rectificadora de potasio ($I_{K_{ir}}$). Utilizando un modelo computacional que reproduce el comportamiento electrofisiológico de neuronas TC de ratón[16]. En este estudio se mostró que la variación de parámetros individuales de las conductancias subumbrales, que alteran el balance entre estas conductancias, determina la propensión de la membrana a disparar ráfagas repetitivas como las observadas experimentalmente en condiciones fisiológicas y patológicas.

Uno de los principales objetivos del presente trabajo fue realizar la comprobación experimental de la influencia de corrientes subumbrales sobre la propensión del disparo repetitivo en ráfagas. En particular, se trabajó con las corrientes $I_{K_{ir}}$, I_A e I_T y los resultados se muestran en el capítulo 9.

Por otra parte, la gran cantidad de proyecciones que recibe el tálamo provenientes de la corteza, provoca una fluctuación considerable en el potencial de membrana de las neuronas talámicas, la cual podría ser modelada como ruido. El registro electrofisiológico de neuronas TC *in-vitro* se realiza en el laboratorio en rodajas de cerebro de ratón,

utilizando las técnicas descritas en el capítulo 3. En esta preparación, las conexiones entre la corteza y el tálamos no están conservadas, por lo cual la presencia de ruido sináptico no se observa. Sin embargo, este ruido puede ser introducido de manera artificial mediante la técnica de patch clamp, con el objetivo de simular el comportamiento *in-vivo* de las neuronas. En particular, se utilizó esta técnica y el modelo computacional de neuronas TC para estudiar los comportamientos en los cuales la presencia de ruido es relevante y la influencia de las corrientes subumbrales en dichos comportamientos.

El segundo objetivo de la tesis fue analizar el efecto de las distintas corrientes sobre la modulación de la ganancia, tanto a potenciales despolarizados como hiperpolarizados. Los resultados se muestran en los capítulos 10 y 11.

Capítulo 8

Trabajo en el laboratorio

En el laboratorio de Neurociencias del Centro Atómico se ha avanzado en la implementación de un sistema de dynamic clamp¹, el cual permite la introducción (o sustracción) de conductancias en una célula modelo y en células reales vivas durante registros de patch clamp.

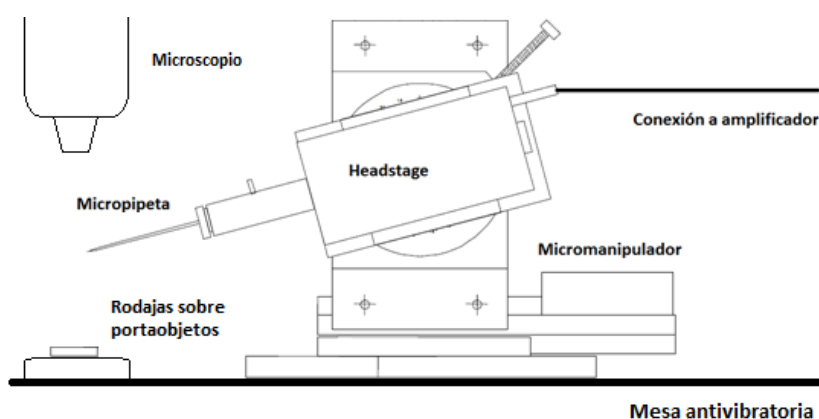


Figura 8.1: Esquema del equipo utilizado para realizar mediciones utilizando dynamic clamp

El sistema utilizado es esquematizado en la figura 8.1. El mismo está formado por un preamplificador² al que se le puede colocar una micropipeta o una célula modelo. El preamplificador está sujeto a un micromanipulador³ y conectado a un amplificador⁴. Para observar las rodajas, y con el fin de tener una referencia al mover la micropipeta, se utiliza un microscopio⁵, dotado con un sistema de contraste IR-DIC y una cámara de video montado sobre un sistema de desplazamiento horizontal en los ejes X e Y. Todo el sistema de visualización y de registro se encuentra sobre una mesa antivibratoria⁶

¹la implementación del sistema de dynamic clamp fue llevada a cabo por Sebastián Moguilner durante su trabajo de maestría

²headstage CV-7B, Axon Instruments

³MP-285 Sutter Instruments

⁴patch clamp Multiclamp 700B de Molecular Devices

⁵Axioskop 2 FS plus marca Zeiss

⁶TableTopTM CSP[®] High Performance Vibration Isolation System

que amortigua las vibraciones mediante el uso de aire comprimido.

La señal obtenida por el electrodo es enviada al amplificador. Luego de amplificada, la señal es digitalizada por una tarjeta de adquisición para luego pasar a la PC. La tarjeta de adquisición utilizada depende de las necesidades del experimento a realizarse, he aquí las dos opciones:

1. **Digidata 1440A**⁷ se utiliza típicamente para comandar protocolos de inyección de corriente o de voltaje en experimentos de electrofisiología celular. Esta interfaz es comandada por el software PClamp 10 (módulo Clampex). Tanto los protocolos de current clamp (inyección de corriente) como de voltage clamp (mantenimiento de un voltaje constante) comandan al amplificador mediante la aplicación de una diferencia de potencial en la salida analógica de la interfaz, la cual está conectada a la entrada analógica del amplificador. El amplificador a su vez convierte esta señal de voltaje en la corriente que debe ser aplicada a la célula para satisfacer el comando digital original producido por el software. Esta interfaz también lee el potencial de membrana de la salida analógica del amplificador, la cual puede ser utilizada en experimentos de voltage clamp como la señal que es comparada por el circuito de retroalimentación para mantener el voltaje constante.
2. **DAQ PCIe-6351**⁸ se utiliza, en el contexto de dynamic clamp, para leer el potencial de membrana de la salida analógica del amplificador y para inyectar la corriente que satisfaga la solución numérica de una ecuación (usualmente diferencial) que describe una conductancia iónica en particular. Esta interfaz es comandada por el software de dynamic clamp *StdpC*. El voltaje leído de la salida analógica del amplificador es utilizado por el software para calcular la solución de la ecuación (realizado por el procesador de la computadora) que describe la conductancia a ser introducida en la célula. Esta solución (en unidades de corriente) es comanda como una diferencia de potencial en la salida de la interfaz, la cual está conectada a la entrada analógica del amplificador. Este proceso es realizado iterativamente a una frecuencia aproximada de 50 KHz.

8.1. Circuito sumador

Con el sistema implementado no era posible aplicar protocolos de estimulación simultáneamente con el dynamic clamp debido a limitaciones de hardware: El amplificador de patch clamp (multiclamp 700 B de Molecular Devices) sólo tiene una entrada analógica BNC para comandar la inyección de corriente en cada uno de los electrodos

⁷Digidata 1440A, Low-noise Data Acquisition System, Molecular Devices

⁸DAQ PCIe-6351, X Series Multifunction Data Acquisition, National Instruments

de registro. Durante un experimento típico de dynamic clamp es deseable poder controlar el potencial de membrana (mediante la inyección de corriente) al mismo tiempo que se implementa el lazo computacional del dynamic clamp. Para esto es necesario poder comandar simultáneamente el amplificador con dos fuentes de voltaje independientes provistas por dos interfaces digital/analógicas. Teniendo en cuenta estas necesidades, se llevó a cabo la implementación de un circuito (ver figura 8.2) capaz de tomar las señales (analógicas) provenientes de ambas fuentes de voltaje, realizar la suma de las señales y entregarla al amplificador.

El circuito constó básicamente de dos partes:

- El *sumador* propiamente dicho (figura 8.2B), el cual consiste en 2 amplificadores con retroalimentación negativa, el primero realiza la suma de tensiones, cambiando la polarización (sumador inversor), mientras que el segundo invierte la polarización nuevamente (inversor).
- Una fuente capaz de entregar una tensión continua de $-12V/ +12V$, con el objetivo de alimentar los amplificadores, tomando tensión alterna de línea (220V).

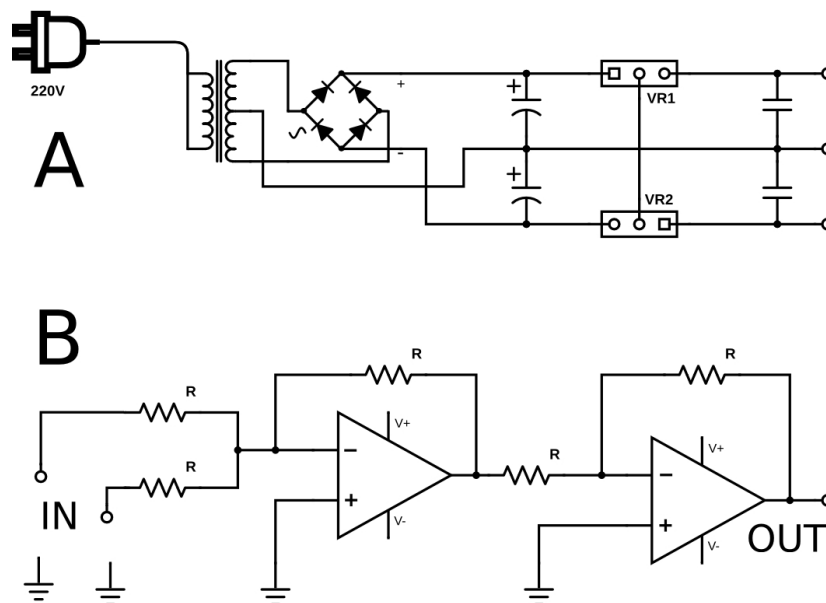


Figura 8.2: Esquema del circuito implementado para la inyección simultánea de 2 corrientes. El mismo consiste en un sumador no inversor implementado con amplificadores operacionales. (A). Fuente $-12/+12$ utilizada para la alimentación de los amplificadores (B) amplificadores conectados con retroalimentación negativa, las señales que ingresan al circuito son sumadas y entregadas al amplificador.

Los amplificadores operacionales utilizados⁹, fueron seleccionados teniendo en cuenta la tensión (0–10V) y corrientes ($\sim nA$) utilizadas, pero principalmente teniendo en cuenta la capacidad de respuesta necesaria (50 kHz). Las resistencias utilizadas ($R=10k\Omega$) debían ser de igual valor para que la señal no se amplifique.

⁹OP07, Analog Devices

En primer lugar, el sumador fue implementado en una plaqueta experimental. Una vez verificado su correcto funcionamiento, se realizó una segunda versión en circuito impreso; la figura 8.1 muestra el modelo en 3D realizado en computadora y su implementación.



Figura 8.3: Modelo 3D del circuito impreso del sumador (izquierda) y versión final del sumador (derecha).

