



**Universidad Nacional del Comahue Centro Regional Universitario Bariloche**

**Propiedades intrínsecas y sinápticas de neuronas  
talamocorticales y su función en la generación de oscilaciones  
fisiológicas y patológicas**

**Trabajo de Tesis para optar al Título de Doctor en Biología**

**Angela Isabel Tissone**

**Doctoranda**

**Yimy Amarillo**

**Director**

**Marcela Nadal**

**Co-directora**

**2022**



*Para Ana María 27 de Agosto*

# Índice de contenidos

Índice de contenidos.....	iv
Índice de figuras.....	vii
Índice de tablas.....	x
Resumen.....	xi
Abstract.....	xii
Capítulo 1.....	13
1. Introducción.....	13
1.1 Fisiología de los canales iónicos.....	13
1.1.1 Corrientes iónicas.....	14
1.1.2 Potencial de membrana en reposo.....	16
1.1.3 Conductancia iónica.....	17
1.1.4 Células excitables y el modelo de Hodgkin-Huxley.....	18
1.1.5 El potencial de acción.....	21
1.2 El Tálamo.....	24
1.2.1 Los núcleos del Tálamo.....	24
1.3 El circuito talamocortical.....	25
1.3.1 Neuronas del tálamo.....	27
1.4 Propiedades intrínsecas de las neuronas talamocorticales.....	27
1.4.1 Respuesta eléctrica.....	27
1.4.2 Disparo tónico.....	28
1.4.3 Disparo en ráfagas.....	29
1.4.4 Ráfagas repetitivas.....	30
1.4.5 Modulación del disparo en ráfagas repetitivas.....	30
1.4.6 Potencial de membrana en reposo de neuronas TC.....	32
1.5 Oscilaciones.....	33
1.5.1 Oscilaciones del circuito talamocortical.....	33
1.5.2 Oscilaciones del potencial de membrana en neuronas TC.....	33
1.5.2 Oscilaciones del CTC y el procesamiento de información sensorial.....	34
1.5.3 Oscilaciones del CTC y los ritmos del sueño.....	35
1.5.4 Ondas lentas.....	35
1.5.5 Husos del sueño ( <i>Spindles</i> ).....	39
1.5.6 Ondas delta.....	42
1.6 Epilepsia de ausencia.....	44
1.6.1 Descripción general de la enfermedad.....	44

1.6.2 Bases neuronales de la epilepsia de ausencia.....	45
1.6.3 <i>Spindles</i> aberrantes.....	46
1.6.4 Ondas delta.....	48
1.7 Objetivos de la tesis.....	50
Capítulo 2.....	51
2. Introducción.....	51
2.1 Breve introducción a la teoría de Sistemas Dinámicos.....	51
2.1.1 Diagramas de fases y de bifurcaciones para SD 2D.....	59
2.1.2 Características en la dinámica neuronal según el tipo de bifurcación.....	66
2.2 Métodos.....	70
2.2.1 Parte teórica.....	70
2.2.2 Parte experimental.....	72
2.3 Resultados.....	74
2.3.1 $I_{Kir}$ induce biestabilidad en el potencial de membrana.....	74
2.3.2 La interacción de $I_{Kir}$ con $I_h$ genera oscilaciones en un modelo mínimo.....	75
.....	82
2.3.3 $I_{Kir}$ promueve las oscilaciones en el modelo $I_T$ - $I_h$ - $I_{Kir}$ -Leaks.....	82
2.3.4 Sin pendiente negativa $I_{Kir}$ no puede actuar como marcapaso de las oscilaciones.....	84
2.3.5 El aumento de $I_{Kir}$ promueve oscilaciones en neuronas talamocorticales de ratón.....	88
2.3.6 Rol de $I_{Kir}$ en el comportamiento oscilatorio.....	90
2.4 Discusión.....	91
Capítulo 3.....	95
3.1 Introducción.....	96
3.1.1 Resonancia.....	96
3.1.2 Corrientes resonadoras y amplificadoras.....	99
3.1.3 Resonancia en neuronas TC.....	102
3.2 Métodos.....	104
3.2.1 Parte experimental.....	104
3.2.2 Modelo computacional.....	106
3.3 Resultados.....	108
3.3.1 Caracterización de la resonancia.....	108
3.3.2 Contribución de $I_T$ a la resonancia de neuronas TC.....	115
3.3.3 Contribución de $I_h$ a la resonancia de neuronas TC.....	118
3.3.4 Contribución de $I_{Kir}$ en la resonancia de neuronas TC.....	122
3.3.5 Estudio teórico de la resonancia en neuronas TC.....	127
3.4 Discusión.....	138
Capítulo 4.....	143

4.1	Introducción .....	143
4.1.1	Las dendritas como entidades pasivas y activas.....	144
4.1.2	Influencia de las propiedades pasivas en la integración sináptica .....	144
4.1.3	Sumación temporal y espacial.....	147
4.1.4	Influencia de las propiedades activas en la integración sináptica .....	148
4.1.5	Propagación retrógrada del potencial de acción.....	149
4.1.6	Conducción de señales en dendritas de neuronas TC.....	150
4.1.7	Impacto de la distribución espacial de canales iónicos en neuronas TC.....	153
4.2	Primera parte: interacción de las propiedades intrínsecas que favorecen el disparo en ráfagas .....	157
4.2.1	Métodos.....	157
4.2.2	Resultados .....	161
4.2.3	Discusión.....	169
4.3	Segunda parte: interacción de las conductancias sinápticas en el modo de disparo ....	170
4.3.1	Métodos.....	172
4.3.2	Resultados .....	174
4.3.3	Discusión.....	180
4.4	Tercera parte: interacción de los inputs sinápticos y las propiedades intrínsecas que favorecen la generación de ráfagas. ....	182
4.4.1	Métodos.....	183
4.4.2	Resultados .....	189
Capítulo 5	.....	201
5.1	Introducción .....	201
5.2	Métodos.....	202
5.3	Resultados .....	203
5.4	Discusión.....	206
Capítulo 6	.....	207
6.	Conclusiones .....	207
Apendice.....		210
AI.	Modelo de conductancias iónicas .....	210
AII.	Modelo C .....	216
Bibliografía.....		234
Publicaciones asociadas .....		244
Agradecimientos.....		245
Artículo de respaldo .....		246

## Índice de figuras

Figura 1.1. Distribución desigual de la concentración de iones en el interior y exterior de una neurona.....	17
Figura 1.2. Modelo HH.....	20
Figura 1.3. Potencial de acción del modelo HH.....	23
Figura 1.4. El tálamo.....	25
Figura 1.5. Esquema simplificado del circuito talamocortical.....	26
Figura 1.6. Modos de disparo de las neuronas TC.....	28
Figura 1.7. Simulación de la contribución relativa de las corrientes iónicas durante las oscilaciones del Vm.....	31
Figura 1.8. Contribución relativa de las siete corrientes iónicas al Vmr.....	32
Figura 1.9. EEG y oscilaciones del Vm durante el ritmo lento.....	38
Figura 1.10. Mecanismos iónicos de las oscilaciones lentas.....	39
Figura 1.11 Esquema talámico de la generación de oscilaciones tipo spindles.....	42
Figura 1.12. EEG y oscilaciones del Vm durante el ritmo delta.....	43
Figura 1.13. Similitudes entre los ritmos spindles y SWDs.....	47
Figura 1.14. El ratón KO de IT es resistente a la inducción de epilepsia de ausencia.....	49
Figura 2.1. Respuesta del modelo $I_{NaP}$ - $I_K$ - $I_{leaks}$ .....	54
Figura 2.2. Bifurcaciones que llevan al SD neuronal a la transición de su estado de reposo al comportamiento oscilatorio.....	58
Figura.2.3. Diagrama de fases del modelo $I_{NaP}$ - $I_K$ - $I_{leaks}$ .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Figura 2.4. Diagrama de fases modelo mínimo IT-Leaks.....	64
Figura 2.5. Modelo $I_T$ -Leaks.....	66
Figura 2.6. Características de la excitabilidad de las neuronas según el tipo de bifurcación que presentan en la transición del reposo al estado excitable.....	68
Figura 2.7. $I_{Kir}$ induce biestabilidad en el Vm.....	75
Figura 2.8. La interacción de $I_{Kir}$ e $I_h$ induce oscilaciones subumbrales.....	77
Figura 2.9. El modelo $I_h$ - $I_{Kir}$ -Leak transita bifurcaciones de Hopf supercríticas cuando I es el parámetro de bifurcación.....	78
Figura 2.10. La articulación de las características biofísicas de $I_{Kir}$ e $I_h$ permiten las oscilaciones del Vm.....	80
Figura 2.11. Características del modelo $I_h$ - $I_{Kir}$ -Leak con $\bar{g}_K$ leak como parámetro de bifurcación.....	82
Figura 2.12. Efecto de $I_{Kir}$ en la dinámica del modelo $I_T$ - $I_h$ - $I_{Kir}$ -Leaks.....	84
Figura 2.13. $I_{Kir}$ amplifica las oscilaciones sub-umbrales debido a la región de pendiente negativa.....	87
Figura 2.14. El aumento de $d\bar{g}_{Kir}$ induce oscilaciones periódicas en neuronas TC.....	89

Figura 2.15. Rol de $I_{Kir}$ en el comportamiento oscilatorio de un modelo de neurona TC.....	91
Figura 3.1. Características de $Z(f)$ en modelos resonantes .....	98
Figura 3.2. Propiedades biofísicas de corrientes con potencial de resonadoras y amplificadoras .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Figura 3.3. Esquema de la interacción entre las siete conductancias sub-umbrales que generan un comportamiento oscilatorio y establecen el $V_{mr}$ en neuronas TC.....	103
Figura 3.4. Resonancia en neuronas TC con una ZAP de 10Hz .....	109
Figura 3.5. Resonancia en neuronas TC con una ZAP de 5Hz .....	110
Figura 3.6. Cambios en la resonancia con el $V_m$ .....	112
Figura 3.7. Diversidad de la respuesta eléctrica en neuronas TC.....	114
Figura 3.8. TTAP2 bloquea IT y los LTS .....	116
Figura 3.9. Efecto de IT en la resonancia.....	117
Figura 3.10. ZD bloquea $I_h$ y la respuesta “sag”. .....	119
Figura 3.11. Impacto de $I_h$ en la resonancia.....	121
Figura 3.12. Bajas concentraciones de $Ba^{++}$ bloquean $I_{Kir}$ .....	123
Figura 3.13 $I_{Kir}$ amplifica la resonancia .....	124
Figura 3.14. $d\bar{g}_{Kir}$ recupera la amplificación de la resonancia mediada por $I_{Kir}$ .....	125
Figura 3.15. El incremento de $I_{Kir}$ mediante $d\bar{g}_{Kir}$ aumenta la amplificación de la resonancia en neuronas TC .....	126
Figura 3.16. Comportamiento resonante en el modelo simplificado .....	128
Figura 3.17. IT genera resonancia en un modelo mínimo.....	131
Figura 3.18. Impacto de $I_h$ en la resonancia de un modelo mínimo .....	134
Figura 3.19. $I_{Kir}$ amplifica la resonancia debido a su región de pendiente negativa .....	136
Figura 3.20. Mecanismo de amplificación de la resonancia mediado por $I_{Kir}$ .....	138
Figura 4.1. Dependencia teórica de las propiedades pasivas y morfológicas en la integración sináptica.....	146
Figura 4.2. Sumación espacial y temporal de EPSP en un modelo neuronal.....	148
Figura 4.3. Propiedades eléctricas de las dendritas de las neuronas TC .....	152
Figura 4.4. La producción de ráfagas requiere una alta expresión de canales T en dendritas distales.....	155
Figura 4.5. Modelo de neurona TC con morfología realista .....	159
Figura 4.6. Esquema del modelo teórico de neurona TC .....	160
Figura 4.7. Respuesta del modelo ante cambios del valor y de la distribución espacial de $PT_{max}$ .....	163
Figura 4.8. Espacio de modelos que sostienen una respuesta de ráfagas repetitivas .....	166
Figura 4.9. Impacto del área dendrítica en el espacio de parámetros.....	167
Figura 4.10. Límites del espacio de parámetros en el modelo multicompartimental.....	168
Figura 4.11. Esquema de las posibles conexiones entre la capa VI de la corteza y las neuronas del tálamo .....	171



Figura 4.12. Esquema del modelo parte dos .....	172
Figura 4.13. Frecuencia de eventos sinápticos .....	175
Figura 4.14. Impacto de los inputs sinápticos en la respuesta del modelo.....	176
Figura 4.15. Mapas de estimulación sináptica versus número de potenciales de acción.....	178
Figura 4.16. Mapas de estimulación sináptica versus número de potenciales de acción.....	180
Figura 4.17. Características de la activación de rGABAB.....	184
Figura 4.18. Simulación del input del nRT .....	187
Figura 4.19. Respuesta en voltaje del modelo ante diferentes características en la estimulación sináptica.....	191
Figura 4.20. Correlación cruzada inputs nRt versus Vm .....	192
Figura 4.21. Impacto de las propiedades intrínsecas del modelo sobre el pico de crc.....	194
Figura 4.22. Impacto de la cinética de activación de Ih en la crc .....	196
Figura 4.23. Vm versus input nRT .....	197
Figura 5.1. Respuesta eléctrica ante la presencia de ETX. ....	205

## Índice de tablas

Tabla 2.1. Resonantes versus integradoras .....	69
Tabla 3.1. Resonantes versus no resonantes .....	115

## Resumen

Las propiedades de membrana de las neuronas talamocorticales combinadas con la arquitectura de conexiones sinápticas recíprocas del circuito talamocortical dan lugar a la actividad oscilatoria que subyace a la generación de ritmos cerebrales globales. Estos comprenden oscilaciones fisiológicas como los ritmos del sueño, o patológicas como los complejos espiga-onda característicos de eventos epilépticos. A nivel celular, el disparo repetitivo de ráfagas por parte de las neuronas talamocorticales acompaña a estas oscilaciones globales. Por otro lado, desregulaciones en los canales iónicos involucrados en el control y generación de este modo de disparo producen alteraciones tanto de los ritmos fisiológicos como en el comportamiento. Dada esta estrecha relación entre las propiedades intrínsecas de las neuronas talamocorticales y el comportamiento oscilatorio del circuito talamocortical, en esta tesis realizamos un estudio sistemático de la interacción entre las corrientes iónicas sub-umbrales que las neuronas talamocorticales expresan y su comportamiento oscilatorio sub-umbral. Evaluamos qué características potencian su comportamiento oscilatorio, ya sea a través de modificaciones en sus canales iónicos, modificaciones en sus inputs sinápticos, o a través de una combinación de ambos.

Empleando modelos matemáticos que describen la biofísica de las corrientes iónicas sub-umbrales, mostramos mediante simulaciones computacionales que diferentes combinaciones de estas corrientes pueden generar y sostener oscilaciones periódicas. En particular, en estos estudios teóricos, encontramos que el aumento en la densidad de una corriente de potasio, la corriente Kir, puede inducir oscilaciones espontáneas. También demostramos mediante el uso de técnicas híbridas computacionales y experimentales que el aumento de esta corriente induce el disparo de ráfagas repetitivas en neuronas talamocorticales reales. En otro estudio, encontramos que las neuronas talamocorticales de los núcleos ventro basales de ratón responden de forma potenciada a una frecuencia de estímulos determinada, y que este fenómeno, conocido como resonancia, es amplificado por la corriente Kir. Este estudio es la primera demostración experimental de la habilidad de una corriente hiperpolarizante para amplificar la resonancia. Por último, desarrollamos un modelo teórico que relaciona las propiedades intrínsecas de la neurona talamocortical con sus aferencias sinápticas de la corteza y el núcleo reticular del tálamo. En este estudio exploramos el efecto del input sináptico inhibitorio proveniente de las neuronas retículo talámicas sobre la actividad oscilatoria de una neurona talamocortical sujeta al continuo bombardeo sináptico excitatorio proveniente de la corteza. Los resultados muestran las condiciones de estimulación y las condiciones iónicas intrínsecas de la neurona que favorecen la correlación entre la señal de entrada y la respuesta del potencial de membrana de la neurona talamocortical.

**Palabras clave:** OSCILACIONES, DISPARO REPETITIVO DE RÁFAGAS, CORRIENTES IÓNICAS.

## Abstract

The membrane properties of thalamocortical neurons combined with the architecture of reciprocal synaptic connections of the thalamocortical circuitry give rise to the oscillatory activity that underlies the generation of global brain rhythms. These include physiological oscillations such as sleep rhythms, or pathological oscillations such as the spike-wave complexes characteristic of epileptic events. At the cellular level, repetitive burst firing by thalamocortical neurons accompanies these global oscillations. On the other hand, deregulations in the ion channels involved in the control and generation of this firing mode produce alterations in both physiological rhythms and behavior. Given this close relationship between the intrinsic properties of thalamocortical neurons and the oscillatory behavior of the thalamocortical circuit, in this thesis we perform a systematic study of the interaction between the subthreshold ionic currents that thalamocortical neurons express and their subthreshold oscillatory behavior. We evaluate which features enhance their oscillatory behavior, either through modifications in their ion channels, modifications in their synaptic inputs, or through a combination of both.