8.1.1. Pruebas de funcionamiento

Para verificar el correcto funcionamiento del sumador implementado, se realizaron mediciones utilizando una célula modelo, la cual simula una célula con 33 pF de capacitancia y 500 M Ω de resistencia de membrana. Se aplicó de forma simultánea un protocolo de inyección de corriente junto con la adición de conductancias mediante dynamic clamp. En la figura 8.1.1 A puede verse la respuesta ante la inyección de un protocolo de pulsos, sin dynamic clamp. La respuesta es la esperada para esta célula, típica de un circuito RC, con constante de tiempo $\tau = 17,8ms$ y una resistencia de membrana de $R_m = 538M\Omega$. En la figura B se observa la respuesta al mismo protocolo de inyección de corriente utilizado en A, pero adicionando mediante dynamic clamp conductancias de fuga de potasio (I_{Kleak}) y de bajo umbral de calcio (I_T). El potencial de reposo es de -64 mV debido a la conductancia de fuga de potasio. La resistencia de membrana disminuye a $R_m = 85,1M\Omega$ y $\tau = 3,37ms$, debido también a las corrientes de fuga. En los insertos se muestran ampliaciones de las zonas demarcadas, en las cuales se observan las corrientes típicas obtenidas cuando se produce activación de la conductancia T mediante despolarización. Para el valor de potencial de membrana inicial la inactivación de canales T es muy grande, lo que explica que en el inserto de la izquierda se observe solo un leve aumento en el potencial. Para el inserto de la derecha, en cambio, se observan grandes cambios en el potencial de membrana, provocados por la hiperpolarización previa.

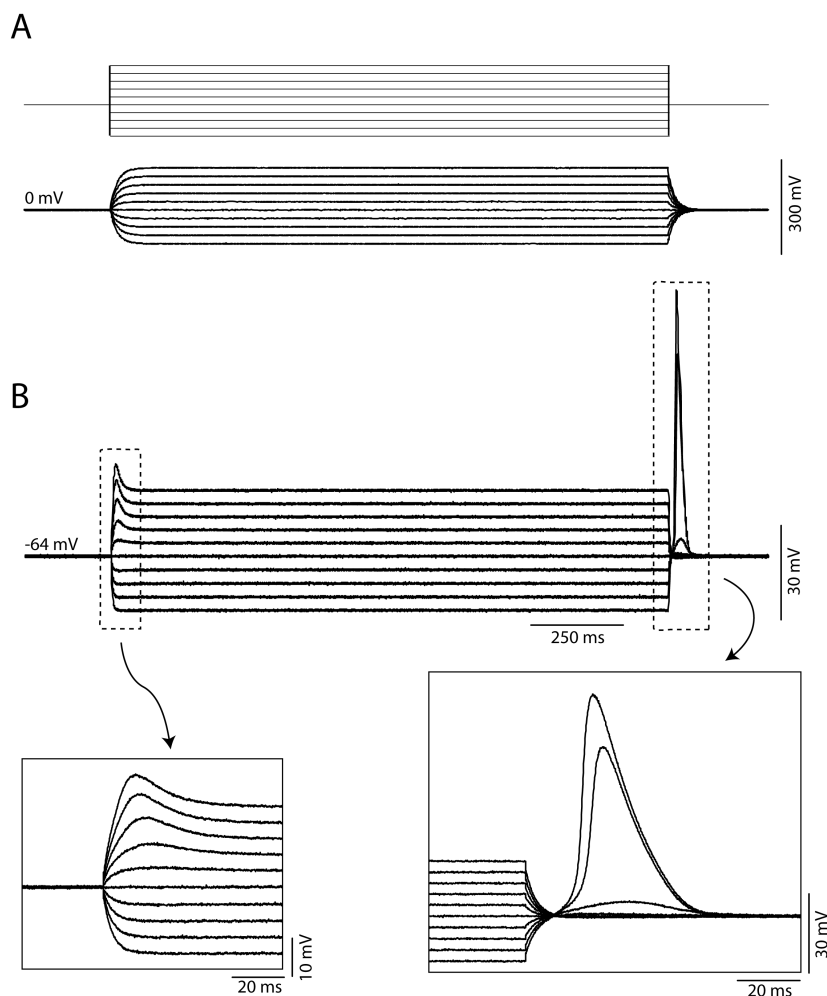


Figura 8.4: Aplicación simultánea de un protocolo de inyección de corriente y la adición de conductancias mediante dynamic clamp en una célula modelo. A) Respuesta a un protocolo de pulsos de 1.5 segundos de duración desde -200.0 pA en incrementos de 50.0 pA en ausencia de dynamic clamp. B) Respuesta al mismo protocolo de inyección de corriente, pero con la adición de las conductancias de fuga de potasio (I_{Kleak} ; g_{Kleak} 6 nS) y de bajo umbral (I_T ; $g_T = 40$ nS) mediante dynamic clamp. En los insertos se observan las corrientes típicas obtenidas ante la adición de una corriente T.

Una vez implementado el circuito, se llevaron a cabo registros sobre una célula modelo y sobre neuronas talamocorticales de ratón.

8.2. Preparación de las rodajas

Todos los experimentos fueron llevados a cabo de acuerdo a la Guía NIH para el cuidado y uso de animales de laboratorio. Las rodajas de cerebro fueron preparadas a partir de ratones de entre 2 y 4 semanas de edad. Los ratones fueron anestesiados y decapitados, siendo el cerebro colocado en una solución de líquido cefalorraquídeo artificial (ACSF). El cerebro fue cortado en rodajas de 350 μm de espesor utilizando un vibrofeteador. Aquellas rodajas que contenían secciones del tálamo eran conservadas y

luego colocadas en el sistema de patch clamp.

8.3. NEURON

Neuron[35] es un entorno de simulación que permite modelar las características biofísicas, tanto de neuronas individuales como de redes neuronales. En el presente trabajo se utilizó un modelo monocompartmental utilizando los valores de conductancia determinados experimentalmente[16]. Los estímulos utilizados fueron sinapsis de tipo Destexhe[36],[37]. La figura 8.3 muestra el entorno gráfico del programa y las características básicas utilizadas para hacer las simulaciones. El cálculo de cada probabilidad se realizó tomando el número de espigas detectadas (indicado como G) sobre el número de estímulos realizados (indicado como D). Fue necesaria la implementación de código externo a NEURON para facilitar los cálculos de probabilidad necesarios.

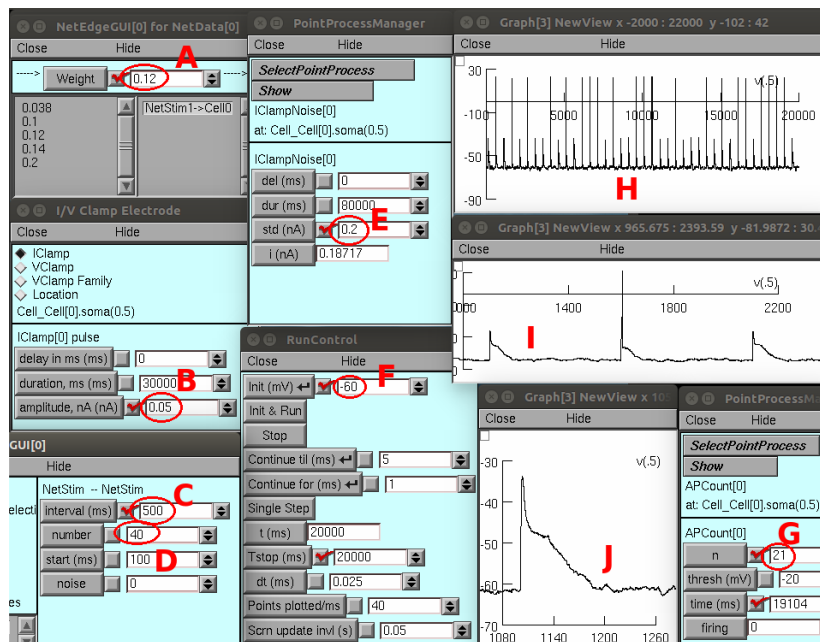


Figura 8.5: Entorno gráfico Neuron. Se muestra una simulación en la que se utilizaron 40 estímulos que generaron 21 espigas (probabilidad $\approx 0,52$). Es posible controlar parámetros como magnitud del estímulo (A), corriente inyectada (B), distancia temporal entre estímulos (C), número de estímulos (D), desviación estándar del ruido sináptico (E) y potencial de membrana inicial (F). H, I y J son gráficos de potencial en función de tiempo mientras que G cuenta las espigas producidas.

Capítulo 9

Resultados experimentales (I): Propensión de disparo

9.1. I_T

La corriente de calcio transitoria de bajo umbral I_T es el determinante principal del disparo en ráfagas en neuronas TC. *In-vitro*, la eliminación farmacológica de esta conductancia abole por completo la generación de ráfagas. *In-vivo*, la eliminación del disparo en ráfagas en neuronas TC se logra mediante la utilización de herramientas genéticas¹ que anulan la corriente de tipo T [38]. Por otra parte, el aumento de esta conductancia, también mediante métodos genéticos, induce epilepsia de ausencia en ratones. Dado que este estado patológico se asocia a un aumento en la propensión de las neuronas TC a disparar ráfagas repetitivas, es posible que un aumento en I_T induzca el aumento en la propensión al disparo periódico de ráfagas. Esta predicción ha sido afirmada en varios estudios computacionales [38] [39] [40] [41].

Consistente con esta predicción, se pudo probar, tanto computacional como experimentalmente, que el aumento de la conductancia de I_T induce el disparo repetitivo en ráfagas. La figura 9.1A muestra el resultado computacional, en el cual se aumenta el valor de la conductancia T , provocando una oscilación del potencial de membrana y el disparo repetitivo en ráfagas. Un comportamiento similar se observa en una neurona *in-vitro*(fig. 9.1B) ante la inyección de conductancia T usando *dynamic-clamp*.

9.2. I_{Kir}

Estudios realizados en nuestro laboratorio [16] mostraron que I_{Kir} incrementa la propensión a disparar rafagas repetitivas. Este resultado puede observarse en la figura 9.2A; un aumento en la conductancia de I_{Kir} hiperpolariza la membrana y provoca

¹Ratón knockout para el canal iónico Cav3.1, el cual produce la corriente T en neuronas TC

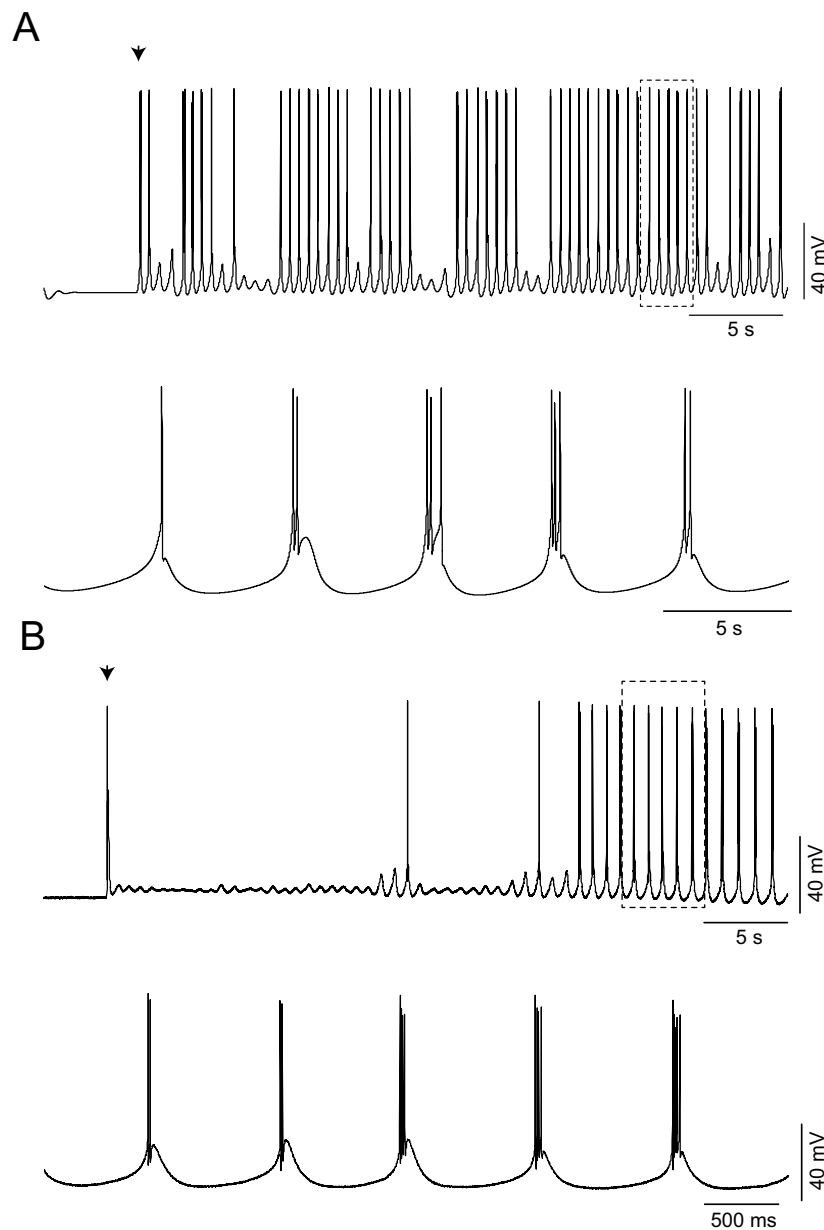


Figura 9.1: Disparo repetitivo en ráfagas inducido por la corriente I_T . (A) Potencial de membrana de una neurona TC en el modelo computacional. Se indica con una flecha el momento en el cual se cambia la permeabilidad de la corriente T (pasa de un valor de $5,0 \times 10^{-5} \text{ cm/s}$ a un valor de $8,0 \times 10^{-5} \text{ cm/s}$) (B) Potencial de membrana de un neurona TC *in-vitro* ante la adición de $I_T = 16 \text{ nS}$ utilizando *Dynamic-clamp*.

el disparo repetitivo en ráfagas. Este resultado fue comprobado experimentalmente en neuronas *in-vitro*, mediante la adición de I_{Kir} , utilizando *dynamic clamp*. El resultado se muestra en la figura 9.2 y se observa que el comportamiento del potencial de membrana es similar al del modelo computacional.

En la figura 9.3A puede observarse la respuesta del potencial de membrana de la misma célula, esta vez ante la aplicación de un protocolo de pulsos de 8 segundos de duración desde -120 pA en incrementos de 30 pA en ausencia de *dynamic clamp*. Se observa la ausencia de actividad oscilatoria periódica para todos los niveles de

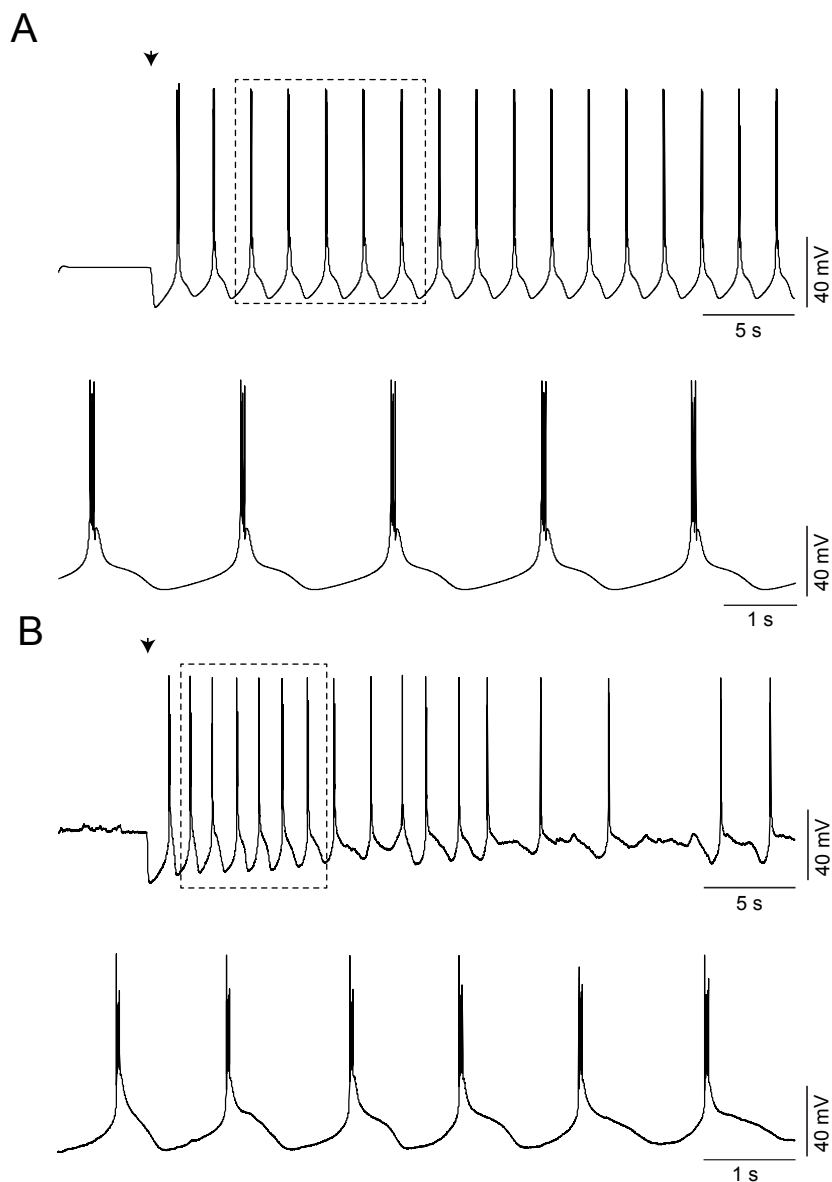


Figura 9.2: (A) Disparo repetitivo en ráfagas inducido por la un aumento en la conductancia de la corriente rectificadora de entrada de potasio I_{Kir} de $2,0 \times 10^{-5}$ a $1,2 \times 10^{-4} S/cm^2$ (B) Disparo repetitivo en ráfagas inducido por la aplicación simultánea de un protocolo de inyección de corriente y la adición de conductancia K_{ir} (12 nS) mediante dynamic-clamp en una neurona talamocortical.

inyección de corriente. En la figura 9.3B se repite el protocolo inyectado en la figura 9.3A, pero esta vez se adiciona la corriente K_{ir} mediante dynamic clamp, se observa que el comportamiento oscilatorio se da exclusivamente a niveles de inyección de corriente entre -30 y -60 pA. La aplicación simultánea del protocolo de estimulación (varios niveles de inyección de corriente) y de la corriente K_{ir} simulada en e sistema de dynamic clamp se llevó a cabo utilizando el sumador de voltaje desarrollado (ver capítulo 8).

Los registros se realizaron en 6 neuronas diferentes. Los resultados obtenidos fueron similares a los observados en las figuras 9.2 y 9.3, por lo que se puede concluir que, efectivamente, la introducción de I_{Kir} mediante dynamic clamp induce el disparo re-

petitivo en ráfagas. Este es un resultado importante, ya que la función de los canales que producen la corriente Kir ² en neuronas es desconocida y ha sido poco estudiada. Por otra parte, mientras que los canales tipo T y tipo h han sido involucrados en la fisiopatología de la epilepsia de ausencia[42][43][44], los canales tipo Kir no han sido estudiados en este contexto, pero existe evidencia que indica que el efecto de los fármacos antiausencias, como la etosuximida, podría ser en parte debido al bloqueo de canales Kir [45].

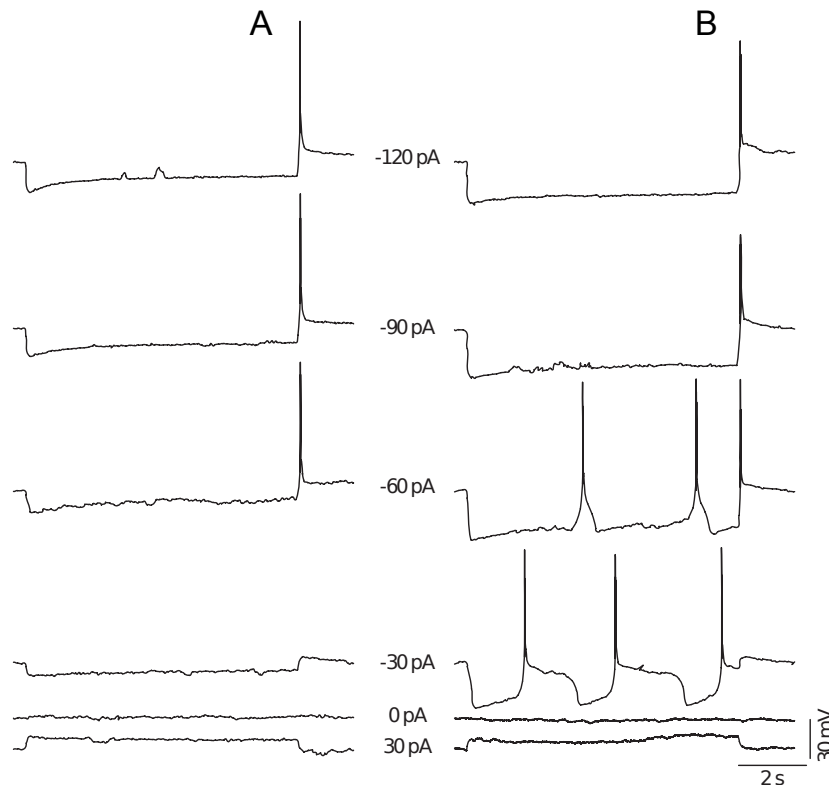


Figura 9.3: Aplicación simultánea de un protocolo de inyección de corriente y la adición de conductancias mediante dynamic-clamp en una neurona talamocortical. (A) Respuesta de la misma célula en A a la aplicación de un protocolo de pulsos de 8 segundos de duración desde -120 pA en incrementos de 30 pA en ausencia de dynamic clamp con holding current = 0.0 pA. (B) Respuesta de la misma neurona TC al protocolo descrito en B durante la adición de $IKir$ ($g_{Kir} = 30$ nS) mediante dynamic clamp.