Using mathematical models that describe the biophysics of subthreshold ionic currents, we show through computational simulations that different combinations of these currents can generate and sustain periodic oscillations. In particular, we found, in these theoretical studies, that the increase in the density of a potassium current, the Kir current, can induce spontaneous oscillations. We also show by using hybrid computational and experimental techniques that increasing this current induces the firing of repetitive bursts in real thalamocortical neurons. In another study, we found that the thalamocortical neurons of the mouse ventrobasal nuclei respond in an enhanced way to a given frequency of stimuli, and that this phenomenon, known as resonance, is amplified by the Kir current. This study is the first experimental demonstration of the ability of a hyperpolarizing current to amplify resonance. Finally, we develop a theoretical model that relates the intrinsic properties of the thalamocortical neuron to its synaptic input from the cortex and reticular nucleus of the thalamus. In this study we explore the effect of inhibitory synaptic input from reticulothalamic neurons on the oscillatory activity of a thalamocortical neuron subjected to continuous excitatory synaptic bombardment from the cortex. The results show the stimulation conditions and the intrinsic ionic conditions of the neuron that favor the correlation between the input signal and the response of the membrane potential of the thalamocortical neuron.

**Keywords:** OSCILLATIONS; REPETITIVE BURST FIRING, IONIC CURRENTS.

# Capítulo 1

## 1. Introducción

Esta tesis abordará un estudio de la interacción entre las corrientes iónicas sub-umbrales que las neuronas talamocorticales expresan y las oscilaciones sub-umbrales que producen; ya sea de forma intrínseca o debido a las entradas sinápticas que reciben a través del circuito talamocortical. Haciendo uso de la electrofisiología, del modelado teórico y de la teoría de sistemas dinámicos. El capítulo 1 se divide en dos grandes secciones, comienza con las características generales de la fisiología y la biofísica de los canales iónicos que considero relevantes para abordar el siguiente trabajo; continuando con una breve introducción al tálamo, al circuito talamocortical, a las oscilaciones fisiológicas y patológicas que este presenta y a las características de las neuronas del circuito, con un énfasis en las neuronas talamocorticales. Luego, los siguientes capítulos tiene un orden de complejidad en cuanto al modelo de estudio. En el capítulo 2 se presenta un estudio del comportamiento oscilatorio intrínseco de las neuronas talamocorticales y en el capítulo 3 estudiaremos la respuesta preferencial de las neuronas talamocorticales de acuerdo a la frecuencia de las oscilaciones sub-umbrales. En el capítulo 4 se muestra un estudio teórico de la interacción entre las corrientes iónicas sub-umbrales de las neuronas talamocorticales y sus aferencias sinápticas. Por último, el capítulo 5 muestra un estudio piloto experimental donde se estudió parcialmente el efecto de un agente anticonvulsivante (anti-crisis epiléptica) sobre las corrientes iónicas sub-umbrales de las neuronas talamocorticales.

### 1.1 Fisiología de los canales iónicos

Los iones no atraviesan por sí solos la membrana plasmática de las células; para hacerlo necesitan de caminos que conecten el exterior celular con su interior; estos caminos pueden ser moléculas transportadoras o canales iónicos. Los transportadores iónicos involucran procesos catalíticos y acarrear un bajo número de iones. Por el contrario los canales iónicos involucran un alto flujo de iones que pueden entrar o salir de las células (aproximadamente  $10^6$  iones por segundo), generando corrientes iónicas cuya función

incluye el establecimiento del potencial de membrana en reposo de las células; generar y dar forma a la propagación de las señales eléctricas en células excitables y la transmisión de señales intracelulares mediadas por la entrada de  $\text{Ca}^{++}$  a las células, la cual induce un amplio rango de mecanismos tales como la contracción muscular, la liberación de hormonas y neurotransmisores, o la expresión genética; etc. En resumen, los canales iónicos están involucrados en cada pensamiento, cada percepción, cada movimiento, e incluso en cada latido del corazón <sup>1</sup>.

Los canales iónicos son macro-moléculas constituidas por diferentes cadenas polipeptídicas formando un poro acuoso que atraviesa la membrana, constituyendo caminos transmembranales para los iones. Expresados en la membrana plasmática de todas las células, procariotas y eucariotas, los canales iónicos fluctúan de forma aleatoria entre el estado abierto y cerrado, y responden cambiando la probabilidad de adoptar alguno de estos estados, a diferentes tipos de estímulo tales como cambios en el potencial eléctrico a través de la membrana o la unión de un ligando extracelular o intracelular. Varios tipos de canales iónicos son selectivos a una especie iónica. Esta selectividad es debida a la presencia de una región especial de la proteína situada en el poro que actúa como filtro que selecciona los iones por su tamaño o por su estructura molecular. La permeabilidad, por otra parte, es una importante propiedad intrínseca del canal que representa la facilidad con la cual un ion particular puede pasar a través de él.

Hay canales activados por voltaje (cambios en el potencial de membrana), activados por ligando, activados por segundos mensajeros y activados por fuerzas (mecanismos que distorsionan la membrana). Pudiendo un tipo de canal ser sensible a más de una forma de activación.

### **1.1.1 Corrientes iónicas**

La corriente iónica ( $I$ ) que produce un determinado canal ( $i$ ) es la medida de que tan rápido los iones se mueven a través de él y depende de la permeabilidad, concentración y fuerza impulsora “*driving-force*” para el flujo de ese ion a través del canal. El flujo de iones

a través de canales iónicos involucra principalmente cuatro especies iónicas: sodio ( $\text{Na}^+$ ), potasio ( $\text{K}^+$ ), cloro ( $\text{Cl}^-$ ) y calcio ( $\text{Ca}^{++}$ ). Cada especie de ion permeante está sujeto a dos gradientes separados que tienden a conducirlo al interior y/o al exterior celular; estos son: un gradiente de concentración y un gradiente eléctrico (ver figura 1.1A). El gradiente de concentración se produce por la diferencia de concentraciones iónicas entre el interior y el exterior celular, que se deben principalmente a la diferencia de permeabilidad de la membrana para cada ion. El gradiente eléctrico se debe a la presencia de macromoléculas cargadas negativamente en el citosol que no pueden atravesar la membrana plasmática, haciendo que el interior de la célula sea más negativo que el exterior, generando así una diferencia de potencial o voltaje a través de la membrana, que atrae o repele los iones por sus cargas eléctricas. Por último, la fuerza impulsora para cada ion permeante depende del gradiente de concentración y del gradiente eléctrico, y se define cómo la diferencia entre el potencial de membrana ( $V_m$ ) en que se halle la célula y el potencial de equilibrio o de reversión del ion particular ( $E_i$ ); mientras más grande sea esta diferencia más grande será la fuerza impulsora para el ion en cuestión y mayor la corriente  $I$  que circula por el canal. Por el contrario, cuanto más cercano sea el  $V_m$  al  $E_i$ , menor va a ser la fuerza que impulse al ion a través del canal y por ende menor la corriente que circule por él.

Una forma experimental de medir la corriente iónica es empleando la técnica de *voltage clamp*, ya sea con dos electrodos o con *patch clamp*<sup>2</sup>. En la técnica con dos electrodos se utiliza un electrodo para inyectar corriente y otro para leer el potencial, ambos insertos en la célula y, mediante un mecanismo de retroalimentación, es posible mantener el potencial de membrana en un valor fijado a voluntad. La corriente necesaria para mantener el potencial en ese valor es equivalente a la corriente iónica que fluye a través de la membrana, la cual es nuestra variable de interés. Con la técnica de *patch clamp* es posible medir la corriente iónica a través de un único canal (o muy pocos canales) presente en un parche de membrana sellado a la punta de una micro-pipeta o registrar la actividad de todos los canales que una célula expresa (modo *whole cell*).

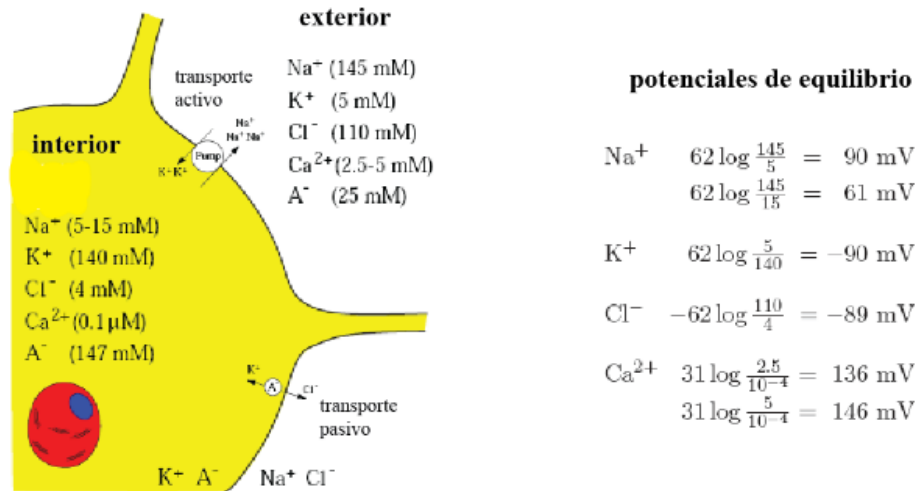
### 1.1.2 Potencial de membrana en reposo

La distribución desigual de iones entre el interior y el exterior celular y la permeabilidad selectiva de la membrana plasmática determinan el potencial de reposo ( $V_{mr}$ ) de las células. Como se mencionó antes, el interior celular es más negativo que el exterior; por convención se establece que el exterior está a  $0mV$  por lo que la diferencia del potencial de membrana ( $V_{interior} - V_{exterior}$ ) está determinada por el potencial del interior de la membrana.

Si la membrana plasmática expresara un sólo tipo de canal iónico, que a su vez fuera permeante a una sola especie iónica; y si el flujo de esta especie estuviera sujeto solo a su gradiente electroquímico; el potencial de membrana en reposo de esta célula hipotética se produciría cuando la corriente originada por este ion a través de la membrana es cero. Esta condición, el flujo transmembranal igual a cero, ocurre cuando el gradiente de concentración y el gradiente eléctrico se contrarrestan uno a otro alcanzando un punto de equilibrio. El potencial de membrana al cual se alcanza este equilibrio se conoce como potencial de equilibrio para ese ion ( $E_i$ ) y puede ser calculado utilizando la ecuación de Nernst (ver figura 1.1B). En células reales, sin embargo, la membrana plasmática expresa una gran diversidad de canales iónicos con diferentes grados de permeabilidad y selectividad, y el  $V_{mr}$  depende del balance entre el flujo de las diferentes corrientes iónicas de entrada y salida a través de estos canales. Cuando se consideran las diferentes corrientes iónicas de una célula, el  $V_{mr}$  se puede aproximar más adecuadamente empleando la ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz en su versión de voltaje. Esta ecuación también permite calcular el potencial de reversión de los canales iónicos, similares al potencial de equilibrio que se obtiene con la ecuación de Nernst, pero contemplando un escenario más realista que tiene en cuenta que los canales iónicos pueden ser permeables a más de una especie iónica con diferentes grados de permeabilidad.

El  $V_{mr}$  de las células usualmente se encuentra entre  $-60mV$  y  $-90mV$ , un valor cercano al potencial de equilibrio del potasio ( $E_K$ ), debido a que en reposo la membrana suele ser más permeable a este ion.





**Figura 1.1. Distribución desigual de la concentración de iones en el interior y exterior de una neurona.** A la izquierda se muestra un dibujo representativo de una neurona cuyos valores de concentración iónica corresponden a una neurona típica de mamífero; donde A<sup>-</sup> representa los aniones no permeables a través de la membrana plasmática. A la derecha se muestran los potenciales de equilibrio para cada ion permeante calculados con la ecuación de Nernst, para los valores de concentración iónica correspondientes al panel derecho. Figura modificada de <sup>3</sup>.

### 1.1.3 Conductancia iónica

Otro importante parámetro para describir la biofísica de los canales iónicos es la conductancia. La conductancia de los canales iónicos dependientes del voltaje (i) se suele designar con el parámetro  $g_i$ , y está determinada por el producto de tres variables: la conductancia de un único canal en el estado abierto, la densidad de los canales en la membrana y, la fracción de canales que están abiertos a ese tiempo. La conductancia de canal único y la densidad de canales determinan la conductancia máxima del canal ( $\bar{g}_i$ ), la cual es una constante cuyas unidades se suelen expresar en S/cm<sup>2</sup>; y representa la conductancia por unidad de área de membrana si todos los canales del tipo (i) están abiertos. Por otro lado, la fracción de los canales en el estado abierto es equivalente a la probabilidad de hallar cualquier canal en el estado abierto ( $P_i$ ); por lo tanto, todo lo que afecte la probabilidad de apertura del canal, como, por ejemplo: cambios en el  $V_m$ , la concentración del ión permeante, la fuerza impulsora, la presencia de algún ligando, etc; van a intervenir con  $P_i$  <sup>4</sup>.

Empleando la técnica de *patch clamp* en modo *voltage clamp* es posible medir la corriente que fluye por los canales iónicos a diferentes potenciales de membrana y reconstruir así su relación corriente versus voltaje. Esta relación permite calcular la conductancia total de la célula; es decir la conductancia generada por todos los canales iónicos que la célula expresa; o la conductancia de un determinado canal iónico aislando la corriente vs voltaje que aporta un canal en particular. Una relación lineal entre los cambios de corriente versus voltaje se presenta en los canales de fuga o “*leaks*”; los cuáles contribuyen fuertemente a mantener el potencial de membrana en reposo de las células; pero hay canales que no presentan una relación lineal entre la corriente y el voltaje, por lo que su conductancia va a depender del potencial de membrana donde fue medida; la biofísica de estos tipos de canales es el principal determinante de las características de generación y modulación de los potenciales de acción, aportando una gran diversidad de respuestas a las neuronas.

#### **1.1.4 Células excitables y el modelo de Hodgkin-Huxley**

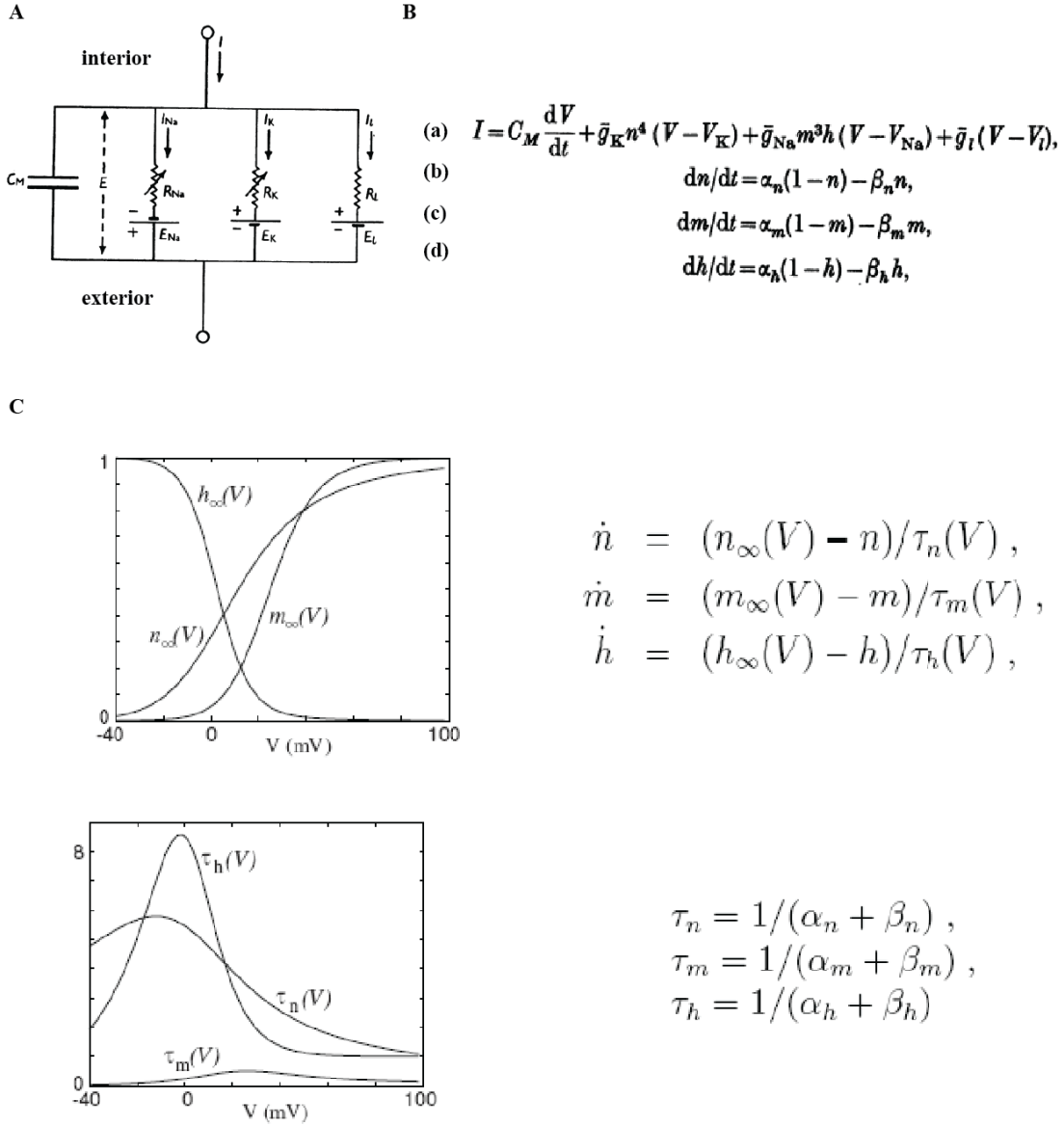
Cómo se mencionó arriba la conductancia iónica de un determinado canal puede ser constante para el caso de una relación lineal entre el voltaje y la corriente; o puede depender de los valores que toma el voltaje de membrana a cada momento. En la actualidad se emplean modelos llamados “modelos basados en conductancias” que contemplan este comportamiento y permiten describir teóricamente la complicada biofísica de las corrientes iónicas; estos modelos se basan en el famoso modelo que Hodgkin y Huxley desarrollaron para describir teóricamente la generación del potencial de acción en el axón gigante de calamar<sup>5</sup> y que les mereció el premio Nobel de medicina en 1963.