9.3. I_A

La corriente transitoria de potasio I_A es activada por despolarización de la membrana (ver detalles en el capítulo 10) y debido a sus propiedades biofísicas, su influencia es más importante durante la repolarización de los potenciales de acción y durante los períodos inter-espiga. De acuerdo a trabajo previo realizado en nuestro laboratorio, durante el disparo repetitivo en ráfagas en neuronas TC, esta corriente se opone

²de la familia $Kir2$

a la activación de I_T . Esto, unido al hecho de que I_A también contribuye de manera importante al potencial de reposo ejerciendo un efecto hiperpolarizante, hace que modulaciones que produzcan un aumento en la conductancia A disminuyan la propensión a disparar ráfagas repetitivas, mientras que disminuciones en esta conductancia aumentan la propensión. La comprobación experimental de estas predicciones es difícil debido a que no existen fármacos que actúen selectivamente sobre I_A . Por esta razón, la técnica de dynamic clamp se utilizó para comprobar el aumento en la propensión al disparo periódico en ráfagas. Sin embargo, si bien se intentaron varios valores de conductancia A cercanos al valor de conductancia máxima reportado experimentalmente a diferentes valores de potencial de membrana, la reducción de I_A (inyección con signo opuesto de una corriente I_A simulada) con dynamic clamp no indujo este comportamiento en ninguna de las tres neuronas TC registradas.

Capítulo 10

Resultados computacionales: Modulación de la ganancia

Se ha postulado que la retroalimentación cortical sobre el tálamo ejerce un papel modulador de la función de transferencia de información que llevan a cabo las neuronas talamocorticales. Wolfart y colaboradores realizaron un estudio para explorar el efecto del ruido sináptico cortical (bombardeo sináptico corticotalámico) sobre la ganancia de estas neuronas. En ese estudio se pudo corroborar *in vitro* que la adición de ruido sináptico simulado (similar al que naturalmente ocurre *in vivo* durante el estado de vigilia) con dynamic clamp producía una fuerte modulación de la ganancia[32]. En este trabajo de tesis se verificaron parte de los resultados obtenidos por Wolfart y además se estudió la influencia de distintas corrientes subumbrales sobre la modulación de la ganancia.

10.1. Verificación del ruido como herramienta de modulación

En primer lugar se verificó la influencia del ruido sobre la probabilidad de disparo. Para ello se realizó el cálculo de probabilidad utilizando distintos valores de dispersión del ruido. El resultado se muestra en la figura 10.1. Se puede observar que los datos obtenidos en la simulación (puntos) coinciden de forma precisa con los valores predichos en la sección 6.3 (líneas continuas)

10.2. Ganancia en potenciales despolarizados

El disparo tónico en neuronas talamocorticales, usualmente asociado con estados de vigilia, se da a potenciales despolarizados (de alrededor de -60 mV). Las simulaciones de la presente sección fueron realizadas con un potencial de membrana $V_{rep} \simeq -60mV$

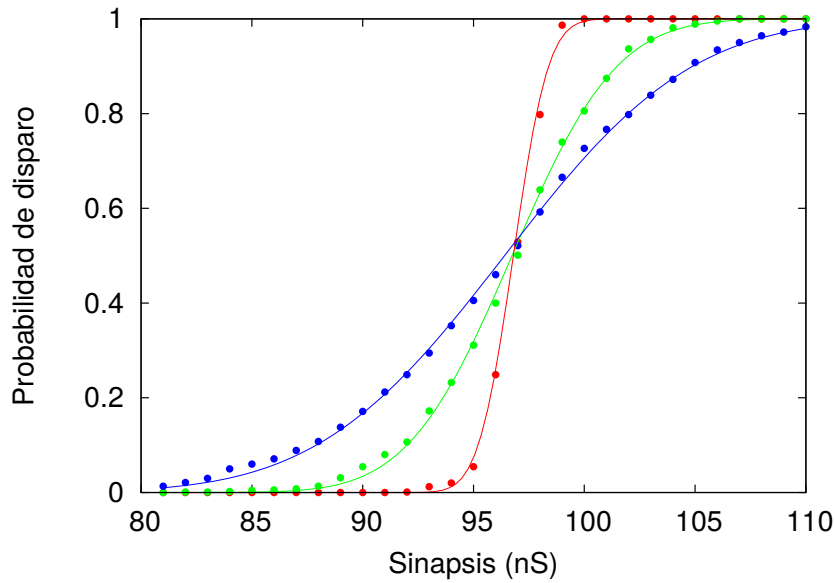


Figura 10.1: Probabilidad de disparo en función de la conductividad máxima de la sinapsis para distintos valores de dispersión del ruido (Rojo: $\sigma = 0,4nA$, Verde= $\sigma = 1,2nA$, Azul: $\sigma = 2,0nA$).

con el objetivo de estudiar la influencia del ruido y de las corrientes subumbrales sobre la ganancia en condiciones que simulan la actividad de estas neuronas cuando el animal está despierto.

10.2.1. Corrientes que influyen sobre la ganancia: I_A

La corriente de tipo A, descrita por primera vez por Connor y Stevens en 1971[46], es una corriente transitoria de potasio cuya activación se da principalmente durante la despolarización de la membrana luego de una hiperpolarización. Esta característica hace que este tipo de corriente tenga un papel muy importante en la regulación de la frecuencia de disparo repetitivo, y por lo tanto, en la codificación de información. La cinéticas de activación e inactivación relativamente rápidas hacen que esta corriente afecte de manera significativa a los EPSPs. La voltaje-dependencia de la corriente de tipo A puede ser descrita empíricamente siguiendo el modelo de Hodgking&Huxley: $g = g_{max}m^4h$ [47]. Las curvas de activación e inactivación en estado estacionario se muestran en la figura 10.2.

La actividad de la corriente de tipo A puede ser modificada por distintos mecanismos intracelulares. Por ejemplo, $g_{A,max}$ puede ser modificada mediante una regulación genética de la expresión de canales de tipo A. Por otra parte, las curvas de activación e inactivación pueden ser modificadas por la presencia de subunidades auxiliares (i.e., que se unen al canal pero que no forman parte integral del mismo), como DPPX [48]. Este tipo de mecanismos que modulan en forma dinámica la actividad de los canales tipo A sugieren que I_A reúne las condiciones necesarias para poder modular la ganancia. A continuación se estudiará la influencia de los valores de $g_{A,max}$ y desplazamientos

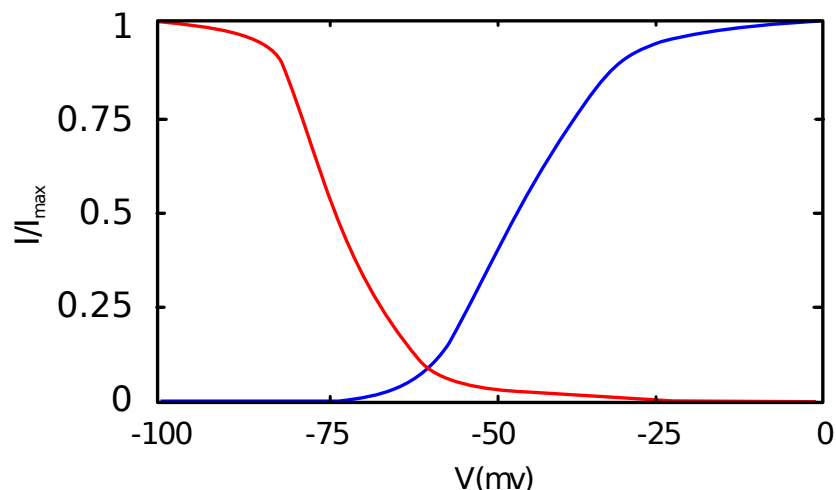


Figura 10.2: Dependencia del voltaje de la activación en estado estacionario m_∞ (azul). Dependencia del voltaje de la inactivación en estado estacionario h_∞ (rojo).

en las curvas de activación e inactivación sobre la ganancia.

Cambio en la conductancia máxima

En primer lugar, se estudió la influencia de la conductancia máxima $g_{A,max}$ sobre la ganancia. La figura 10.3 muestra los resultados obtenidos para el valor original de $g_{A,max}$ del modelo utilizado ($5,5\text{mS}/\text{cm}^2$) y dos valores por debajo de dicho valor ($3,5\text{mS}/\text{cm}^2$ y $1,5\text{mS}/\text{cm}^2$)

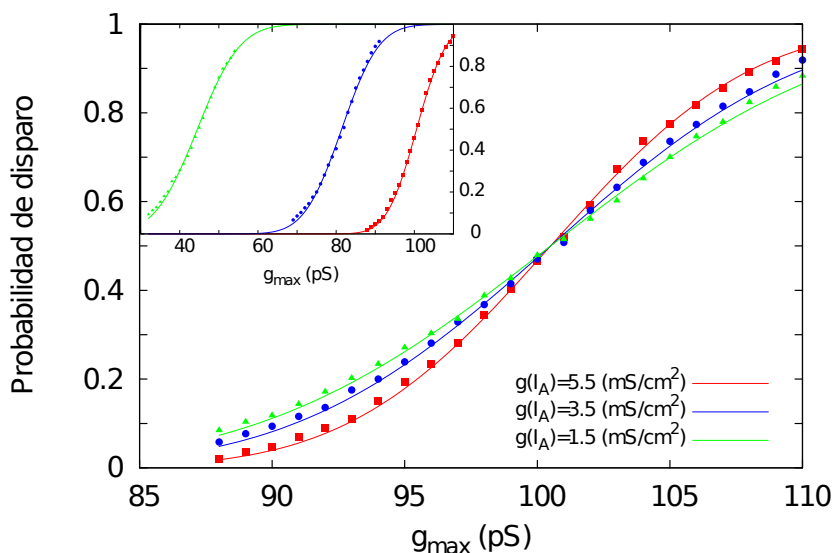


Figura 10.3: Probabilidad de disparo en función del estímulo en el cual se varió la conductancia máxima de IA. Los valores de σ obtenidos fueron: $(5,98 \pm 0,04)\text{pS}$, $(4,60 \pm 0,05)\text{pS}$ y $(3,20 \pm 0,06)\text{pS}$, para los valores de conductancia de IA de 5.5 , 3.5 y 1.5 (mS/cm^2) respectivamente. Las curvas están superpuestas (alineadas al valor medio de probabilidad de disparo) de forma que pueda apreciarse el cambio en la ganancia. Las curvas de probabilidad originales se muestran en el inserto.

Se observa un corrimiento hacia estímulos más pequeños a medida que disminuye

$g_{A,max}$, lo cual implica que la neurona se vuelve más sensible al estímulo. Al ser I_A una corriente de potasio, esta genera una hiperpolarización que se opone a la despolarización provocada por el estímulo excitatorio. Al disminuir la conductividad de I_A , disminuye esta oposición al cambio de potencial; por lo cual se necesita un estímulo de menor magnitud para alcanzar el umbral. Por otra parte, se observa una disminución en la ganancia (aumento de σ) al disminuir $g_{A,max}$. Analicemos porqué sucede esto: Debemos recordar que σ depende de la dispersión del ruido σ_{noise} y del valor de la pendiente m . Al disminuir la conductividad de I_A , disminuye la conductividad total de la membrana; esto significa que un mismo estímulo sináptico produce un cambio de potencial mayor, aumentando σ_{noise} . Por otra parte, vimos que una corriente hiperpolarizante produce una disminución en el valor de pendiente m , por lo cual al disminuir $g_{A,max}$, m aumenta. En consecuencia, si tanto σ_{noise} como m aumentan y a su vez se observa que σ también aumenta, esto implica que el cambio en $g_{A,max}$ afecta en mayor medida al comportamiento del ruido sináptico. Como conclusión, una modulación en el valor de conductancia máxima de I_A podría ser utilizado para modificar principalmente el comportamiento del ruido sináptico y de esta forma modular la ganancia.

Cambio en la curva de inactivación

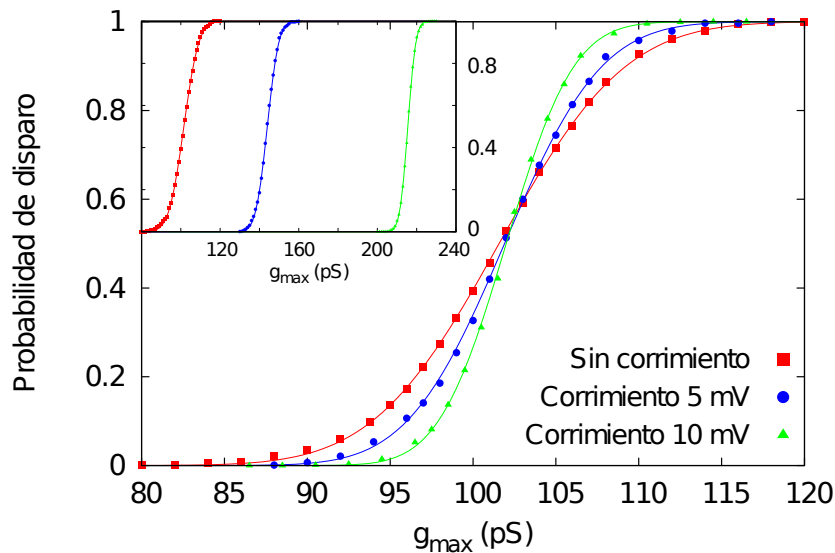


Figura 10.4: Probabilidad de disparo en función del estímulo en el cual se varió la curva de inactivación. Los valores de σ obtenidos fueron: $(5,98 \pm 0,04)$ pS para la curva original, $(4,60 \pm 0,05)$ pS para un corrimiento de 5 mV y $(3,20 \pm 0,06)$ pS para un corrimiento de 10 mV. superpuestas (alineadas al valor medio de probabilidad de disparo). Las curvas de probabilidad originales se muestran en el inserto.

En la figura 10.4 se muestran las probabilidades de disparo para un corrimiento en la curva de inactivación de la corriente de tipo A, hacia potenciales más despolarizados. Dicho corrimiento puede interpretarse como una disminución en la sensibilidad de la neurona. La ganancia, por su parte, muestra un aumento.

La disminución en la sensibilidad de la neurona puede explicarse por el aumento en la cantidad de canales de tipo A abiertos durante el EPSP, lo cual produce una mayor corriente tipo A que se opone al cambio de potencial. Por lo tanto, se necesitan estímulos más grandes para llegar al umbral. Que haya un mayor número de canales tipo A abiertos implica, a su vez, una mayor conductividad de la membrana, por lo tanto el factor σ_{noise} disminuye. Por otra parte, como se vio en la sección 6.5, al tratarse de una corriente hiperpolarizante, el valor de m también disminuye. Recordando que la ganancia fue definida como $\sigma = \sigma_{noise}/m$, se puede concluir que el efecto más importante en este caso, es la influencia de la corriente A sobre el ruido sináptico.

Cambio en ambas curvas (activación e inactivación)

Así como un desplazamiento en la curva de inactivación hacia potenciales despolarizados aumenta el número de canales abiertos, un desplazamiento de la curva de activación en el mismo sentido, tiene el efecto contrario. ¿Qué sucede entonces, al desplazar las dos curvas (activación e inactivación) simultáneamente? La figura 10.5 muestra la probabilidad de disparo para corrimientos en ambas curvas. Por una parte se observa un leve aumento en la sensibilidad de la neurona, lo que indicaría un mayor número de canales tipo A abiertos. Sin embargo, lo más significativo es la considerable disminución de la ganancia. Utilizando el modelo en NEURON, se observó que el σ_{noise} no se modifica considerablemente. Por lo tanto el cambio en la ganancia se debe principalmente a una disminución en la pendiente m . Recordemos que pendiente m indica que tanto cambia el potencial ante un cambio en la magnitud del estímulo en los valores cercanos al umbral. En conclusión, el efecto del corrimiento de ambas curvas lo que provoca es una gran influencia de la corriente de tipo A para potenciales cercanos al umbral, lo que genera la disminución en la ganancia. Este comportamiento sugiere que modificaciones en las curvas de activación e inactivación podrían ser utilizados para modular la ganancia.

10.2.2. Otras corrientes que influyen sobre la ganancia

Las neuronas TC expresan al menos cinco conductancias dependientes de voltaje que operan en el rango subumbral y que podrían tener un efecto modulador de la ganancia. En la figura 10.6 se muestra el comportamiento de la probabilidad de disparo ante cambios en la conductancia de estas corrientes. Se observa que solo el aumento o la disminución de la conductancia de la corriente tipo A tienen efecto significativo sobre la ganancia (curvas azul y verde respectivamente). Cambios en las otras conductancias producen desplazamientos hacia la derecha o la izquierda sin modificar σ . Así, las propiedades biofísicas de la corriente tipo A parecen estar óptimamente ajustadas para ejercer un efecto sobre la ganancia.

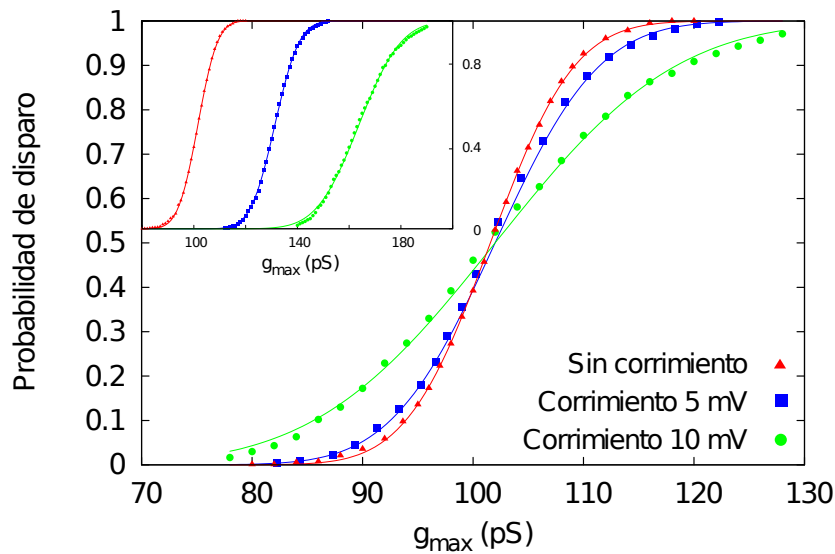


Figura 10.5: Probabilidad de disparo en función del estímulo en el cual se variaron las curvas tanto de activación como de inactivación. Los valores de σ obtenidos fueron: $5,98 \pm 0,04$ pS, $7,44 \pm 0,12$ pS y $12,8 \pm 0,2$ pS. superpuestas (alineadas al valor medio de probabilidad de disparo). Las curvas de probabilidad originales se muestran en el inserto.

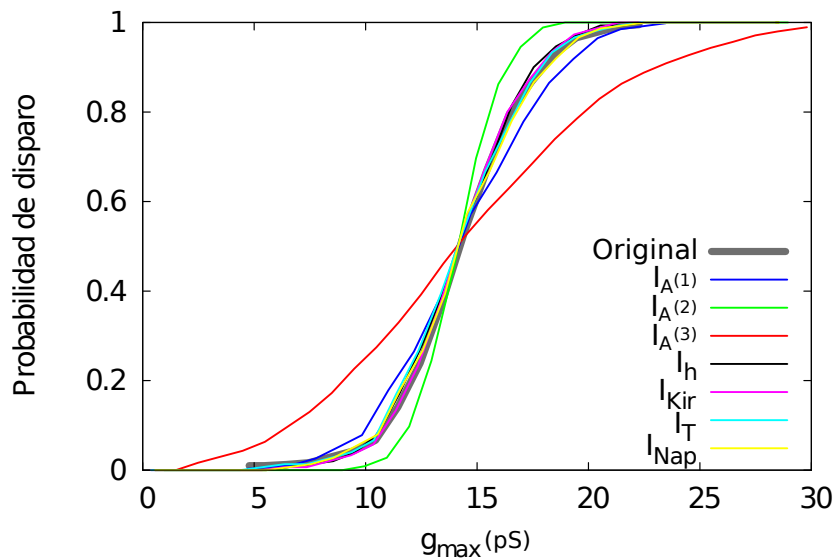


Figura 10.6: Probabilidad de disparo calculada modificando la conductancia máxima de de las corrientes I_h , I_{Kir} , I_T , I_{NaP} y I_A . Para el caso particular de I_A se muestra un aumento y una disminución en la conductividad máxima (1 y 2) y un corrimiento en las curvas de activación e inactivación (3). En Todos los casos la curva de probabilidad fue desplazada de forma tal de coincidir con el control.