En su modelo Hodgkin y Huxley (modelo HH) describieron la membrana del axón como un circuito eléctrico equivalente con cuatro ramas en paralelo (ver figura 1.2A); donde una de las ramas representó el comportamiento de la membrana plasmática como un capacitor (C) y las restantes ramas representaron las tres corrientes iónicas involucradas en el potencial de acción del axón de calamar; las cuales son: la corriente de fuga ( $I_L$ ), la corriente transiente de sodio ( $I_{Na}$ ) y la corriente persistente de potasio ( $I_K$ ). La corriente de

membrana (I) del circuito análogo es la suma de las corrientes que circulan por cada rama (Fig. 1.2B, ecuación (a)); donde cada corriente iónica depende del producto entre su propia conductancia y su fuerza impulsora.

Tal como se explicó más arriba la conductancia de cada canal iónico se define cómo el producto de su conductancia máxima; determinadas por  $\bar{g}_{Na}$  para el canal de sodio,  $\bar{g}_K$  para el canal de potasio y  $\bar{g}_l$  para el canal de fuga; junto a las respectivas variables que modelan los diferentes estados en los que se puede hallar cada canal (probabilidad de estar abierto o cerrado). En el modelo HH la variable de activación para  $I_K$  está dada por  $n(t,V)$  y para  $I_{Na}$  por  $m(t,V)$  (Fig 1.2B ecuaciones (b) y (c), respectivamente), y ambas representan la transición entre el estado abierto y el cerrado de cada canal; si aumenta la activación del canal ( $n(t,V)$  o  $m(t,V)$  tendiendo a 1) el canal se está abriendo; por otro lado, si la activación disminuye ( $n(t,V)$  o  $m(t,V)$  tendiendo a 0) el canal se está cerrando. La variable de inactivación representa otra transición que se da en ciertos tipos de canales; en el modelo HH sólo el canal de sodio posee esta característica biofísica, la cual está simbolizada por la variable  $h(t,V)$  (Fig 1.2B ecuación (d)), la cual representa la transición del estado abierto o cerrado al estado inactivo ( $h(t,V)$  tendiendo a 1); donde la conductancia del canal es cero, pero aun así el canal no se encuentra cerrado sino que inactivo.

En resumen, las variables  $n(t,V)$ ,  $m(t,V)$  y  $h(t,V)$  (conocidas cómo *gates* en inglés) transitan del estado permisivo al no permisivo y viceversa; siendo  $\alpha(V)$  la tasa de transición del estado (permisivo→no permisivo) y  $\beta(V)$  la transición del estado (no permisivo→permisivo); teniendo cada variable o *gate* sus propias tasas de transición. Las tasas  $\alpha(V)$  y  $\beta(V)$  fueron calculadas a través de su relación con las variables  $n_\infty(V)$ ,  $m_\infty(V)$ ,  $h_\infty(V)$  que representan la activación de  $I_K$  y activación e inactivación de  $I_{Na}$  respectivamente, en el estado estacionario; y sus correspondientes constantes temporales  $\tau_n(V)$ ,  $\tau_m(V)$  y  $\tau_h(V)$ . Estos seis últimos parámetros se obtuvieron a través del ajuste a los datos experimentales que Hodgkin y Huxley registraron durante la generación del potencial de acción en el axón gigante de calamar usando la técnica de *voltage clamp*; ver datos en la figura 1.2C. También los exponentes que acompañan a la activación de  $I_{Na}$  (3 para  $m(t)$ ) y a la activación de  $I_K$  (4 para  $n(t)$ ) (ver ecuaciones Fig. 1.2B ecuación (a)), fueron obtenidos del mismo ajuste.



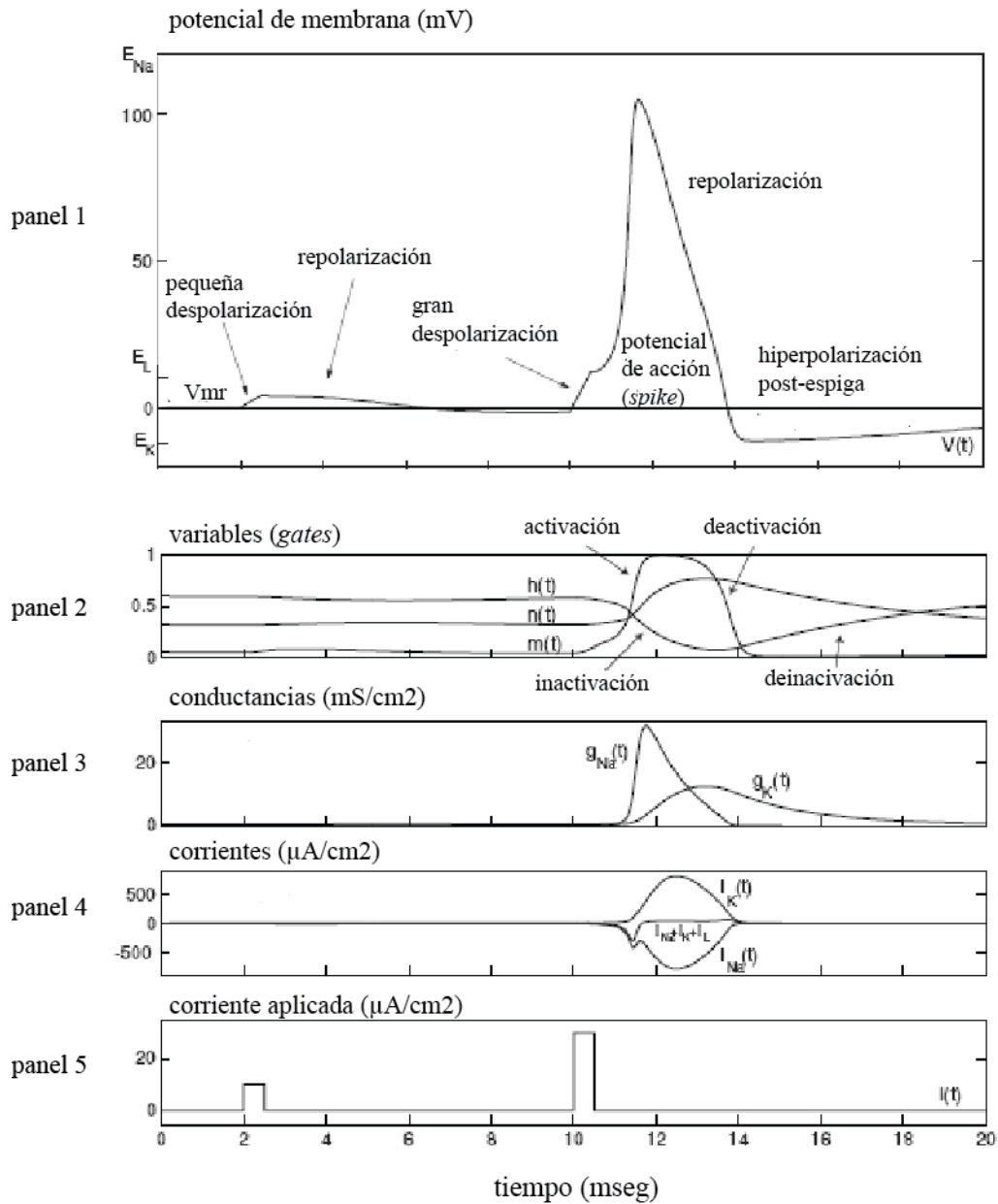
**Figura 1.2. Modelo HH.** (A) Circuito eléctrico que modela la membrana plasmática como un capacitor ( $C$ ) conectado en paralelo con tres ramas donde cada rama individual simula el canal leak (con una resistencia óhmica ( $R_i$ ) y una batería continua ( $E_i$ )), el canal de sodio y el canal de potasio (ambos con una resistencia variable y batería continua ( $R_{Na}$ ,  $E_{Na}$  y  $R_K$ ,  $E_K$ ; respectivamente)). (B) la ecuación de la corriente total que circula por el circuito es equivalente a la suma de la corriente que circula por cada rama ( $I_{capacitiva}$ ,  $I_K$ ,  $I_{Na}$  e  $I_l$ ) (ecuación (a)); definidas ( $I_K$ ,  $I_{Na}$  e  $I_l$ ) como el producto de la conductancia, la *driving force* y ( $P_i$ ); donde esta última se modela con (ecuación (b)) para la variable de activación de  $I_K$ , y (ecuaciones (c) y (d)) para la variable de activación e inactivación de  $I_{Na}$ , respectivamente. Figura modificada de <sup>5</sup>. (C) gráfica de la activación de  $I_K$  ( $n_\infty$ ) e  $I_{Na}$  ( $m_\infty$ ) junto a la inactivación de  $I_{Na}$  ( $h_\infty$ ) medidas en el estado estacionario como función del voltaje de membrana (panel superior izquierdo), junto a sus respectivas ecuaciones (panel superior derecho) y, las dependencias temporales de cada variable (panel inferior izquierdo) junto a sus respectivas ecuaciones (panel inferior derecho). Figura modificada de <sup>3</sup>.

### 1.1.5 El potencial de acción

La evolución temporal de las variables que describen la generación del potencial de acción en el modelo HH se puede ver en la figura 1.3. En cada panel se muestra la evolución temporal de: (1) el voltaje de membrana; (2) variables (*gates*); (3) conductancias; (4) corrientes iónicas y (5) corriente inyectada. Por convención las corrientes catiónicas que entran a la célula (*inward*) se grafican como negativas y las corrientes catiónicas que salen de la célula como positivas (*outward*); ver curso temporal de  $I_{Na}$ ,  $I_l$  e  $I_K$  en panel 4.

Al principio el potencial de membrana está en estado de reposo (0mV para el modelo HH) y por lo tanto hay un balance entre las corrientes iónicas que entran y salen de la célula (panel 4, corriente total igual cero). Un pequeño pulso de corriente inyectada  $I(t)$  (panel 5) produce una perturbación en el  $V_m$  generando un cambio positivo en éste (llamado despolarización) que luego retorna a su valor de reposo (proceso llamado repolarización). La aplicación de un pulso de corriente más grande empuja al  $V_m$  hacia una fuerte despolarización que produce un rápido aumento en la conductancia de  $g_{Na}$  (panel 3) mediado por la rápida evolución ( $\tau_m$ ) de la activación del canal de sodio ( $m(t,V) \rightarrow 1$ ) (panel 2; ver también figura 1.2C) que aumenta con la despolarización. Dado que la despolarización genera mayor activación del canal de sodio y a su vez la activación genera mayor despolarización en un proceso de retroalimentación positiva y que la fuerza impulsora para este ion es grande (el  $V_m$  está lejos del potencial de reversión  $E_{Na}$ ); se produce un aumento explosivo de  $I_{Na}$  que fluye al interior de la célula, despolarizando rápidamente el  $V_m$  y generando la fase ascendente del potencial de acción. Por otra parte, la fase de repolarización del potencial de acción va acompañada de la disminución de  $I_{Na}$  y del aumento de  $I_K$ . Por un lado,  $I_{Na}$  decrece por la disminución de  $g_{Na}$  debida al brusco decaimiento de  $m(t)$  que tiende a su estado no permisivo  $m(t,V) \rightarrow 0$  (proceso llamado deactivación) y al aumento del estado no permisivo de inactivación ( $h(t,V) \rightarrow 0$ ); sumado a la disminución de la fuerza impulsora (ya que el  $V_m$  en el pico del potencial de acción es positivo y cercano a  $E_{Na}$ ). Por otro lado,  $I_K$  comienza a activarse durante la fase de iniciación del potencial de acción  $n(t,V) \rightarrow 1$ ; pero dado que su evolución ( $\tau_m$ ) es lenta (ver figura 1.2C) los cambios en  $g_K$  son más lentos que los producidos en  $g_{Na}$ ; lo que lleva a que  $I_K$  intervenga fuertemente en el proceso de finalización del potencial de acción donde  $I_{Na}$  ya no interfiere.  $I_K$  es una corriente persistente,

es decir que no posee inactivación; el potasio fluye a favor de su gradiente electroquímico hacia afuera de la célula llevando al  $V_m$  hacia valores negativos; dado que el potencial de reversión del potasio  $E_K$  suele ser cercano a  $-80\text{mV}/-100\text{mV}$  la fuerza impulsora para este ion es muy grande durante la repolarización y tiende a llevar al  $V_m$  hacia valores más negativos que el potencial de reposo y cercanos  $E_K$  (proceso llamado hiperpolarización post-espiga); es por eso que una vez finalizado el potencial de acción no se vuelve directo al  $V_m$ . Este último estado del  $V_m$  se llama periodo refractario absoluto porque no se puede volver a desencadenar un potencial de acción; sin embargo  $I_K$  disminuye porque su variable de activación tiende al estado no permisivo  $n(t,V) \rightarrow 0$  dada su voltaje y dependencia temporal (ver figura 1.2C) y porque la fuerza impulsora a estos  $V_m$  hiperpolarizados es pequeña. Además la hiperpolarización del  $V_m$  remueve la inactivación de  $I_{Na}$  ( $h(t,V) \rightarrow 1$ ; proceso llamado deinactivación) y dado que ahora la fuerza impulsora para  $I_{Na}$  es grande; el sodio entra a la célula despolarizando el  $V_m$  y restaurando el potencial de membrana en reposo. La corriente que circula por el canal de fuga interfiere en la fase de caída del potencial de acción colaborando en su repolarización; y también interfiere en re-establecer el potencial de membrana en reposo; dado que los canales de fuga poseen una conductancia que no varía con el voltaje ni con el tiempo;  $I_L$  interfiere de manera diferente durante las distintas fases del potencial de acción a través de los cambios en su fuerza impulsora.



**Figura 1.3. Potencial de acción del modelo HH.** Transcurso temporal del potencial de acción (panel 1) junto a: las de las variables *gates* (panel 2), las conductancias de los canales iónicos involucrados (panel 3), sus corrientes (panel 4) y la corriente externa aplicada para producir las despolarizaciones del Vm (panel 5). Figura modificada de <sup>3</sup>.

## 1.2 El Tálamo

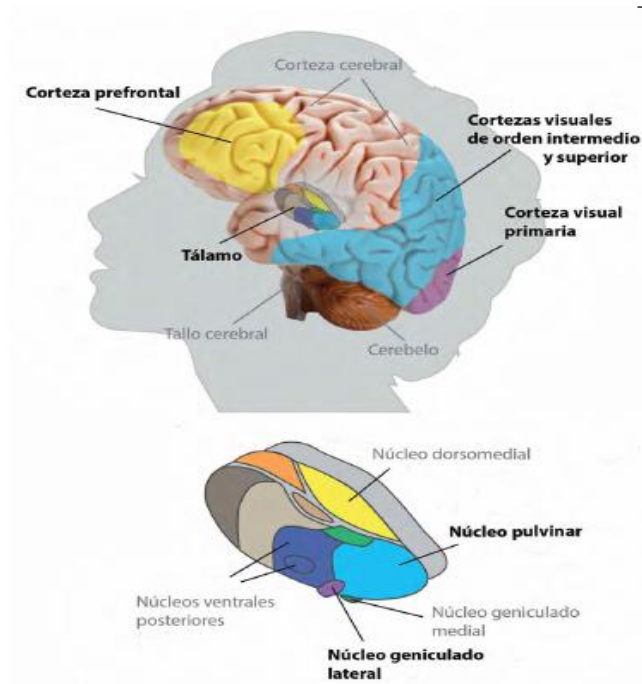
Ubicado en el centro del cerebro (ver figura 1.4A), el tálamo es una estructura par que abarca la porción media del diencefalo; sobre el contactan todas las aferencias sensoriales (a excepción de la olfatoria) en su viaje hacia la corteza. Respecto a su origen embrionario el tálamo puede dividirse en dorsal y ventral; el tálamo dorsal abarca la mayor parte del diencefalo y contiene a las neuronas de relevo que proyectan a la corteza, también se pueden encontrar interneuronas cuyos axones proyectan localmente; la parte ventral del tálamo abarca a las neuronas retículo talámicas (nRT) y a una pequeña región formada por la parte ventrolateral del núcleo geniculado; las neurona del nRT sólo proyectan dentro del tálamo, más específicamente hacia las neuronas de relevo del tálamo dorsal<sup>6</sup>. Esta división se preserva en casi todos los vertebrados, con variaciones en cuanto a la presencia de las interneuronas<sup>7</sup>.