10.3. Ganancia en potenciales hiperpolarizados

Para potenciales de membrana hiperpolarizados, la activación de la corriente de tipo T permite el disparo en ráfagas. Este tipo de disparo está típicamente asociado con estados de sueño profundo o de anestesia; sin embargo hay evidencia de que las ráfagas también ocurren en estados de vigilia[49][50][15] y además portan gran cantidad de información [51][52]. Al igual que para potenciales despolarizados, el número de espigas

por ráfaga podría cumplir un rol importante en la codificación de información, por lo que se realizó un estudio similar que para el caso de potenciales despolarizados. Sin embargo, en este caso no es correcto hablar de probabilidad, ya que un mismo estímulo puede provocar más de un disparo, pero si es posible calcular el número de potenciales de acción producidos por estímulo, valor que está directamente relacionado a la tasa de disparo.

La figura 10.7 muestra el cálculo del número de espigas por ráfaga (en función de la magnitud del estímulo y la frecuencia de estimulación. Para el modelo control (fig. 10.7A) se observa un aumento en la cantidad de espigas al aumentar el estímulo, pero también una fuerte dependencia en la frecuencia de disparo. Es llamativo el aumento selectivo del número espigas por ráfaga cuando se aplica un estímulo de 2 Hz (500 ms entre estímulos). Esta frecuencia coincide con la frecuencia de resonancia natural de neuronas TC[53]. En figura (10.7B) se calculó la probabilidad agregando ruido sináptico simulado. Al igual que para potenciales despolarizados, se observa una transición menos abrupta en presencia de ruido. En la figuras 10.7C y 10.7D se redujeron en un factor 2 los valores de conductancia máxima de las corrientes I_h e I_A respectivamente. Nuevamente se observa que la corriente A tiene un efecto mayor sobre la ganancia¹

¹Aunque no se exploró con más profundidad el efecto de modulaciones de I_A sobre la ganancia a potenciales hiperpolarizados, este resultado abre la puerta para futuros estudios. La importancia potencial de esta modulación se relaciona con el posible control que ejercería el tálamo sobre la información en estados de inatención. En efecto, se postula que el tálamo utiliza el disparo en ráfagas para alertar a la corteza sobre estímulos de alta relevancia conductual durante estados de inatención [?]

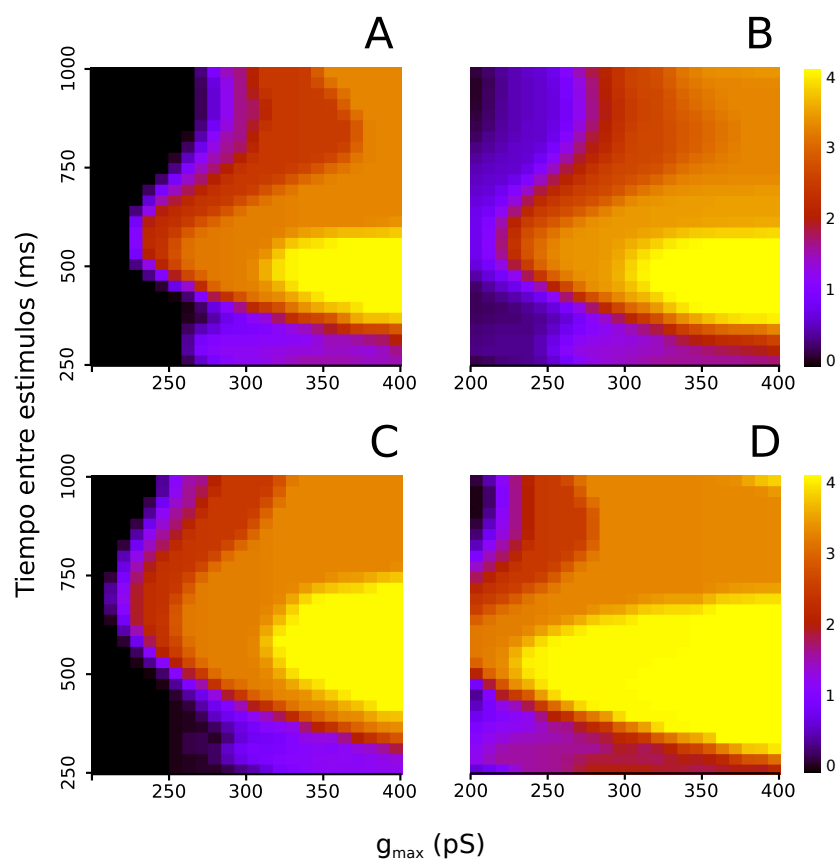


Figura 10.7: Número de espigas por ráfaga en función de la magnitud del estímulo y la frecuencia de estimulación; A: Control. B: con adición de ruido sináptico. C: reducción en un factor 2 de la conductancia máxima de I_h . D: reducción en un factor 2 de la conductancia máxima de I_A

Capítulo 11

Resultados experimentales (II): Modulación de la ganancia

Para corroborar los resultados obtenidos con el modelo computacional de neurona TC, se realizaron registros electrofisiológicos en rodajas de ratón (ver metodología en los capítulos 3 y 8). Luego de obtener la configuración *whole cell* de la técnica de patch clamp, se procedió a registrar la respuesta de la neurona a estímulos aplicados mediante dynamic clamp (conductancias sinápticas simuladas) en presencia o no de ruido. El ruido fue aplicado como un protocolo de inyección de corriente con fluctuaciones tipo ruido blanco con una desviación estándar de 1 mV. Este tipo de experimentos fueron posibles gracias a la utilización del sumador de voltaje desarrollado (ver capítulo 8) que permitió la aplicación simultánea del estímulo sináptico simulado con dynamic clamp y del protocolo ruidoso con el software de electrofisiología.

11.1. Fluctuación en la membrana

Los primeros 15 segundos (trazo rojo) de la figura 11.1 pertenecen a una medición experimental mientras que los últimos 15 segundos (trazo azul) pertenecen a una simulación utilizando parámetros similares. La figura fue dispuesta de esta forma para mostrar la fluctuación presente en la membrana real. ¿Cómo podría afectar esta fluctuación al cálculo de la probabilidad de disparo? Para responder esta pregunta se calcularon probabilidades de disparo variando en 1 mV el potencial de membrana original ($V_m = -60mV$). El resultado se muestra en la figura 11.2. Puede observarse que si bien la ganancia no cambia, se produce un desplazamiento en las curvas. Este desplazamiento se vería reflejado en una dispersión en los puntos a la hora de calcular la probabilidad de disparo experimentalmente. Por lo tanto, para el análisis de los registros experimentales, se desarrolló un algoritmo que estima el potencial en reposo de

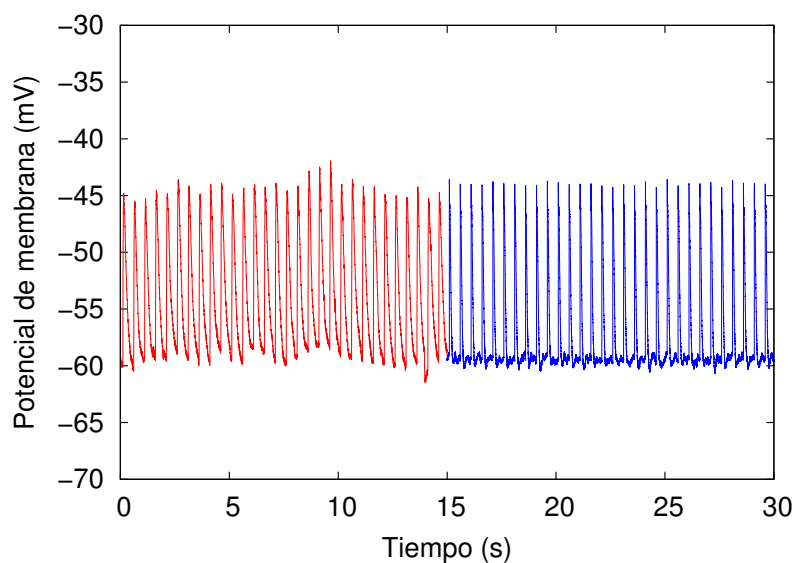


Figura 11.1: EPSP generados en una neurona real (trazo rojo, primeros 15 segundos) y en una simulación computacional (trazo azul, últimos 15 segundos). Se utilizaron parámetros similares en ambos casos, pero en la neurona real la fluctuación en la membrana es considerablemente mayor.)

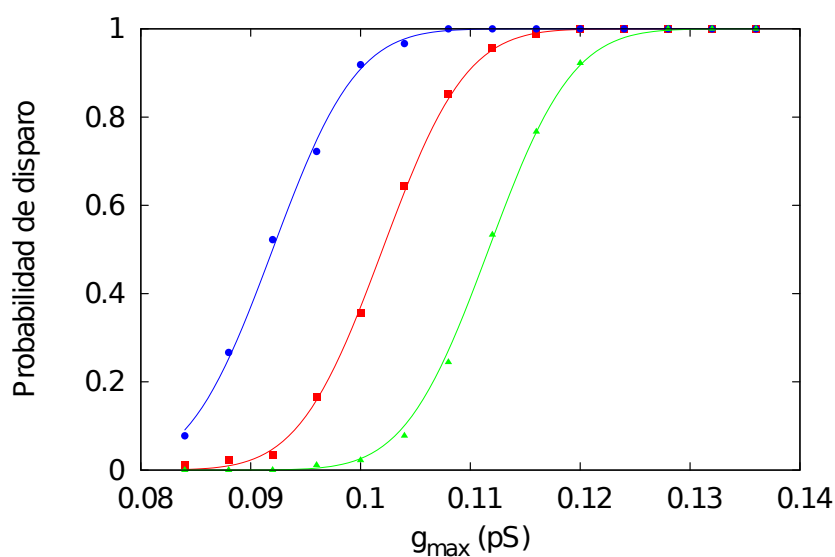


Figura 11.2: Probabilidad de disparo en función de la magnitud del estímulo para distintos valores de potencial de membrana (azul=-59 mV, rojo=-60 mV, verde=-61 mV).

la membrana ¹, y elegir solo aquellos estímulos que eran inyectados cuando el potencial en reposo se encontraba lo suficientemente próximo a $V_m = -60mV$. La figura 11.3 muestra un ejemplo de la probabilidad de disparo sin tener en cuenta esta corrección (11.3)A y teniéndola en cuenta (11.3)B). Se observa que la disminución en la dispersión de los puntos de la curva es considerable, por lo que esta corrección se realizó en todos

¹Aquí nos referimos al potencial en reposo como el potencial de membrana sin ser estimulado y sin el ruido inyectado. La presencia de una fluctuación en la membrana producida por el ruido inyectado, al ser una variable estocástica, provocaba que el valor de potencial en reposo solo se pudiera "estimar" y no "determinar"

los cálculos realizados.