### 1.2.1 Los núcleos del Tálamo

El tálamo dorsal puede ser dividido en varios núcleos (figura 1.4B) que procesan determinado tipo de información y la transmiten a otras estructuras del cerebro relacionadas funcionalmente. En los sistemas sensoriales, donde ha sido estudiado más exhaustivamente el papel del tálamo, las neuronas que constituyen un núcleo reciben y transmiten determinado tipo de señal hacia la región de la corteza que procesa ese tipo de información; por ejemplo, el núcleo geniculado lateral (LGN por sus siglas en inglés) es un núcleo visual que recibe entradas sinápticas provenientes de la retina y proyecta esta información sensorial hacia la corteza visual primaria (Fig. 1.4).

Respecto a la información que arriba a cada núcleo, éstos se pueden clasificar en núcleos de relevo de primer orden, que son aquellos que reciben entradas sinápticas de las distintas áreas subcorticales (visual, auditoria, somatosensorial, gusto, cerebelar, etc) y, en núcleos de relevo de orden superior que son los que reciben entradas sinápticas de la corteza y están involucrados en conectar circuitos de más alta jerarquía entre distintas áreas corticales; un ejemplo de este tipo de núcleos es el pulvinar (figura 1.4B)<sup>6</sup>.



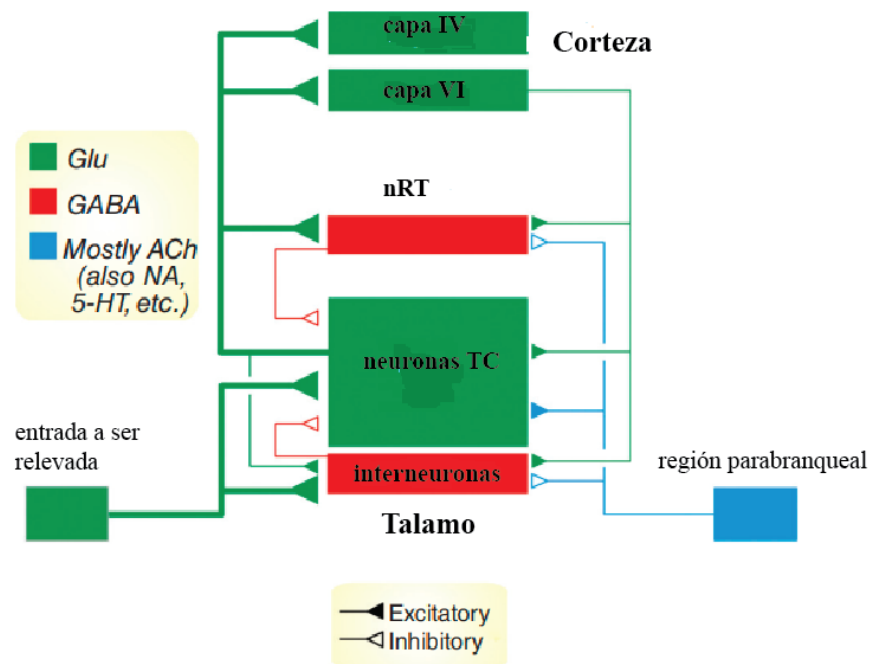


**Figura 1.4. El tálamo.** (A) Ubicación del tálamo en el cerebro. Las áreas corticales marcadas por diferentes colores se conectan con los núcleos del tálamo que corresponden al mismo código de colores. (B) esquema ampliado del tálamo donde se muestran algunos de sus núcleos. Figura extraída de <sup>8</sup>.

### 1.3 El circuito talamocortical

Las neuronas de relevo, más conocidas como neuronas talamocorticales (TC) generan conexiones recurrentes con la corteza, formando un circuito talamocortical (CTC) de actividad oscilatoria sincronizada. Un esquema de las conexiones entre estas estructuras puede verse en la figura 1.5; donde una determinada entrada sensorial conecta de forma excitatoria con una neurona TC y con una interneurona; esta información luego viaja desde la neurona TC hacia la capa IV de la corteza, la cual releva la información hacia otras láminas de la corteza para luego retornar al tálamo; este último tipo de conexión se conoce como *feedback* ya que topográficamente la corteza (desde la capa VI) vuelve a conectar a la misma neurona TC que la conectó originalmente. A su vez, los axones de las neuronas TC en su camino a la corteza, se ramifican y conectan con las neuronas del nRT, estimulando su propia inhibición; también la corteza en su conexión hacia las TC manda una colateral hacia el nRT

(ver Fig. 1.5). Además de estas conexiones, el CTC también recibe entradas modulatorias provenientes del tallo cerebral (región parabranteal), mayoritariamente colinérgicas<sup>9,10</sup>. En resumen, el circuito talamocortical está gobernado por diferentes señales: excitación recurrente de la corteza (despolarizantes) e inhibición recurrente de neuronas locales (interneuronas) y del núcleo talámico reticular (hiperpolarizantes) que afectan el comportamiento de las neuronas TC, de esta manera el tálamo es capaz de influir en las funciones de la corteza.



**Figura 1.5. Esquema simplificado del circuito talamocortical.** Las entradas sensoriales conectan de forma excitatoria a las neuronas TC y a las interneuronas, ambas estructuras ubicadas dentro del tálamo. Esta información viaja desde las TC hacia la capa IV corteza, y en su recorrido manda una conexión colateral a las neuronas del nRT (neuronas inhibitorias del tálamo). Posteriormente, la corteza vuelve a conectar a la neurona TC a través de la capa VI, en cuyo recorrido también manda una colateral hacia las neuronas del nRT. Además, el tálamo recibe inputs modulatorios (acetilcolina, serotonina, etc) principalmente desde la región parabranteal del tallo cerebral. Figura modificada de <sup>6</sup>.

### 1.3.1 Neuronas del tálamo

Como se mencionó antes, el tálamo posee tres clases de neuronas: las neuronas TC, las neuronas del nRT y las interneuronas. Las neuronas TC son glutamatérgicas, es decir que usan glutamato como neurotransmisor y representan el mayor número de células en el tálamo. Por otra parte, las interneuronas (ver <sup>11</sup>) y las neuronas del nRT son gabaérgicas; por lo tanto, liberan en la terminal sináptica el neurotransmisor GABA (ácido gamma-aminobutírico); este neurotransmisor activa en las neuronas TC receptores GABA<sub>A</sub> y receptores GABA<sub>B</sub>.

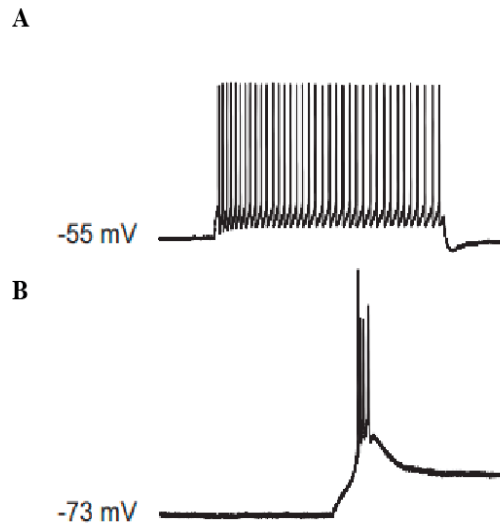
## 1.4 Propiedades intrínsecas de las neuronas talamocorticales

El estudio de las propiedades electrofisiológicas de las neuronas TC comenzó en los años 60 con registros intracelulares en estudios *in vivo*, donde se consideró a estas neuronas como simples elementos de comunicación de la información entre las entradas sensoriales y la corteza cerebral (Andersen and Andersson 1968<sup>12</sup>). Ya en los años 80 con el avance y desarrollo de registros *in vitro* se hizo evidente que las neuronas TC, dada la riqueza de conductancias iónicas, poseen propiedades electrofisiológicas intrínsecas más allá de una simple función de relevo (revisado en <sup>13</sup>).

### 1.4.1 Respuesta eléctrica

Dependiendo del potencial de membrana, las neuronas TC poseen dos modos de disparo: tónico y en ráfagas. El disparo tónico (figura 1.6A) se presenta a potenciales de membrana despolarizados (alrededor de -55mV) donde las neuronas producen potenciales de acción cuya frecuencia de disparo es proporcional a la intensidad con que son estimuladas. El modo de disparo en ráfagas se produce a potenciales de membrana más hiperpolarizados (alrededor de -80mV) en donde la respuesta de la neurona se caracteriza por una onda lenta de calcio llamada onda de bajo umbral (LTS por sus siglas en inglés) coronada por espigas de potenciales de acción a altas frecuencias (ver figura 1.6B). La transición entre ambos modos de disparo se debe a la modulación de neurotransmisores, en particular acetilcolina, los cuales afectan la conductancia del canal iónico de fuga de potasio<sup>14-16</sup>. La modulación del

canal leak de potasio por la acetilcolina, genera que éste disminuya su conductancia, provocando que el  $V_m$  se mueva hacia valores más positivos (despolarización); produciendo una inactivación del canal de calcio responsable por los LTS, deshabilitando el disparo en ráfagas y favoreciendo el modo tónico.



**Figura 1.6. Modos de disparo de las neuronas TC.** (A) el modo de disparo tónico predomina a  $V_m$  despolarizados. (B) el modo de disparo en ráfagas se presenta a  $V_m$  más hiperpolarizados. Figura modificada de <sup>17</sup>.

#### 1.4.2 Disparo tónico

Cómo se expuso antes (sección modelo HH) la espiga de un potencial de acción de debe a la combinación de dos corrientes iónicas voltaje y tiempo dependientes conocidas como: la corriente transiente de sodio  $I_{Na}$  y la corriente rectificadora de potasio  $I_K$ ; y si bien este mecanismo es compartido por todas las neuronas, existen variaciones en cuanto a la biofísica de ambos canales que junto a la diversidad de canales iónicos que se pueden encontrar en una neurona, modulan su forma de disparo, y les brindan una identidad particular a su modo de respuesta. En las neuronas TC la espiga de potencial de acción surge de la combinación de una corriente de sodio que circula por los canales Nav1.2<sup>18</sup> y una corriente de potasio que circula por los canales Kv1<sup>18,19</sup>. Cuando el potencial de membrana está en reposo, alrededor de -65mV para neuronas

TC<sup>17</sup>,  $I_{Na}$  se encuentra inactiva pero una pequeña despolarización puede permitir que alcance su umbral de activación, lo que lleva a un rápido aumento de esta corriente por medio de un mecanismo auto-regenerativo, característico de este tipo de corriente y fundamental para la propagación del potencial de acción en la membrana plasmática; la despolarización que desencadena una espiga de potencial de acción lleva al  $V_m$  hacia potenciales positivos provocando la inactivación de  $I_{Na}$  e iniciando la fase de decaimiento del potencial de acción (repolarización) la cual es acompañada por la activación de  $I_K$  que permite al  $V_m$  volver a hiperpolarizarse. Las neuronas TC también expresan canales de calcio de alto umbral (HVL)<sup>20</sup> y canales de potasio activados por calcio  $I_{K(Ca)}$  y  $I_{K(AHP)}$ <sup>21,22</sup> que modulan diferentes aspectos del disparo tónico tales como la frecuencia global de disparo, las hiperpolarizaciones post-espiga y la adaptación de la frecuencia de disparo durante trenes largos de espigas.

### 1.4.3 Disparo en ráfagas

El modo de disparo en ráfagas, también conocido como ráfagas de rebote, se debe a la interacción entre mecanismos que causan la hiperpolarización del  $V_m$ , ya sea por entradas sináptica inhibitorias o por la electrofisiología intrínseca de las neuronas TC, y las propiedades biofísicas de un canal de calcio; que desencadenan una especie de efecto rebote sobre el potencial de membrana provocando la generación de una ráfaga<sup>13,23</sup>. Los canales de calcio de bajo umbral presentan distintos estados de activación e inactivación que dependen del tiempo y del voltaje de membrana. La corriente que circula por estos canales ( $I_T$ ) se activa a  $V_m$  cercanos a -65mV, pero a éste mismo  $V_m$  el canal se encuentra completamente inactivo y por lo tanto no puede transportar corriente. Para remover la inactivación del canal es necesario que el  $V_m$  se hiperpolarice a valores más negativos que -75mV. Una vez que su inactivación es removida, y dado que la variable de activación del canal es temporalmente mucho más rápida que su inactivación; por un mecanismo similar a la generación de potenciales de acción mediados por canales de sodio,  $I_T$  puede por sí sola desencadenar un LTS; esta onda de calcio lleva al  $V_m$  hacia valores muy despolarizados que alcanzan el umbral de generación de potenciales de acción (cercanos a -55mV). Dada la biofísica del tipo de canal de calcio que se expresa en las neuronas TC (subfamilia Cav3.1) los LTS tienen una duración temporal cercana a los 100-200mseg<sup>13</sup>.

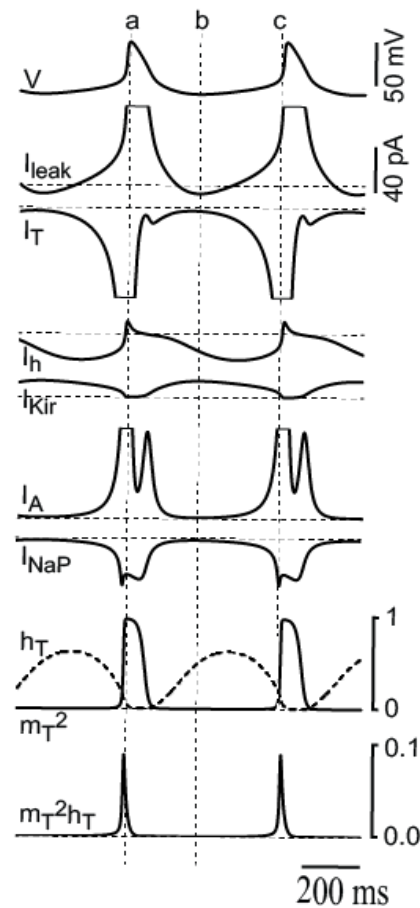
#### 1.4.4 Ráfagas repetitivas

Además de  $I_T$ , otras corrientes iónicas interfieren y modulan la producción de ráfagas en neuronas TC <sup>17</sup>; cuyas características biofísicas individuales pueden desencadenar un comportamiento oscilatorio sub-umbral del potencial de membrana conocido como ráfagas repetitivas. Estas son: la corriente catiónica activada por hiperpolarización ( $I_h$ ) <sup>24</sup>; la corriente persistente de sodio ( $I_{NaP}$ )<sup>18,25</sup>; la corriente transiente de potasio de bajo umbral ( $I_A$ ) <sup>18,26,27</sup>; la corriente de potasio rectificadora hacia adentro ( $I_{Kir}$ ) y las correspondientes corrientes de fuga de sodio ( $I_{Naleak}$ ) y de potasio ( $I_{Kleak}$ ) <sup>17</sup>.

#### 1.4.5 Modulación del disparo en ráfagas repetitivas

Un estudio que combina técnicas experimentales y modelado teórico arroja evidencias sobre la modulación de las ráfagas repetitivas mediada por las corrientes iónicas antes mencionadas ( $I_T$ ,  $I_h$ ,  $I_{NaP}$ ,  $I_A$ ,  $I_{Kir}$ ,  $I_{Naleak}$  e  $I_{Kleak}$ ) <sup>17</sup>. Para mostrar cómo interfiere cada corriente en el comportamiento oscilatorio, en este mismo trabajo se midió la dinámica temporal de las siete corrientes iónicas durante el transcurso del disparo repetitivo en ráfagas, empleando un modelo teórico de neurona TC. Los resultados se pueden ver en la figura 1.7, donde las diferentes regiones del LTS están marcadas por líneas verticales, las cuales corresponden al pico máximo del LTS (línea a), el período inter-ráfaga (línea b) y la región de crecimiento del LTS (línea c). Durante el LTS no hay flujo de  $I_h$ , esta corriente comienza a activarse en la región inter-ráfaga (ver línea b trazo  $I_h$ ) y es máxima en la fase de despolarización que antecede el LTS, región comprendida entre (líneas b y c); promoviendo la despolarización necesaria para alcanzar el umbral de activación de  $I_T$ . Una vez alcanzado este umbral,  $I_T$  aumenta rápidamente siguiendo la dependencia temporal de su activación de forma regenerativa hasta alcanzar su máximo valor  $m_T=1$  (ver línea a, trazo  $m_T$ ); a medida que el LTS progresa  $I_T$  también comienza a inactivarse  $h_T \rightarrow 0$  (ver línea a, trazo  $h_T$ ) lo que lleva a una disminución de la corriente y por ende a la finalización del LTS. Por su parte  $I_{NaP}$  es una corriente de sodio que contribuye con la generación del LTS, acompañando su fase inicial de despolarización y alcanzando un máximo en su pico (ver línea a, trazo  $I_{NaP}$ ); al disminuir a valores cercanos a cero durante las hiperpolarizaciones (línea b)  $I_{NaP}$  no se opone a las incursiones negativas del  $V_m$ . En la fase de repolarización, región donde  $I_T$  está inactiva ( $h_T=0$ ),  $I_{NaP}$  alcanza su máximo valor, el cual es contrarrestado y superado por un pico de  $I_A$  (ver línea a, trazo  $I_A$ ) y por la fuerte contribución de  $I_{Kleak}$  (ver aumento en

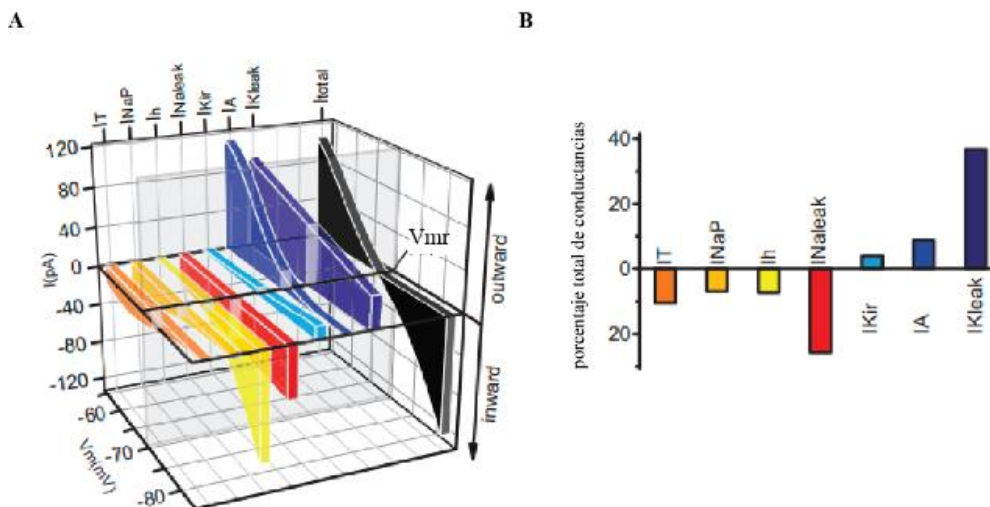
componente hacia afuera en trazo  $I_{leaks}$ , línea a) acompañando ambas corrientes la finalización del LTS y la hiperpolarización del  $V_m$ . En esta última etapa la contribución de  $I_{Kir}$  se vuelve importante; esta corriente de potasio incrementa las hiperpolarizaciones y lleva al  $V_m$  hacia valores más negativos;  $I_{Kir}$  aumenta las hiperpolarizaciones de la región inter-ráfagas (ver línea b, trazo  $I_{Kir}$ ) contribuyendo a la remoción de la inactivación de  $I_T$  y a la activación de  $I_h$  para volver a generar un nuevo ciclo. En esta región (ver línea b, trazo  $I_{leaks}$ ) la componente de  $I_{leaks}$  está dominada por la corriente de sodio ( $I_{NaLeak}$ ) que contribuye a mantener el  $V_m$  contrarrestando y generando un balance con las corrientes hiperpolarizantes.



**Figura 1.7. Simulación de la contribución relativa de las corrientes iónicas durante las oscilaciones del  $V_m$ .** El panel superior muestra dos LTS simulados con un modelo de neurona TC y por debajo de este y en orden, los cursos temporales  $I_{leak}$ ,  $I_T$ ,  $I_h$ ,  $I_{Kir}$ ,  $I_A$ ,  $I_{NaP}$  y las variables de activación ( $m_T$ ) e inactivación ( $h_T$ ) de  $I_T$ , durante las oscilaciones. Figura modificada de <sup>17</sup>.

### 1.4.6 Potencial de membrana en reposo de neuronas TC

Las neuronas TC poseen un potencial de membrana en reposo cercano a  $-65\text{mV}^{17}$ ; la interacción dinámica de siete conductancias iónicas operando a potenciales de membrana sub-umbrales, es decir a potenciales lejanos a la generación de potenciales de acción (mecanismo supra-umbral), regulan el equilibrio de iones que atraviesan la membrana plasmática estableciendo y manteniendo el  $V_{mr}$ . En la figura 1.8 se muestra la contribución individual de cada corriente iónica; donde cada color representa una determinada corriente:  $I_T$  (naranja),  $I_{NaP}$  (naranja claro),  $I_h$  (amarillo),  $I_{Naleak}$  (rojo),  $I_{Kir}$  (celeste),  $I_A$  (azul claro) y  $I_{Kleak}$  (azul oscuro). En negro se muestran la suma algebraica de las corrientes de entrada (tonos de rojo y amarillo) y de salida (tonos de azul); el punto donde ambas se igualan (corriente igual cero) representa el potencial de equilibrio. En la figura 1.8B se muestra la contribución en porcentaje de cada conductancia iónica, donde se puede ver que el  $V_{mr}$  en neuronas TC esta principalmente gobernado por las corrientes de fuga de sodio y potasio.



**Figura 1.8. Contribución relativa de las siete corrientes iónicas al  $V_{mr}$ .** Simulaciones con el mismo modelo de la (Fig. 1.7). (A) relación corriente voltaje del modelo TC con la contribución individual de las siete corrientes iónicas medidas en el estado estacionario, donde el balance entre las corrientes *inward* (hacia adentro) y las *outward* (hacia afuera) se equilibran en  $I=0$  y determinan el  $V_{mr}$  (línea negra). (B) porcentaje de la contribución de cada conductancia iónica al  $V_{mr}$ . Figura modificada de <sup>17</sup>.



## **1.5 Oscilaciones**

### **1.5.1 Oscilaciones del circuito talamocortical**

El circuito talamocortical produce diferentes patrones de actividad oscilatoria sincronizada que depende de las propiedades intrínsecas de las neuronas que conforman la red, de la arquitectura de sus conexiones sinápticas y de la interacción dinámica entre ambas. Además, este comportamiento oscilatorio se manifiesta como la actividad oscilatoria del potencial de membrana en registros de una única célula TC; como actividad oscilatoria sincronizada de los varios tipos de neuronas que conforman el sistema CTC, ya sea en registros *in vitro* e *in vivo*; y como actividad oscilatoria global de todo el sistema CTC, que por ejemplo puede ser registrado en el EEG de humanos y animales <sup>28</sup>. Estos patrones de actividad oscilatoria sincronizada están relacionados con los ritmos del sueño y la vigilia; la fluctuación entre ambos estados se produce por la liberación de una variedad de neurotransmisor desde el tallo cerebral, hipotálamo, ganglios de la base y la corteza cerebral, que resultan en una despolarización de las neuronas TC y nRT; y en un aumento en la excitabilidad de neuronas piramidales presentes en la corteza; que suprime la generación de los ritmos del sueño y promueven estados que permiten el procesamiento sensorial y la cognición <sup>14</sup>.

### **1.5.2 Oscilaciones del potencial de membrana en neuronas TC**

La diversidad de canales iónicos que expresan las neuronas TC, junto con la modulación dinámica del potencial de membrana, es lo que permite que estas neuronas posean las dos formas de disparo antes mencionadas; las cuales están relacionadas con diferentes estados funcionales del cerebro y comportamentales del individuo. El modo de disparo tónico se asocia a la vigilia y sueño REM (sueño con movimientos oculares rápidos); en el estado de vigilia las neuronas TC intervienen en el procesamiento de información sensorial; las características del disparo tónico, cuya frecuencia de disparo depende de la intensidad del estímulo se considera relevante para una fiel transmisión de la información del exterior a la corteza <sup>29</sup>. Por otra parte, el modo de disparo en ráfagas se asocia al sueño N-REM (No REM); a estados de pérdida de conciencia como consecuencia de la anestesia profunda; y a un tipo de epilepsia conocida como epilepsia de ausencia <sup>29-31</sup>. El modo de disparo en ráfagas es un mecanismo oscilatorio del potencial de

membrana que puede ser iniciado con una entrada externa (entradas sinápticas) o a través de mecanismos intrínsecos de las neuronas TC. Funcionalmente se considera que este modo de disparo contribuye a los diferentes estados comportamentales antes mencionados a través de su contribución para iniciar y sostener mecanismos oscilatorios sincronizados en el circuito talamocortical. Para la condición patológica de la epilepsia de ausencia se considera que las ráfagas de las neuronas TC podrían contribuir a aumentar la sincronización del CTC y este a su vez, a la hipersincronización más generalizada del cerebro que se relaciona con la crisis epiléptica<sup>32,33</sup>.

### **1.5.2 Oscilaciones del CTC y el procesamiento de información sensorial**

El tálamo no sólo es un simple relevo de información entre los centros aferentes y la corteza, sino que cumple una importante función relacionada con la integración y el control selectivo del flujo de información hacia esta última. Se especula, con base en toda la evidencia colectada en las últimas décadas, que la retroalimentación excitatoria proveniente de la corteza modula y sincroniza el circuito talámico de forma que se optimice la abstracción de una representación coherente del mundo exterior, en cambio, la interface inhibitoria del nRT es considerada una “compuerta atencional” que filtra la información sensorial, permitiendo que solo la información comportamentalmente relevante ocupe la limitada franja atencional<sup>34</sup>. El nRT modula esta compuerta por medio de la inhibición que produce sobre las neuronas TC, si la conexión sináptica es fuerte puede generar una disminución en la excitabilidad de las neuronas TC evitando que estas puedan desencadenar una respuesta y por ende evitando el relevo de información hacia la corteza. Por el contrario, sin entrada inhibitoria la compuerta estaría totalmente abierta y dejaría pasar fielmente la información sensorial; también podría existir una leve inhibición y por lo tanto la compuerta podría estar parcialmente activa. De esta manera, las oscilaciones normales generadas por la actividad iterativa talamocortical dan forma a los eventos funcionales normales provocados por los estímulos sensoriales<sup>35,36</sup>.

### 1.5.3 Oscilaciones del CTC y los ritmos del sueño

Durante los diferentes ritmos del sueño la actividad oscilatoria tiene mayor sincronización que en vigilia, y se manifiestan en el EEG como ondas de mayor amplitud y de menor frecuencia<sup>37</sup>. El sueño se divide en dos etapas: sueño N-REM y sueño REM; durante el sueño N-REM se producen las ondas sincronizadas del sueño llamadas ondas lentas; durante el sueño REM el patrón EEG es de menor amplitud y sincronización, asemejándose a los patrones registrados en vigilia.

El sueño se divide en 5 fases que van acompañadas de un estado global del cerebro que induce un aumento en la hiperpolarización de todas las neuronas a medida que avanza en las fases del sueño. La fase 1 es la etapa de adormecimiento, cuya actividad eléctrica se manifiesta en el EEG como ritmo theta. En las fases 2 a 4 se manifiestan los ritmos lentos del sueño los cuales se componen de las ondas lentas, los *spindles* o husos del sueño y las ondas delta. Se considera que las ondas lentas se manifiestan en las tres fases antes mencionadas y son una envolvente de los otros dos ritmos que se producen en las diferentes fases; por su parte los *spindles* aparecen durante la fase 2, llamada fase superficial del sueño; y las ondas delta se visualizan en el EEG en las fases más profundas del sueño N-REM (fases 3 y 4). Por último, la fase 5 corresponde a la fase de sueño REM.

### 1.5.4 Ondas lentas

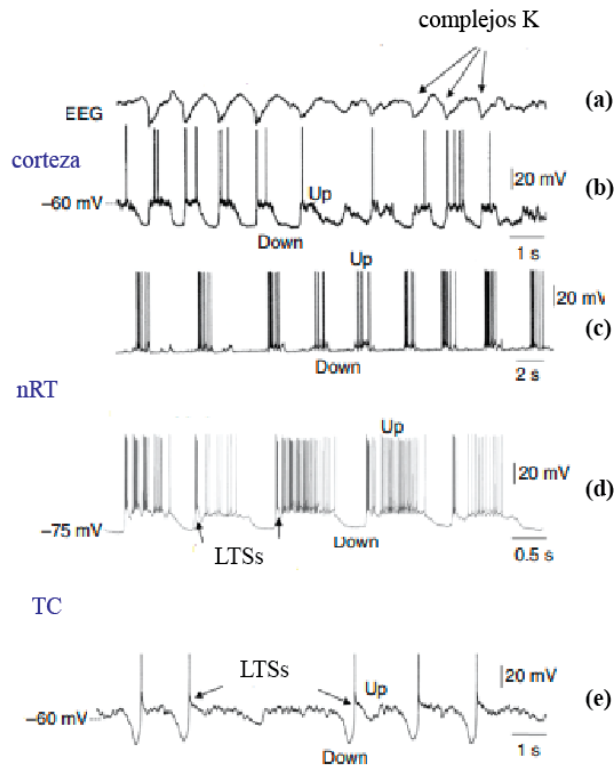
Durante el sueño N-REM y bajo algunos tipos de anestésicos las neuronas corticales se sincronizan produciendo un ritmo lento que involucra a toda la corteza; estas oscilaciones se registran a través del EEG como ondas de bajas frecuencias menores a 1 HZ conocidas como complejos K (ver figura 1.9, trazo (a)); que son la manifestación de la actividad oscilatoria de grandes redes neuronales que ciclan entre dos estados: la actividad (respuesta neuronal, despolarización) y el silencio (sin respuestas neuronales, hiperpolarización); llamados estados UP and DOWN (trazos (b) y (b))<sup>38</sup>. A través de registros in vivo en animales anestesiados se sabe que el tálamo también genera respuestas sincronizadas que se correlacionan con el ritmo de ondas lentas; en la transición de los estados DOWN → UP las neuronas TC disparan LTS que pueden ir o no acompañados de espigas de potenciales de

acción y la transición UP → DOWN va acompañada de un punto de inflexión en el potencial de membrana seguido de una hiperpolarización (Fig. 1.9, trazo (e)). Por su parte las neuronas del nRT durante la fase UP disparan primero en modo ráfaga y a continuación en modo tónico, luego bruscamente cesan de disparar y entran a la fase hiperpolarizada DOWN (Fig. 1.9, trazo (d)).

La presencia de las ondas lentas *in vivo* e *in vitro* bajo condiciones experimentales que no preservan las conexiones talámicas; y su ausencia en registros *in vivo* en animales donde les fue removida la corteza, apuntan a un origen cortical de este ritmo, el cual luego se propaga hacia el tálamo<sup>39-41</sup>. Siguiendo esta línea que ubica a la corteza en un lugar central hay tres orígenes propuestos de la iniciación de las oscilaciones lentas; el primero de ellos es el argumento de la acumulación de mini EPSP (producto de liberación de neurotransmisores de forma espontánea) durante el estado DOWN en las terminales sinápticas de las neuronas piramidales que desencadenan la respuesta de estas neuronas a través de una despolarización inducida por la activación de corrientes de  $I_{NaP}$ . Por otro lado, se considera que el origen podría deberse a la actividad espontánea de las neuronas de la capa V de la corteza. Por último, el tercer argumento propuesto se centra en la hipótesis de la “sincronización selectiva” donde se plantea que un conjunto o población de neuronas corticales con cierta estructura espacial podrían ser las encargadas de generar la sincronización<sup>37</sup>. Sin embargo; dado que las oscilaciones lentas en los preparados (*in vitro* e *in vivo*) sin conexiones al tálamo presentan diferencias en cuanto a las oscilaciones lentas que se generan con las conexiones corteza-tálamo intactas; y que el estado UP de las neuronas TC antecede temporalmente al estado UP de las neuronas piramidales y a la deflexión negativa de la onda lenta en el EEG<sup>30</sup>; se han propuesto nuevas hipótesis que apuntan a un rol más relevante del tálamo en la generación de este ritmo<sup>38</sup>.

Siguiendo esta última línea de pensamiento en Crunelli et al.<sup>38</sup> se plantea la hipótesis de los tres osciladores; que apunta a que las neuronas TC y las nRT son osciladores condicionales de las oscilaciones lentas que se acoplan al oscilador cortical para manifestar el ritmo de ondas lentas que se registra en el EEG en animales y humanos durante el sueño N-REM. Siendo el nexo entre ambos osciladores las entradas sinápticas glutamérgicas de la

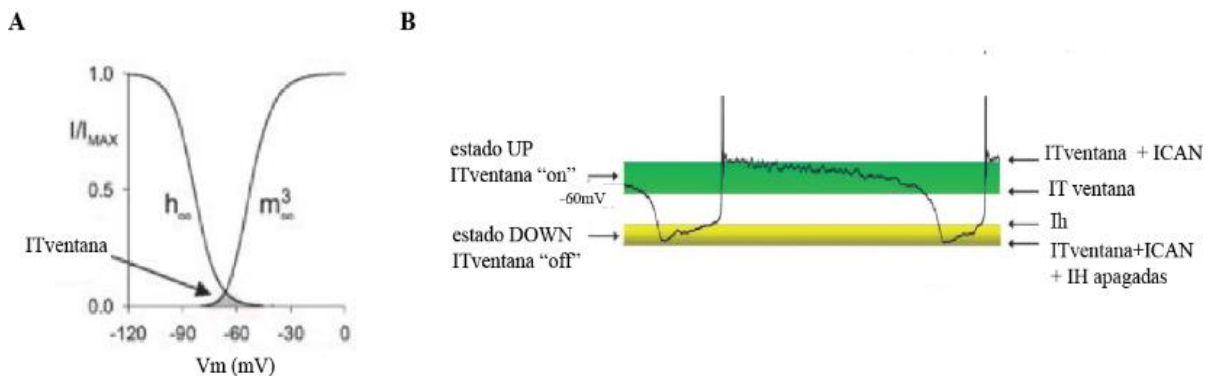
corteza hacia las nRT y las TC; de esta forma en <sup>38</sup> se explica que la hipótesis de los 3 osciladores no es opuesta a los datos experimentales que muestran que las oscilaciones lentas requieren de la corteza, pero no del tálamo; ya que en esos estudios no se mantienen las conexiones glutamatergicas corteza→tálamo. La activación de receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs) en neurona TC y nRT debido a las entradas sinápticas provenientes de la corteza es el mecanismo que enlaza al oscilador de la corteza con los dos osciladores talámicos, permitiendo que estas neuronas produzcan oscilaciones lentas en su potencial de membrana acompañados de los estados UP and DOWN <sup>38</sup>. Siendo esto último demostrado en registros *in vitro* <sup>42</sup>, donde la presencia de un agonista de receptores mGluRs en rodajas talámicas inducen las oscilaciones lentas en las neuronas nRT y TC que son indistinguibles de aquellas registradas *in vivo* <sup>30</sup>. Estas oscilaciones inducidas *in vitro* en las neuronas del tálamo son insensibles a TTX, un bloqueador específico de canales de sodio que bloquea la generación de potenciales de acción y por lo tanto la actividad sináptica. Estas oscilaciones tampoco son inhibidas por bloqueadores de receptores iónotrópicos GABA<sub>A</sub> y de glutamato; lo que lleva a suponer que el mecanismo oscilatorio de las neuronas TC y nRT es intrínseco <sup>42,43</sup>.