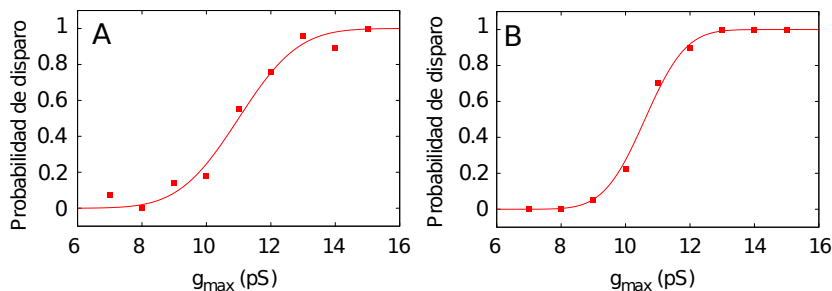


Figura 11.3: Probabilidad de disparo en función de magnitud del estímulo para una neurona TC. La figura A fue calculada promediando 240 estímulos. La figura B fue calculada tomando grupos de 40 estímulos y utilizando solo el grupo que más se acercaba a un potencial de reposo $V_{rep} = -60mV$

11.2. Ruido

Con el objetivo de verificar la influencia del ruido sobre la ganancia, se registraron tres neuronas TC en condiciones normales y luego inyectando ruido gaussiano. La figura 11.4 muestra el cálculo de probabilidad para una de las neuronas, mientras que en la tabla 11.1 se muestran los valores de σ obtenidos para las tres neuronas. En todos los casos se observa una disminución de la ganancia (aumento de sigma), resultado acorde a lo obtenido en 10.1.

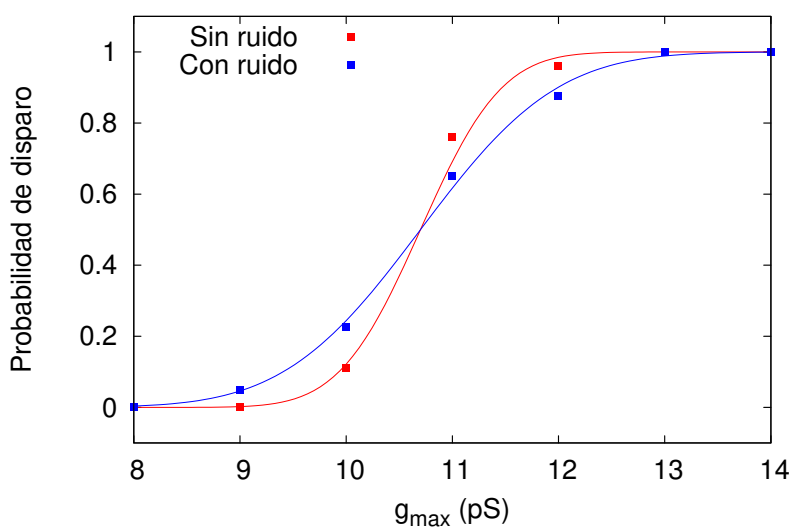


Figura 11.4: Probabilidad de disparo en función de la magnitud del estímulo para la neurona TC N° 1 en condiciones normales y ante la inyección de ruido.

Neurona TC N ^o	Ganancia sin ruido (pS)	Ganancia con ruido (pS)
1	$0,75 \pm 0,06$	$0,92 \pm 0,04$
2	$2,4 \pm 0,2$	$3,1 \pm 0,2$
3	$1,30 \pm 0,08$	$1,82 \pm 0,12$

Tabla 11.1: Ganancias calculadas para 3 neuronas TC en condiciones normales y con ruido

Neurona TC	ganancia sin I_A (pS)	Ganancia con I_A (pS)
4	$3,7 \pm 0,2$	$2,6 \pm 0,2$

Tabla 11.2: Ganancias calculada para una neurona TC con y sin I_A

11.3. I_A

La figura 11.5 muestra el cálculo de probabilidad de disparo en una neurona TC inyectando ruido y luego cambiando las curvas de activación e inactivación de los canales de I_A . La técnica de dynamic clamp en realidad no permite cambiar parámetros como la curva de activación. Sin embargo si es posible sustraer virtualmente un canal y luego volver a introducirlo con algún parámetro modificado; esta técnica fue la utilizada para desplazar las curvas de activación e inactivación. Los valores de σ obtenidos se muestran en la tabla 11.2. El aumento en la ganancia obtenido se corresponde con lo predicho en la sección. 10.2.1.

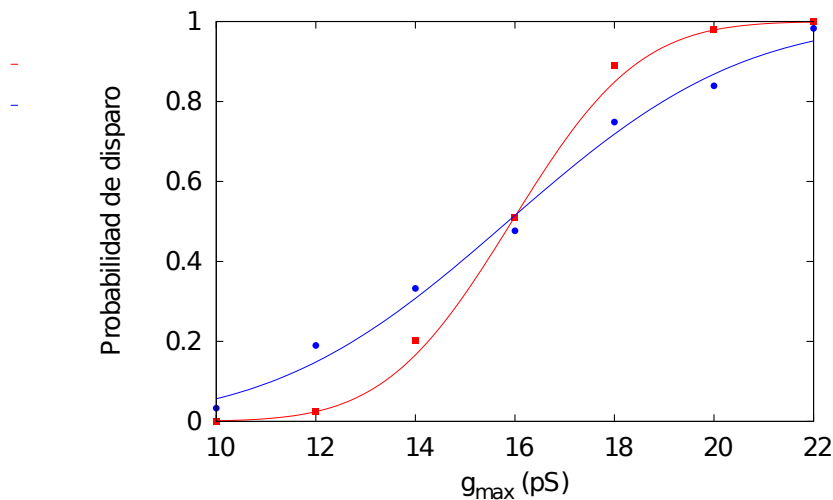


Figura 11.5: Probabilidad de disparo en función de la magnitud del estímulo para la neurona TC N^o 4 ante la modificación en las curvas de activación e inactivación de I_A (ambas curvas con inyección de ruido)

Capítulo 12

Conclusiones

Trabajos previos realizaron predicciones acerca de la influencia de distintas corrientes de bajo umbral sobre la propensión a oscilar de las neuronas talamocorticales. Se demostró que pequeños cambios en los parámetros que modelan distintas corrientes, podrían empujar al sistema oscilatorio talamocortical fuera del rango fisiológico y hacia el tipo de oscilaciones patológicas que se observan en distintos tipos de epilepsia.

En el presente trabajo se comprobó el efecto ritmogénico de I_{Kir} e I_T , induciendo el disparo repetitivo de ráfagas en neuronas talamocorticales mediante la adición de ambas corrientes utilizando dynamic clamp. Aunque previamente se ha demostrado este efecto para la adición de corriente T [41], esta es la primera vez que se demuestra el efecto ritmogénico de I_{Kir} . Esto es importante ya que la función de los canales $Kir2$ que producen esta corriente en neuronas es desconocida y ha sido poco estudiada. Por otra parte los canales tipo T y tipo h han sido involucrados en la fisiopatología de la epilepsia de ausencia[42][43][44], mientras que los tipo Kir no han sido estudiados en este contexto. Sin embargo existe evidencia que indica que el efecto de los fármacos antiausencias como la etosuximida podría ser en parte debido al bloqueo de canales $Kir2$ [45]. En el laboratorio se continuará explorando el posible papel de I_{Kir} en los mecanismos fisiopatológicos de la epilepsia de ausencia utilizando las herramientas desarrolladas en esta tesis. En particular, el sumador de voltaje desarrollado permitirá aplicar la técnica de dynamic clamp bajo protocolos complejos de estimulación como los presentados en el análisis de la ganancia de neuronas TC.

Se realizó además un estudio computacional sobre el efecto del ruido sobre neuronas TC y sobre la posible influencia de corrientes subumbrales sobre la ganancia. Se encontró que de las cinco conductancias subumbrales dependientes de voltaje que expresan la neurona TC, solamente la corriente de potasio tipo A tiene las características biofísicas adecuadas para ejercer un efecto modulador de la ganancia. El efecto principal de modificaciones en la conductancia máxima de I_A es aditivo ya que produce desplazamientos en el rango de potencial de membrana en el cual la neurona integra

información. Sin embargo, modificaciones en la voltaje dependencia de la activación y, especialmente, de la inactivación tiene un efecto multiplicativo al modificar la pendiente de la ganancia. Estos resultados demuestran por primera vez el efecto modulador de la ganancia ejercido por I_A en un modelo de neurona de vertebrados (mamíferos) y son consistentes con un estudio previo realizado en un modelo de neurona somatogástrica de langosta[54]. La relevancia de este estudio tiene que ver con el hecho de que los mecanismos moleculares que producen y regulan la ganancia en las neuronas no están claros y los resultados obtenidos son una contribución original al esclarecimiento de estos mecanismos. También se realizaron mediciones en neuronas *in vitro* para comprobar dichos resultados computacionales. Si bien el número de neuronas registradas fue muy pequeño para poder hablar de una comprobación, si podemos decir que los resultados son consistentes con las predicciones del modelo y se presentan como resultados preliminares del estudio del efecto de las conductancias subumbrales sobre la modulación de la ganancia en neuronas talamocorticales.

Bibliografía

- [1] Evolution: How yeast go multicellular. *Nature*, **517** (7536), 531–531, jan 2015. URL <http://dx.doi.org/10.1038/517531d>. 1
- [2] Schwartz, W. Helena curtis, biology. XVII und 862 s., 582 abb., 18 tab. new york 1969: Worth publ. inc. *Z Allg Mikrobiol*, **11** (4), 361–361, 1971. URL <http://dx.doi.org/10.1002/jobm.19710110417>. 1
- [3] Meinertzhagen, I. A., Okamura, Y. The larval ascidian nervous system: the chordate brain from its small beginnings. *Trends Neurosci.*, **24** (7), 401–410, Jul 2001. 1
- [4] Brown, A. G. FROM NEURON TO BRAIN: A CELLULAR APPROACH TO THE FUNCTION OF THE NERVOUS SYSTEM. by stephen w. kuffler and john g. nicholls. *Exp Physiol*, **62** (3), 287–287, jul 1977. URL <http://dx.doi.org/10.1113/expphysiol.1977.sp002400>. 2, 6, 17, 18
- [5] Izhikevich, E. Simple model of spiking neurons. *IEEE Trans. Neural Netw.*, **14** (6), 1569–1572, nov 2003. URL <http://dx.doi.org/10.1109/TNN.2003.820440>. 4, 18
- [6] Fisher, M. Lehninger principles of biochemistry, 3rd edition by david l. nelson and michael m. cox. *Chem. Educator*, **6** (1), 69–70, feb 2001. URL <http://dx.doi.org/10.1007/s00897000455a>. 5
- [7] Hodgkin AL, H. A. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *The Journal of Physiology*, **117** (4), 500–544, 1952. 9
- [8] Kullmann, D. M. Neurological channelopathies. *Annu. Rev. Neurosci.*, **33** (1), 151–172, jun 2010. URL <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-neuro-060909-153122>. 16
- [9] Bal, T., Destexhe, A. (eds.) Dynamic-Clamp. Springer Science + Business Media, 2009. URL <http://dx.doi.org/10.1007/978-0-387-89279-5>. 20