**Figura 1.9. EEG y oscilaciones del  $V_m$  durante el ritmo lento.** EEG (a) y simultánea respuesta intracelular de: neuronas corticales (b) y (c), neurona del nRT (d) y neurona TC (e). Registradas en neuronas talámicas y corticales en gatos bajo anestesia profunda. Figura modificada de <sup>38</sup>.

La respuesta fisiológica de las neuronas TC durante las oscilaciones lentas ha sido estudiada; el mecanismo propuesto que permite al potencial de membrana establecerse a dos  $V_m$  diferentes (el estado UP y el DOWN) es la corriente de ventana del canal de calcio de bajo umbral tipo T (corriente de ventana T). La corriente de ventana T es una corriente de  $Ca^{++}$  que fluye al interior celular despolarizando el  $V_m$  de forma tónica. La corriente de ventana se define biofísicamente como el área bajo la intersección de las curvas de activación e inactivación (Figura 1.10A) y es un fenómeno característico de todas las corrientes iónicas que poseen estados de activación e inactivación. En la figura 1.10B se puede ver un esquema del mecanismo intrínseco que permite a las neuronas TC sostener las oscilaciones lentas del potencial de membrana. Estas oscilaciones intrínsecas resultan de la interacción entre la corriente de ventana T, la corriente h y la corriente catiónica no selectiva dependiente de  $Ca^{++}$

( $I_{CAN}$ ) que se expresan en neuronas TC <sup>44</sup>. Cuando la componente  $I_T$  de ventana está activa el  $V_m$  se despolariza (estado UP) y desencadena un LTS; la entrada de calcio a la neurona activa  $I_{CAN}$  (una corriente lenta) la cual genera la meseta (“plateau”) que caracteriza las oscilaciones lentas de las neuronas TC *in vitro* e *in vivo* <sup>42</sup>.  $I_{CAN}$  decae con el tiempo dado que el calcio intracelular decae; esto lleva a que el  $V_m$  del estado UP decaiga y, debido a que  $I_T$  ventana es dependiente del voltaje (Fig. 1.10A) la contribución de esta corriente también disminuye. Todas estas influencias hiperpolarizantes hacen que el  $V_m$  se mueva hacia el estado DOWN. En este último estado la corriente  $h$  se activa, lo cual es suficiente para sacar el  $V_m$  de la hiperpolarización y llevarlo a valores donde  $I_T$  ventana vuelve a tomar relevancia. La interacción de estas dos corrientes despolarizantes nuevamente vuelven a promover un estado UP. Este mecanismo también ha sido propuesto para sostener las oscilaciones lentas en el  $V_m$  de las células del nRT <sup>45</sup>.



**Figura 1.10. Mecanismos iónicos de las oscilaciones lentas.** (A) curva de activación e inactivación de  $I_T$  medidas en el estado estacionario en registro *in vitro* de neuronas TC de ratón. (B) Resumen de los mecanismos iónicos involucrados en las oscilaciones lentas del  $V_m$  de neuronas TC. Figura modificada de <sup>44</sup>.

### 1.5.5 Husos del sueño (*Spindles*)

Este ritmo, como se mencionó antes, aparece durante la fase superficial del sueño N-REM; y se manifiesta en el EEG como ondas sincronizadas con formas de huso (*crescendo-decrescendo*) a frecuencias entre 7-14Hz que tienen una duración de 1 a 3 segundos y aparecen de forma intermitente cada 5 a 15 segundos. Los mecanismos celulares y sinápticos que generan estas oscilaciones han sido ampliamente estudiados y hoy se acepta que los

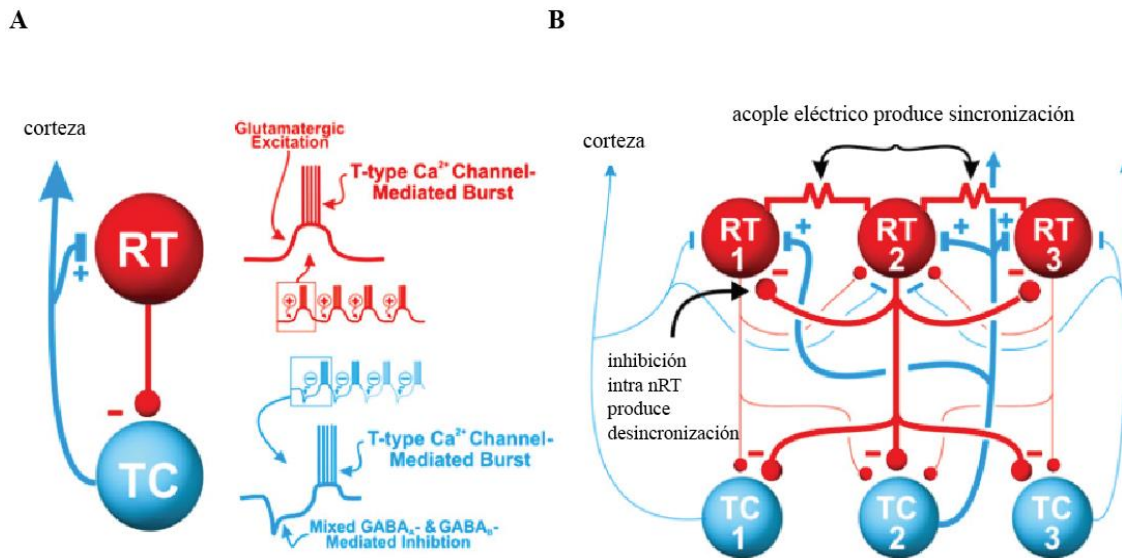
*spindles* tienen un origen talámico y que las conexiones entre las neuronas del nRT y las TC juegan un papel importante. Además, las conexiones corticales colaboran con la sincronización de estas oscilaciones.

Los *spindles* se inician con el disparo de las neuronas del nRT <sup>46</sup>; estas neuronas expresan canales de calcio de bajo umbral pertenecientes a la subfamilia Cav3.3 y Cav3.2 <sup>47</sup> que les permiten generar ráfagas como las neuronas TC; con una respuesta fisiológica particular ya que la biofísica de estos canales difiere de la de los canales T expresados por las neuronas TC (que expresan la subfamilia Cav3.1). Las ráfagas de las neuronas nRT son prolongadas en el tiempo con trenes largos de potenciales de acción a altas frecuencias que desencadenan en sus terminales sinápticas la liberación del neurotransmisor GABA. Este neurotransmisor provoca la activación de receptores GABA<sub>B</sub> y GABA<sub>A</sub> expresados en las neuronas TC; y por ende la generación de potenciales post-sinápticos inhibitorios (IPSPs). Estas hiperpolarizaciones promueven la remoción de la inactivación de I<sub>T</sub> y la generación de ráfagas de rebote en las neuronas TC. Estas ráfagas de potenciales de acción en las neuronas TC, las cuales están conectadas recíprocamente con las neuronas del nRT mediante sinapsis excitatorias, generan la producción de nuevas ráfagas de potenciales de acción en las neuronas del nRT; dando inicio a un nuevo ciclo de la oscilación. Por su parte la corteza se conecta con ambas neuronas (nRT y TC) de forma excitatoria coordinando su respuesta ordenada (ver esquema figura 1.11A).

La frecuencia característica de los *spindles* (7-14Hz) se debe a la dependencia temporal característica de los receptores sinápticos que se activan durante un ciclo de oscilación en el lazo nRT-TC <sup>14,48</sup>. La fase *crescendo* de los *spindles* se asocia al reclutamiento sincronizado de una población cada vez más grande de neuronas del CTC durante los ciclos sucesivos de la oscilación y la fase *decrecendo* se debe a una desincronización de la red neuronal <sup>37</sup>. Un mecanismo propuesto para explicar la desincronización de las oscilaciones es la inhibición que las neuronas nRT ejercen sobre sí mismas, mediada por receptores GABA<sub>A</sub> (figura 1.11B). Se considera que la activación de estos receptores limita la cantidad de neuronas que se reclutan en cada ciclo de oscilación, acorta la duración de las ráfagas y, disminuye la respuesta mediada por la excitación de las



TC sobre las neuronas del nRT<sup>49</sup>. Otro mecanismo considerado como desincronizante es una regulación positiva sobre la corriente  $I_h$  que se expresa en las neuronas TC.  $I_h$  es regulada positivamente por el AMPc, el cual a su vez aumenta con la entrada de calcio a la célula durante las ráfagas de rebote. La corriente  $I_h$  genera una despolarización post-ráfaga (ADP por sus siglas en inglés), la cual aumenta gradualmente a medida que  $I_h$  es regulada positivamente hasta el punto en que la despolarización inducida es tal que los IPSPs no logran desencadenar respuestas en las neuronas TC. Dicho de otra manera, la despolarización prolongada inducida por el aumento de la conductancia  $I_h$  da origen a un periodo refractario en el que las neuronas TC no responden con ráfagas de rebote al tren de IPSPs producido por las ráfagas de las neuronas del nRT, conduciendo a una interrupción de la oscilación. La eliminación de  $I_h$  en las neuronas TC con bloqueadores específicos suprime la ADP que sigue a la terminación de los LTS y también suprime el comportamiento oscilatorio intermitente en estas neuronas; reforzando la idea de que  $I_h$  posee un rol sobre las oscilaciones<sup>50</sup>.

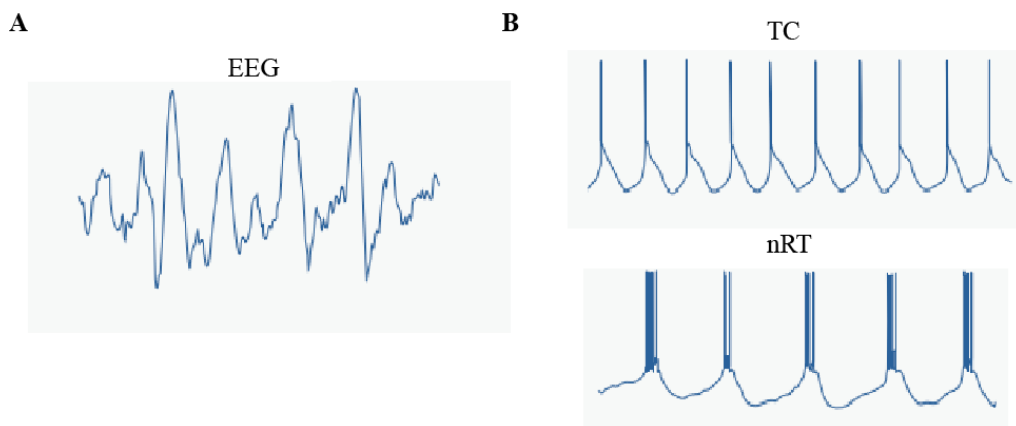


**Figura 1.11 Esquema talámico de la generación de oscilaciones tipo spindles.** (A) las conexiones recurrentes entre las neuronas del nRT y las TC generan un comportamiento oscilatorio. Las ráfagas del nRT producen ráfagas de rebote en las TC, que a su vez estimulan la generación de más ráfagas en las nRT. (B) el nRT es una red de neuronas acopladas mediante uniones GAP (mecanismo sincronizante) que además se conectan sinápticamente entre sí produciendo su propia inhibición (mecanismo desincronizante). Figura modificada de <sup>49</sup>.

### 1.5.6 Ondas delta

Expresadas en las fases más profundas del sueño N-REM se encuentran las ondas delta (0.5Hz a 4Hz) ver figura 1.12A. Estas oscilaciones pueden ser generadas en rodajas corticales y en rodajas talámica <sup>17,37</sup>; por lo que se considera que la manifestación del ritmo delta tiene una componente cortical y una talámica. Además de ser un ritmo global que se refleja en el EEG; las ondas delta pueden ser expresadas en neuronas del nRT y en las neuronas TC (Fig. 1.12B). Clásicamente, las oscilaciones delta en el Vm de las neuronas TC son el resultado de un mecanismo intrínseco que requiere la interacción entre las corrientes  $I_T$  e  $I_h$  <sup>51</sup>. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que la corriente T es suficiente para generar estas oscilaciones en neuronas TC; teniendo las demás corrientes sub-umbrales que estas neuronas expresan, un papel modulador de estas oscilaciones <sup>17,52,53</sup>.

La presencia del ritmo delta en el EEG requiere sincronización de una gran población de neuronas; sin embargo, aún en día no se conoce cómo contribuyen la corteza y el tálamo en la generación de las ondas delta que se manifiestan en el EEG durante el sueño profundo<sup>54</sup>. No obstante, las evidencias experimentales apuntan a un rol fundamental del tálamo en este ritmo. La alteración genética de una subunidad clave del canal Cav3.1 que mayoritariamente se expresa en neuronas TC suprime la generación de LTS en estas neuronas y como consecuencia su producción de oscilaciones delta<sup>55,56</sup>. Además, este modelo animal presenta alteraciones comportamentales durante las fases del sueño NREM; acompañados de una marcada disminución de las componentes en frecuencia delta en el EEG durante el sueño natural y bajo anestesia profunda; mostrando que las oscilaciones intrínsecas en la frecuencia delta por parte de las neuronas TC son un mecanismo clave en la manifestación de este ritmo a nivel global.



**Figura 1.12. EEG y oscilaciones del Vm durante el ritmo delta.** (A) Ritmo delta en el EEG. (B) contraparte celular del ritmo delta; donde se muestran las oscilaciones del Vm a frecuencia delta en una neurona TC (trazo superior) y en una neurona del nRT (trazo inferior). Figura modificada de<sup>54</sup>.

## 1.6 Epilepsia de ausencia

### 1.6.1 Descripción general de la enfermedad

La epilepsia es una enfermedad que afecta la calidad de vida de cerca de 70 millones de personas alrededor del mundo. En Argentina la cantidad de afectados por esta enfermedad se estima en cerca de 200.000. Según la liga internacional contra la epilepsia (ILAE, por sus siglas en inglés) hay dos grandes clasificaciones de epilepsia, las focalizadas y las generalizadas. Dentro de las epilepsias generalizadas se encuentran las epilepsias idiopáticas generalizadas (EGI) que se clasifican en 4 síndromes: epilepsia de ausencia en niños, epilepsia de ausencia juvenil, epilepsia mioclónica juvenil y epilepsia con crisis tónico-clónica solamente. Las EGI se presentan entre los 3 a 25 años y los pacientes que la padecen pueden presentar individualmente uno de estos cuatro síndromes o una combinación de ellos. Durante las crisis epilépticas, el EEG presenta oscilaciones llamadas complejos espiga-onda (SWD, por sus siglas en inglés) <sup>31,57,58</sup> con una frecuencia entre 2.5 a 5.5 Hz. Aunque los SWDs son un marcador común de todas las EGI, también se pueden presentar en otros tipos de epilepsia. Las crisis epilépticas suelen ocurrir durante la vigilia; la fase inicial del sueño (adormecimiento) y durante el despertar del sueño. Dentro de las comorbilidades asociadas a las EGI se encuentran los desórdenes del ánimo, ansiedad, trastorno de déficit de atención y desórdenes en el aprendizaje.

Nuestro foco de estudio se centra en los mecanismos celulares involucrados en la producción de SWDs que se generan durante las crisis epilépticas en la epilepsia de ausencia en niños y la epilepsia de ausencia juvenil (CAE y JAE, respectivamente por sus siglas en inglés); las cuales se presentan mayormente como una epilepsia de ausencia pura, es decir sin la intervención de los otros síndromes que engloba las EGIs. La CAE y JAE no involucran compromiso motor; las crisis de ausencia tienen una duración menor a 30 seg y se caracterizan por pérdida de conciencia sin pérdida de la postura. Los SWDs en el EEG presentan deflexiones de gran amplitud (entre 200 a 300  $\mu$ V) con una frecuencia típica de 3 a 4 Hz; que surgen y terminan de forma abrupta sobre un EEG de base normal <sup>32</sup>.

El término idiopático en las EGI hace referencia al desconocimiento de las causas que originan esta patología; consistentemente, las IGEs son consideradas desórdenes multigenéticos<sup>32</sup>. Sin embargo, las alteraciones genéticas asociadas a las CAE y JAE tienen en común la alteración de mecanismos que regulan la excitabilidad neuronal como por ejemplo, canales iónicos, transportadores iónicos y receptores sinápticos. Lo que apunta a que diversos mecanismos podrían estar involucrados en la alteración de la respuesta neuronal o de red, que en última instancia desencadenan las oscilaciones patológicas.

### **1.6.2 Bases neuronales de la epilepsia de ausencia**

Los complejos espiga-onda requieren de un alto nivel de sincronización, por un lado, la espiga refleja el disparo ordenado de muchas neuronas y, por otro lado, la onda se relaciona con un silencio global en las respuestas neuronales. Los mecanismos que desencadenan esta hipersincronización no son conocidos; sin embargo, debido a que las crisis epilépticas invaden y explotan la misma maquinaria celular y de conectividad usada para generar los ritmos cerebrales normales, se ha puesto énfasis sobre aquellos mecanismos que aumentan la sincronización de estos ritmos fisiológicos<sup>32</sup>. Se especula que durante el evento epiléptico se secuestran los mecanismos generadores de los ritmos fisiológicos para desencadenar el patrón oscilatorio patológico<sup>49</sup>.

Las crisis epilépticas involucran a la corteza y a varias estructuras subcorticales y, aunque no se conocen aún los mecanismos que generan estas crisis como se mencionó antes, hay consenso respecto a que su sustrato anatómico y funcional se centra en el circuito tálamo cortical<sup>32,33,59</sup>. En los estudios pioneros realizados en gatos se mostró que la penicilina (revisado en<sup>32</sup>), un bloqueador débil de receptores GABA<sub>A</sub>, induce en estos animales crisis epilépticas similares a las crisis CAE en humanos, y que tanto el tálamo como la corteza son necesarios para producir estas crisis. También, de un estudio pionero en gatos surge la relación entre los mecanismos celulares generadores de los ritmos del sueño-vigilia y los SWD<sup>30</sup>. En este último estudio se encontró que un 20% de los animales anestesiados presentaron de manera espontánea ondas patológicas (que los autores nombraron como ondas paroxísticas) en el EEG que son similares a los SWD; además registrando en simultáneo al

EEG la actividad eléctrica intracelular en las neuronas del nRT y las TC se pudo mostrar que estas neuronas presentan oscilaciones en su potencial de membrana con un patrón estereotipado similar a las oscilaciones presentes durante los ciclos del sueño.

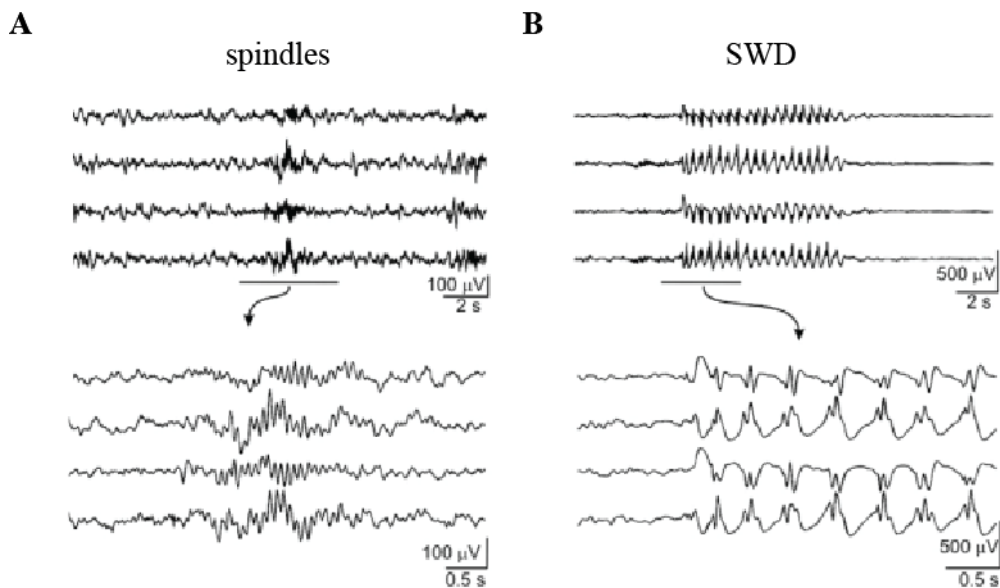
### 1.6.3 *Spindles* aberrantes

La hipótesis de los *spindles* aberrantes sugiere que alteraciones en la generación del ritmo *spindles* fisiológico podría ser el desencadenante de las oscilaciones SWD. En favor de esta hipótesis se encuentra un estudio que compara las crisis epilépticas en el modelo animal de penicilina, con las crisis en humanos; mostrando las similitudes clínicas entre ambos; además de mostrar que el 90% de las SWD se presentaron durante las fases superficiales del sueño; que se corresponde con la fase del sueño de las ondas *spindles* <sup>60</sup>. Además, ambos ritmos se extienden a toda la corteza y aparecen en el EEG como oscilaciones intermitentes con una duración similar (unos pocos segundos) y pueden ser registrados como un ritmo generalizado en diferentes áreas corticales (ver figura 13) <sup>49</sup>.

La hipótesis de los *spindles* aberrantes fue inicialmente apoyada por estudios clásicos *in vitro* e *in silico*. Estudiando los mecanismos celulares de la generación de *spindles* en rodajas talamocorticales se mostró que los *spindles* aberrantes pueden ser generados con un bloqueador específico de los receptores GABA<sub>A</sub> (bicuculina); la presencia de este bloqueador elimina las oscilaciones *spindles* en neuronas TC generando oscilaciones más lentas (3 a 4Hz) que involucran la activación de receptores GABA<sub>B</sub> <sup>61</sup>. El bloqueo de receptores GABA<sub>A</sub> genera ráfagas más prolongadas en el tiempo y con un mayor número de potenciales de acción montados en las neuronas del nRT; las cuales incrementan la activación de receptores GABA<sub>B</sub> sobre las neuronas TC. Además, empleando un modelo teórico del circuito nRT-TC se mostró que la eliminación de receptores GABA<sub>A</sub> en el modelo produce oscilaciones con mayor sincronización dentro del circuito <sup>62</sup>. En resumen, la hipótesis de los *spindles* aberrantes supone que el bloqueo de la inhibición intra-nRT permitiría la propagación de la oscilación a toda la red tálamo-reticular produciéndose la hipersincronización, cuya manifestación en el EEG son los SWDs. Esta hipótesis también es favorecida por experimentos en los cuales se han manipulado genéticamente los receptores GABA<sub>A</sub> en ratones: la inactivación

selectiva de receptores GABA<sub>A</sub> del nRT mediante la eliminación de la subunidad β3 (que se expresa en nRT pero no en neuronas TC) da como resultado un fenotipo compatible con crisis de ausencia y la aparición de SWDs en el EEG<sup>63</sup>. Por otro lado, el bloqueo farmacológico de las sinapsis eléctricas del nRT (las cuales promueven la sincronización) en modelos animales de epilepsia de ausencia disminuye el número y la duración de los episodios convulsivos<sup>64</sup>.

Sin embargo, esta hipótesis es cuestionada: una crítica llama la atención sobre el hecho de que en humanos y en modelos animales de epilepsia de ausencia, los SWD se presentan mayormente en vigilia y no en las fases superficiales del sueño, contradiciendo los resultados de<sup>60</sup>; además se cuestiona que ambos ritmos no comparten el mismo origen, donde los SWD tienen un inicio cortical y los *spindles* son iniciados en el tálamo. Por último, se cuestiona que los IPSPs registrados en las neuronas TC en modelo animales de epilepsia de ausencia son producidos por la activación de receptores tanto GABA<sub>A</sub> como GABA<sub>B</sub>; contrariando la hipótesis que los *spindles* aberrantes se deben al bloqueo de receptores GABA<sub>A</sub> (revisado en<sup>65</sup>).



**Figura 1.13. Similitudes entre los ritmos *spindles* y SWDs.** Registros del mismo paciente. (A) Obtenidos con cuatro canales del EEG durante la fase del sueño del ritmo *spindle*. (B) Oscilaciones SWDs obtenidas con los mismos canales de registros de (A) durante una crisis epiléptica. Figura modificada de<sup>49</sup>.

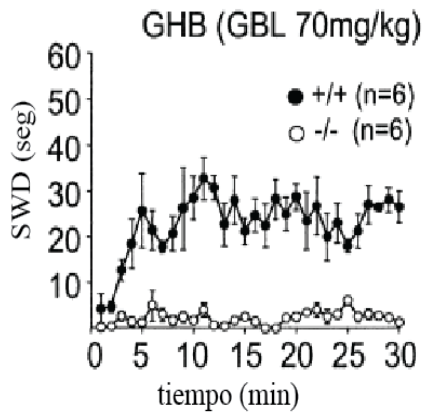
#### 1.6.4 Ondas delta

Por otro lado, existen evidencias que indican que los SWDs comparten mecanismos moleculares y celulares con las ondas delta. La eliminación genética de los canales de calcio de bajo umbral (Cav3.1) en ratones produce la eliminación de ráfagas en neuronas TC; la consecuente ausencia de oscilaciones en la banda delta, y alteraciones del ciclo sueño-vigilia, al mismo tiempo que no se ve afectada la presencia de *spindles*<sup>55,66,67</sup>. Más aún, este modelo genético es resistente a la inducción farmacológica de epilepsia de ausencia con GHB (modelo farmacológico de epilepsia de ausencia) y con la droga bacoflen, un agonista de receptores GABA<sub>B</sub><sup>56</sup> (ver figura 1.14). Consistente con la idea de que la epilepsia de ausencia podría resultar de la alteración de la función de uno o varios de los canales iónicos que subyacen a la generación de ritmos normales, la sobre-expresión de los canales de calcio tipo T (Ca<sub>v</sub>3.1) en ratones resulta en un fenotipo de epilepsia de ausencia puro; con SWD espontáneos que son suprimidos con la droga anti-ausencia Etosuximida<sup>68</sup>. Además, se ha encontrado un aumento en las corrientes tipo T de neuronas TC en varios modelos animales de epilepsia de ausencia (revisado en<sup>69</sup>). De forma similar, la eliminación del canal catiónico HCN2, el principal substrato molecular de la corriente catiónica activada por hiperpolarización I<sub>h</sub> en neuronas TC, también resulta en crisis de ausencia<sup>70</sup>.

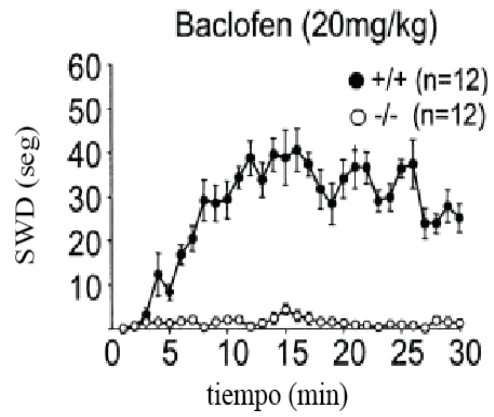
A toda esta evidencia se suma un trabajo reciente en el cual se demuestra con métodos de optogenética, que la inducción o supresión de ráfagas repetitivas en las neuronas TC se correlacionan respectivamente con la inducción o supresión de episodios convulsivos y SWDs en dos modelos animales de epilepsia de ausencia (rata WAGRij y ratón Stargazer)<sup>33</sup>. No obstante, el rol de las ráfagas de las neuronas TC en la generación de los SWD es aún discutida<sup>71</sup>. Por lo que se considera que aún se desconocen los mecanismos celulares y sinápticos que desencadenan un aumento en la sincronización del CTC que lleva a la manifestación de los SWD<sup>59</sup>.



A



B



**Figura 1.14. El ratón KO de  $I_T$  es resistente a la inducción de epilepsia de ausencia.** Cuantificación de SWDs extraídos del EEG durante las crisis epilépticas en un ratón con inducción farmacológica de epilepsia de ausencia (modelo farmacológico). (A) ratón control más GHB (círculos negros) y ratón con el KO de  $I_T$  más GHB (círculos blancos). (B) similar a (A) pero con la droga baclofen. Figura modificada de <sup>56</sup>.

## **1.7 Objetivos de la tesis**

El objetivo general de la tesis fue determinar cuál es la función de las distintas conductancias sub-umbrales de las neuronas TC en la generación de oscilaciones fisiológicas y patológicas en el circuito talamocortical, y cómo dicha función se ve modificada por las distintas combinaciones de entradas sinápticas. Para el abordaje del estudio se utilizaron herramientas computacionales (modelo neuronal TC) y experimentales (registros electrofisiológicos); que fueron empleadas de forma combinada para llevar adelante los objetivos específicos:

1. Dinámica espacio-temporal de la interacción entre las entradas sinápticas y las propiedades intrínsecas de neuronas talamocorticales, y su impacto sobre la transmisión de información.
2. Mecanismos intrínsecos y sinápticos responsables por los complejos espiga-onda en un modelo computacional del sistema talamocortical.
3. Farmacodinamia de agentes anticonvulsivantes en neuronas talamocorticales.

## Capítulo 2

### **Papel de la corriente de potasio rectificadora de entrada $I_{Kir}$ en la generación del disparo repetitivo en ráfagas en neuronas talamocorticales**

#### **2. Introducción**

El modo de disparo en ráfagas repetitivas de las neuronas talamocorticales es expresión del comportamiento oscilatorio sub-umbral de estas neuronas. Este modo de disparo resulta de la interacción entre las propiedades intrínsecas de las neuronas TC y las conexiones sinápticas del circuito neuronal del que forman parte. Centrándonos en las propiedades intrínsecas de estas neuronas, en este capítulo se estudiará el rol amplificador de la corriente de potasio rectificadora hacia adentro  $I_{Kir}$  en las oscilaciones sub-umbrales del potencial de membrana, combinando técnicas electrofisiológicas y análisis de sistemas dinámicos.

#### **2.1 Breve introducción a la teoría de Sistemas Dinámicos**

La teoría de Sistemas Dinámicos (SD) es una rama de la matemática que permite estudiar cómo evoluciona en el tiempo un modelo o sistema determinista, a través del análisis cualitativo de los cambios que transita debido a perturbaciones en las variables dinámicas que lo describen. Un SD se compone de un conjunto finito de variables que describen su estado junto con una ley que describe cómo estas variables evolucionan en el tiempo<sup>3</sup>. El conjunto de variables dinámicas que constituyen un modelo neuronal basado en conductancias son el voltaje de membrana ( $V_m(t)$ ) y las componentes de activación/inactivación de las corrientes iónicas que la neurona expresa. Las ecuaciones diferenciales que modelan el comportamiento de estas variables, tales como las ecuaciones tipo Hodgkin-Huxley (ver capítulo 1), conforman un sistema dinámico neuronal. Por ejemplo, si se desea estudiar la transición del estado de reposo al estado excitado, en el cual ocurre el disparo de potenciales de acción, usando el análisis de SD, se puede plantear un modelo neuronal que contenga las ecuaciones diferenciales que describen las corrientes necesarias para producir esos potenciales de acción, junto con las corrientes de fuga (Leaks) y la

capacitancia que modelan las propiedades pasivas. Un modelo mínimo con estas características puede ser generado combinando la corriente persistente de sodio ( $I_{NaP}$ ), la corriente persistente de potasio ( $I_K$ ) y una corriente Leak genérica que simule las corrientes leak de sodio y de potasio ( $I_{leak}$ ), ver ecuaciones en figura 2.1A. Dado que  $I_{NaP}$  posee una cinética de activación mucho más rápida que la variable  $V_m(t)$ , es posible reducir aún más el modelo asumiendo la activación ( $m_{NaP}$ ) de la  $I_{NaP}$  como instantánea de tal forma que se elimina su dependencia temporal (ver ecuación (3) Fig.2.1A). En este caso, el modelo mínimo que reproduce la transición del estado de reposo al estado excitable contiene solo dos variables dinámicas: el voltaje de membrana  $V_m(t)$  y la activación de  $I_K$  ( $m_K(t)$ ). Esto es equivalente a decir que nuestro sistema dinámico está conformado por dos dimensiones (ver ecuaciones (1) y (2) Fig. 2.1A).