- [10] Tononi, G., Koch, C. Consciousness: here, there and everywhere? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **370** (1668), 20140167–20140167, mar 2015. URL <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2014.0167>. 23
- [11] Ward, L. M. The thalamic dynamic core theory of conscious experience. *Consciousness and Cognition*, **20** (2), 464–486, jun 2011. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.concog.2011.01.007>. 23
- [12] Sherman, S. M., Guillery, R. W. The role of the thalamus in the flow of information to the cortex. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **357** (1428), 1695–1708, dec 2002. URL <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2002.1161>. 23
- [13] Buzsáki, G. Rhythms of the Brain. Oxford University Press (OUP), 2006. URL <http://dx.doi.org/10.1093/acprof:oso/9780195301069.001.0001>. 23, 24
- [14] McCormick, D. A., Bal, T. SLEEP AND AROUSAL: Thalamocortical mechanisms. *Annu. Rev. Neurosci.*, **20** (1), 185–215, mar 1997. URL <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.neuro.20.1.185>. 23
- [15] T., B. Thalamic burst mode and inattention in the awake lgnd. *Annu. Rev. Neurosci.*, **20** (1), 185–215, Feb 2006. 24, 58
- [16] Amarillo, Y., Zaghera, E., Mato, G., Rudy, B., Nadal, M. S. The interplay of seven subthreshold conductances controls the resting membrane potential and the oscillatory behavior of thalamocortical neurons. *Journal of Neurophysiology*, **112** (2), 393–410, apr 2014. URL <http://dx.doi.org/10.1152/jn.00647.2013>. 24, 25, 37, 39, 46, 47
- [17] Huguenard, J. R., McCormick, D. A. Thalamic synchrony and dynamic regulation of global forebrain oscillations. *Trends in Neurosciences*, **30** (7), 350–356, jul 2007. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2007.05.007>. 24
- [18] Llinás, R., Paré, D. Of dreaming and wakefulness. *Neuroscience*, **44** (3), 521–535, jan 1991. URL [http://dx.doi.org/10.1016/0306-4522\(91\)90075-Y](http://dx.doi.org/10.1016/0306-4522(91)90075-Y). 24
- [19] McAlonan, K., Brown, V. J. The thalamic reticular nucleus: more than a sensory nucleus? *Neuroscientist*, **8** (4), 302–305, Aug 2002. 24
- [20] Masterton, R. A., Carney, P. W., Jackson, G. D. Cortical and thalamic resting-state functional connectivity is altered in childhood absence epilepsy. *Epilepsy Research*, **99** (3), 327–334, may 2012. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2011.12.014>. 24

- [21] Amarillo, Y., Mato, G., Nadal, M. S. Analysis of the role of the low threshold currents IT and ih in intrinsic delta oscillations of thalamocortical neurons. *Front. Comput. Neurosci.*, **9**, may 2015. URL <http://dx.doi.org/10.3389/fncom.2015.00052>. 25
- [22] Coulter, D. A., Huguenard, J. R., Prince, D. A. Calcium currents in rat thalamocortical relay neurones: kinetic properties of the transient, low-threshold current. *J. Physiol. (Lond.)*, **414**, 587–604, Jul 1989. 25
- [23] Adrian, E. D., Zotterman, Y. The impulses produced by sensory nerve-endings. *The Journal of Physiology*, **61** (2), 151–171, apr 1926. URL <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.1926.sp002281>. 27
- [24] Hillyard, S. A., Vogel, E. K., Luck, S. J. Sensory gain control (amplification) as a mechanism of selective attention: electrophysiological and neuroimaging evidence. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **353** (1373), 1257–1270, aug 1998. URL <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.1998.0281>. 32
- [25] Masson, G. L., Masson, S. R.-L., Debay, D., Bal, T. Feedback inhibition controls spike transfer in hybrid thalamic circuits. *Nature*, **417** (6891), 854–858, jun 2002. URL <http://dx.doi.org/10.1038/nature00825>. 32
- [26] Dionne, V. E. Synaptic noise. En: Membranes, Channels, and Noise, págs. 139–159. Springer Science Business Media, 1984. URL http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4684-4850-4_5. 33
- [27] Destexhe, A., Rudolph-Lilith, M. Neuronal Noise. Springer Science Business Media, 2012. URL <http://dx.doi.org/10.1007/978-0-387-79020-6>. 33
- [28] Verveen, A. Fluctuation in excitability. research report on signal transmission in nerve fibers. *Netherlands Central Institute for Brain Research*, **9**, dec 2015. 33
- [29] Kohn, A. Computer simulation of noise resulting from random synaptic activities. *Computers in Biology and Medicine*, **27** (4), 293–308, jul 1997. URL [http://dx.doi.org/10.1016/S0010-4825\(97\)00024-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0010-4825(97)00024-3). 33
- [30] Chance, F. S., Abbott, L., Reyes, A. D. Gain modulation from background synaptic input. *Neuron*, **35** (4), 773–782, aug 2002. URL [http://dx.doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00820-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00820-6). 33, 34
- [31] Fellous JM, D. A. S. T., Rudolph M. Synaptic background noise controls the input/output characteristics of single cells in an in vitro model of in vivo activity. *Neuron*, **122** (3), 811–829, 2003. 33

- [32] Wolfart, J., Debay, D., Masson, G. L., Destexhe, A., Bal, T. Synaptic background activity controls spike transfer from thalamus to cortex. *Nature Neuroscience*, **8** (12), 1760–1767, oct 2005. URL <http://dx.doi.org/10.1038/nn1591>. 33, 53
- [33] Destexhe, A. e. a. N. . . P., Okamura, Y. “FLUCTUATING SYNAPTIC CONDUCTANCES RECREATE IN VIVO-LIKE ACTIVITY IN NEOCORTICAL NEURONS.”. *Neuroscience*, **10** (7), 13–24, 2001. 33, 34
- [34] Béhuret, S., Deleuze, C., Bal, T. Corticothalamic synaptic noise as a mechanism for selective attention in thalamic neurons. *Frontiers in Neural Circuits*, **9**, dec 2015. URL <http://dx.doi.org/10.3389/fncir.2015.00080>. 33
- [35] Carnevale, N. T., Hines, M. L. The NEURON Book. Cambridge University Press (CUP), 2006. URL <http://dx.doi.org/10.1017/CB09780511541612>. 37, 46
- [36] Nowotny, T. Stdpc 2011. En: Manual. Centre for Computational Neuroscience and Robotics, 2011. 46
- [37] Destexhe, A. e. a. “Synthesis of Models for Excitable Membranes, Synaptic Transmission and Neuromodulation Using a Common Kinetic Formalism”. *Journal of computational Neuroscience*, **1** (1), 195–230, 1994. 46
- [38] Lee, J., Kim, D., Shin, H.-S. Lack of delta waves and sleep disturbances during non-rapid eye movement sleep in mice lacking α 1g-subunit of t-type calcium channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **101** (52), 18195–18199, dec 2004. URL <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0408089101>. 47
- [39] Rush, M. E., Rinzal, J. Analysis of bursting in a thalamic neuron model. *Biological cybernetics*, **71** (4), 281–291, 1994. 47
- [40] McCormick, D. A., Huguenard, J. R. A model of the electrophysiological properties of thalamocortical relay neurons. *Journal of Neurophysiology*, **68** (4), 1384–1400, 1992. 47
- [41] Hughes, S. W., Lörincz, M., Cope, D. W., Crunelli, V. Using the dynamic clamp to dissect the properties and mechanisms of intrinsic thalamic oscillations. En: Dynamic-Clamp, págs. 321–345. Springer, 2009. 47, 65
- [42] Noebels, J. L. The voltage-gated calcium channel and absence epilepsy, 2012. 50, 65
- [43] Budde, T., Caputi, L., Kanyshkova, T., Staak, R., Abrahamczik, C., Munsch, T., *et al.* Impaired regulation of thalamic pacemaker channels through an imbalance of subunit expression in absence epilepsy. *The Journal of neuroscience*, **25** (43), 9871–9882, 2005. 50, 65

- [44] Ludwig, A., Budde, T., Stieber, J., Moosmang, S., Wahl, C., Holthoff, K., *et al.* Absence epilepsy and sinus dysrhythmia in mice lacking the pacemaker channel *hcn2*. *The EMBO journal*, **22** (2), 216–224, 2003. [50](#), [65](#)
- [45] Huang, C.-W., Kuo, C.-C. Flow-and voltage-dependent blocking effect of ethoximide on the inward rectifier k⁺ (*kir2. 1*) channel. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, **467** (8), 1733–1746, 2015. [50](#), [65](#)
- [46] Connor, J. A., Stevens, C. F. Voltage clamp studies of a transient outward membrane current in gastropod neural somata. *The Journal of Physiology*, **213**, 21–30, 1971. [54](#)
- [47] Connor, J. A., Stevens, C. F. Prediction of repetitive firing behaviour from voltage clamp data on an isolated neurone soma. *The Journal of Physiology*, **213**, 31–53, 1971. [54](#)
- [48] Nadal, M. S., Ozaita, A., Amarillo, Y., de Miera, E. V.-S., Ma, Y., Mo, W., *et al.* The CD26-related dipeptidyl aminopeptidase-like protein DPPX is a critical component of neuronal a-type k channels. *Neuron*, **37** (3), 449–461, feb 2003. URL [http://dx.doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)01185-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0896-6273(02)01185-6). [54](#)
- [49] RAMCHARAN, E. J., GNADT, J. W., Sherman, S. M. Burst and tonic firing in thalamic cells of unanesthetized, behaving monkeys. *Visual neuroscience*, **17** (01), 55–62, 2000. [58](#)
- [50] Fanselow, E. E., Sameshima, K., Baccala, L. A., Nicolelis, M. A. Thalamic bursting in rats during different awake behavioral states. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **98** (26), 15330–15335, 2001. [58](#)
- [51] Elijah, D. H., Samengo, I., Montemurro, M. A. Thalamic neuron models encode stimulus information by burst-size modulation. *Frontiers in computational neuroscience*, **9**, 2015. [58](#)
- [52] Reinagel, P., Godwin, D., Sherman, S. M., Koch, C. Encoding of visual information by lgn bursts. *Journal of neurophysiology*, **81** (5), 2558–2569, 1999. [58](#)
- [53] Puil, E., Meiri, H., Yarom, Y. Resonant behavior and frequency preferences of thalamic neurons. *Journal of neurophysiology*, **71** (2), 575–582, 1994. [59](#)
- [54] Patel, A. X., Murphy, N., Burdakov, D. Tuning low-voltage-activated a-current for silent gain modulation. *Neural computation*, **24** (12), 3181–3190, 2012. [66](#)

Agradecimientos

A Yimy y a marcela, a Horacio y a todos los que aportaron algo a esta tesis, ya sea académico o mágico.