Este SD nos permite interpretar de forma geométrica lo que ocurre durante la respuesta de una neurona ante un estímulo de corriente o un potencial excitatorio pos-sináptico (EPSP por su sigla en inglés). En primera instancia, la aplicación de estímulos sub-umbrales a la neurona en reposo producen pequeñas desviaciones del potencial de membrana sin apartarse del estado de equilibrio (panel superior de la figura 2.1B). Desde una perspectiva dinámica, este estado de equilibrio se representa como un punto fijo (PF) estable. El diagrama de fases (Fig. 2.1B panel inferior) ilustra la evolución temporal de cada una de las variables en función de la otra de forma simultánea; la activación de la corriente de potasio  $m_K(t)$  en función del potencial de membrana  $V_m(t)$  y, recíprocamente,  $V_m(t)$  en función de  $m_K(t)$ . En el diagrama, las flechas indican que después de perturbaciones sub-umbrales el sistema siempre retorna al equilibrio o punto fijo estable sin alejarse mucho de él. Por otro lado, un estímulo supra-umbral (B) desencadena un potencial de acción (Fig. 2.1C panel superior) que en el diagrama de fases (Fig. 2.1C panel inferior) se representa como una trayectoria orbital (una órbita) que incursiona en diferentes valores de  $V_m(t)$  y de  $m_K(t)$  lejos del equilibrio para finalmente volver a él. Por último, en los paneles de la derecha de la figura 2.1D se ilustra el disparo repetitivo de potenciales de acción ante la aplicación de un estímulo sostenido. En este caso el diagrama de fases (Fig. 2.1D panel inferior) muestra una trayectoria (órbita) cerrada y aislada que representa a las oscilaciones sostenidas en el tiempo. A este tipo de trayectoria se la conoce en el análisis de sistemas dinámicos como ciclo límite (CL). Las figuras 2.1C y 2.1D también ilustran la transición (denominada bifurcación),

inducida por estímulos diferentes, de un diagrama de fases en el que se regresa a un punto fijo estable (punto negro en el panel del medio) a un diagrama de fases en el que este punto fijo estable desaparece dando lugar a la aparición de un punto fijo inestable (punto blanco en el panel de la derecha) alrededor del cual orbita un ciclo límite. En esta última condición, el punto fijo inestable repele las trayectorias mientras que el ciclo límite las atrae dando lugar a la periodicidad. La aparición de un ciclo límite en la dinámica neuronal muestra la presencia de oscilaciones sostenidas en el tiempo, si las trayectorias (flechas en el retrato de fases) se acercan al CL, se dice que éste es estable, por el contrario, si se alejan de él, el CL es inestable.

A

$$(1) \quad C \frac{dV}{dt} = I - g_{leaks}(V - E_{leaks}) - g_{NaP} m_{\infty NaP}(V - E_{Na}) - g_K m_{\infty K}(V - E_K)$$

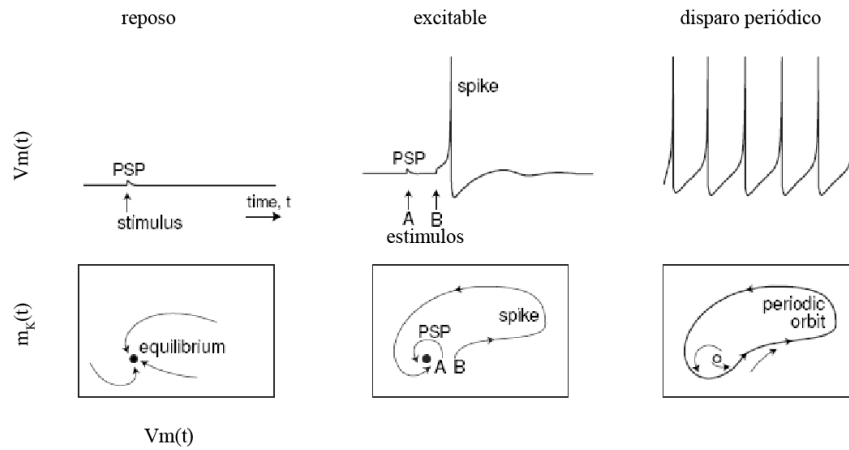
$$(2) \quad \frac{dm_K}{dt} = \frac{m_{K\infty}(V) - m_K}{\tau_K(V)}$$

$$(3) \quad \frac{dm_{NaP}}{dt} = \frac{m_{NaP\infty}(V) - m_{NaP}}{\tau_{NaP}(V)} \Rightarrow m_{NaP}(t, V) = m_{\infty NaP}(V)$$

B

C

D



**Figura 2.1. Respuesta del modelo  $I_{NaP}-I_K-I_{leaks}$ .** (A) ecuaciones del SD. (B) un estímulo (PSP) no saca al sistema del reposo (panel superior), que en el diagrama de fases se representa por la presencia de un PF estable (panel inferior). (C) un estímulo B mayor provoca la generación de un potencial de acción (respuesta excitable, panel superior) que en el diagrama de fases se representa por una órbita abierta que después del estímulo B retorna al reposo o PF estable (panel inferior). (D) un mayor estímulo sostenido en el tiempo lleva al sistema a disparar potenciales de acción de forma periódica (panel superior) y un diagrama de fases con la presencia de un CL (panel inferior). Figura modificada de <sup>3</sup>.

En resumen, la variación de parámetros que perturben un SD pueden introducir cambios estructurales o cualitativos en el diagrama de fases; por ejemplo, cambios en la estabilidad de los PF, la aparición o desaparición de PF y/o ciclos límites; estos cambios son llamados bifurcaciones y los valores de los parámetros donde ocurren se llaman puntos de bifurcación <sup>72</sup>.

Se pueden generar sistemas dinámicos de 1, 2 o más dimensiones. Por ejemplo, las famosas ecuaciones de Hodgkin y Huxley <sup>5</sup> representan un sistema dinámico de 4 dimensiones. Una gran diferencia que poseen los sistemas continuos de 1 dimensión respecto al resto, es que no pueden presentar oscilaciones, los tipos de bifurcaciones que transitan solo están relacionados con la aparición o aniquilación de puntos fijos <sup>72</sup>. Las oscilaciones que acompañan los ciclos límites se dan para SD de 2 o más dimensiones; esta característica describe el concepto de un modelo mínimo, el cual es capaz de generar oscilaciones con las mínimas componentes, las cuales por sí solas no podrían producirlas. Un ejemplo de modelo mínimo es el de la figura 2.1, la receta para generarlo fue usar una combinación de una corriente amplificadora  $I_{NaP}$  con una corriente resonadora  $I_K$ , cuyas características son discutidas en el siguiente capítulo (Capítulo 3).

Desde una perspectiva histórica Alan Hodgkin fue pionero en estudiar cambios cualitativos en la dinámica neuronal ante variaciones de un estímulo, mucho antes de que fuera desarrollada la teoría de Sistemas Dinámicos. Hodgkin <sup>73</sup> describió 3 diferentes comportamientos excitables en el axón gigante de calamar, cuando fueron estimulados con los mismos pulsos de corriente constante. Esta clasificación permite describir la excitabilidad neuronal de varios tipos de neuronas según su tasa o frecuencia de disparo (potenciales de acción) cuando son estimuladas con pulsos de corriente crecientes, tal que superan su umbral de disparo. Las neuronas clase 1 pueden sostener tasas de disparo a muy bajas frecuencias, las cuales aumentan en forma continua conforme aumenta el estímulo de corriente. Las clase 2 no disparan potenciales de acción a muy bajas frecuencias y su tasa de disparo es acotada a un rango de frecuencia que se mantiene más o menos constante ante los aumentos de inyección de corriente. Por último, la clase 3 poseen respuestas no definidas, pueden disparar un sólo potencial de acción cuando se las estimula con pulsos crecientes de corriente de tal forma que no puede medirse su tasa de disparo, o generan más de un potencial de acción,

pero para valores de inyecciones de corriente tan grandes que están fuera de un rango fisiológico.

La teoría de Sistemas Dinámicos abarca la clasificación de Hopf y amplía la información del comportamiento excitable de las neuronas<sup>74,75</sup>. Para sistemas dinámicos de dos o más dimensiones y contemplando la variación de un único parámetro existen sólo 4 diferentes tipos de bifurcaciones que pueden explicar qué tipo de excitabilidad posee una neurona, en la transición desde el estado de reposo al estado excitable. Estas son: saddle-node, saddle-node en ciclo invariante, subcrítica Andronov-Hopf y supercrítica Andronov-Hopf.

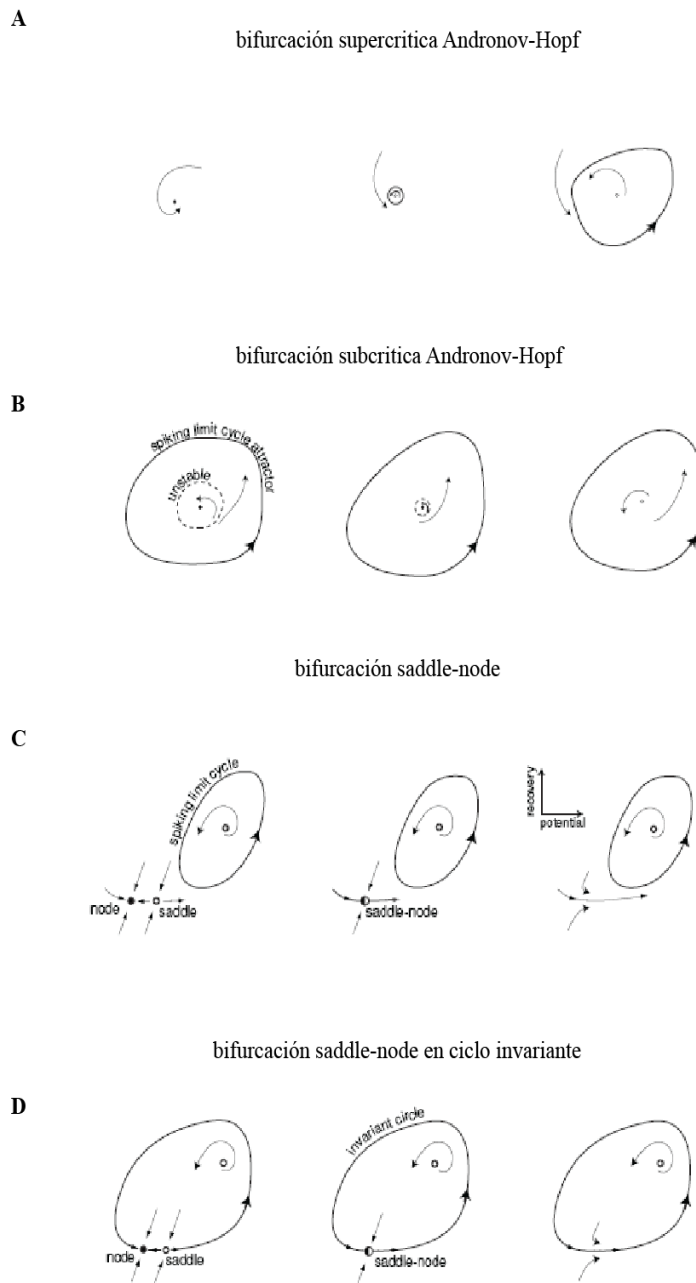
-La bifurcación **supercrítica de Hopf** se caracteriza por un PF estable que ante un cambio de parámetro cambia a un PF inestable con el surgimiento de un ciclo límite estable (Fig. 2.2A); el cambio del PF estable a inestable junto a la aparición del CL lleva a que el SD comience a oscilar con oscilaciones de pequeña amplitud que aumentan con los cambios del parámetro.

-La bifurcación **subcrítica de Hopf** se caracteriza por un PF estable rodeado de un CL inestable y un CL estable que envuelve a estos últimos (Fig. 2.2B), este tipo de bifurcación coexiste con ciclos límites, lo que le confiere dos características al SD, presentar histéresis ante los cambios del parámetro que atraviesan de un lado al otro el punto de bifurcación y que el sistema entra al régimen oscilatorio con una gran amplitud en las oscilaciones.

-La bifurcación de **saddle-node** posee dos PF, uno inestable y otro estable, y un CL estable rodeando a otro PF inestable (Fig. 2.2C); el PF estable representa el punto de equilibrio del SD, ante cierto cambio de parámetro ambos PF (estable e inestable) colisionan y se aniquilan; cuando el punto de equilibrio desaparece el SD salta al régimen oscilatorio dado que es atraído por el CL estable; esta bifurcación al igual que la bifurcación subcrítica de Hopf presenta histéresis y salta al régimen oscilatorio con una gran amplitud.



-La bifurcación **saddle-node de ciclo invariante**, posee los dos PF estable e inestable (característicos de la bifurcación de saddle-node) junto a un ciclo invariante que contiene a otro PF inestable. Después del punto de bifurcación los puntos fijos estable e inestable se aniquilan y surge un CL estable que contiene un PF inestable que da lugar a las oscilaciones periódicas en el SD (Fig. 2.2D).



**Figura 2.2. Bifurcaciones que llevan al SD neuronal a la transición de su estado de reposo al comportamiento oscilatorio.** (A) B. supercrítica Andronov-Hopf, un cambio en el parámetro de bifurcación lleva a que el SD cambie la estabilidad del PF (estable a inestable) acompañado del surgimiento de un CL estable que aumenta progresivamente en amplitud (B) B. subcrítica Andronov-Hopf, el SD está formado por un PF estable rodeado por un CL inestable y otro CL estable, el cambio de parámetro lleva a que el SD presente un nuevo PF inestable rodeado de un CL estable de gran amplitud (C) B. saddle-node, el SD está formado por dos PFs uno estable y otro inestable, junto a un PF inestable rodeado de un CL estable, el cambio de parámetro produce la colisión del PF estable con el PF inestable, preservando la presencia del PF inestable y del CL estable que lo rodea. (D) B. saddle node en ciclo invariante; el SD posee dos PF uno estable y otro inestable junto a un ciclo invariante que envuelve otro PF inestable, el cambio de parámetro lleva a que los dos PF colisionen dando lugar a un CL estable que envuelve un PF inestable. Figura modificada de <sup>3</sup>.

### 2.1.1 Diagramas de fases y de bifurcaciones para SD 2D

Como ya se mencionó antes, el diagrama de fases permite visualizar el comportamiento del sistema de forma cualitativa. Específicamente corresponde a una representación geométrica del SD que muestra la evolución temporal de las variables dinámicas según diferentes condiciones iniciales. Para entenderlo mejor vamos a volver al modelo  $I_{NaP}$ - $I_K$ -Leaks de la figura 2.1; las variables dinámicas  $V_m(t)$  y  $m_K(t)$  de este SD están descritas cada una por una función que describe su evolución; las cuales pueden ser pensadas de forma genérica como  $f(V_m, m_K)$  y  $g(V_m, m_K)$  (ver Fig. 2.3A). Para cada punto  $(V_m, m_K)$  del diagrama de fases ( $V_m(t)$  versus  $m_K(t)$ ) ambas funciones representan un vector  $(f(V_m, m_K), g(V_m, m_K))$  cuya dirección indica la evolución temporal de las variables; siendo posible representar todos los puntos del diagrama de fases con sus correspondientes vectores, lo que da como resultado un campo vectorial en el plano (Fig. 2.3C) el cual indica, según el punto inicial, la dirección del movimiento del SD. El conjunto de puntos que delimitan un cambio en la dirección horizontal del campo vectorial se denominan *nullclina* (en este ejemplo *nullclina*  $V_m(t)$ ); por otro lado, el conjunto de puntos que delimitan un cambio en la dirección vertical del campo vectorial representan la *nullclina* de la otra variable dinámica, en este caso de  $m_K(t)$ . Desde un punto de vista puramente matemático las *nullclinas* se obtienen de los ceros de las derivadas temporales  $dV_m/dt=0$  (*nullclina*  $V_m$ ) y  $dm_K/dt=0$  (*nullclina*  $m_K$ ); y sobre ellas sus respectivas variables dinámicas no crecen ni decrecen. El punto donde las *nullclinas* se intersectan es donde ambas derivadas temporales son simultáneamente cero, este punto representa un PF del SD; dado que las *nullclinas* pueden intersectarse en más de un punto, puede existir más de un PF; los cuales desde un punto de vista electrofisiológico representan los ceros en la relación corriente-voltaje en el estado estacionario <sup>44</sup>. Para el modelo  $I_{NaP}$ - $I_K$ -Leaks, y bajo la situación representada en la figura 2.1C, el SD cumple la condición ( $dV/dt=dm_K/dt=0$ ) en un solo punto (Fig. 2.3C), este PF equivale al punto de equilibrio o reposo del SD.

Las *nullclinas* de  $V_m$  y  $m_K$  dividen el campo vectorial en 4 regiones (ver Fig. 2.3C); en líneas punteadas y siguiendo la dirección de las flechas se indica la evolución del SD; el cual representa la situación esquematizada de la figura 2.1C; donde una perturbación hace que el sistema se aleje del equilibrio y genere una órbita que incursiona en los diferentes valores de  $V_m(t)$  y  $m_K(t)$  hasta retornar al reposo (PF estable) (comparar ambas figuras).

Como se explicó antes, esta incursión representa la generación de un potencial de acción. En el diagrama de fases (Fig. 2.3C) y partiendo del reposo, la generación de un potencial de acción está representado primero por la región (a), donde ambas variables  $V_m(t)$  y  $m_K(t)$  crecen; el abrupto aumento de  $I_{NaP}$  empuja al  $V_m$  (despolarización) hacia la generación del potencial de acción; por su parte la lenta activación de  $I_K$  (ver cómo  $m_K$  crece y se aleja del cero) provoca que esta corriente no sea lo suficientemente grande para oponerse a la despolarización. Segundo, en la región (b)  $V_m(t)$  disminuye, pero  $m_K(t)$  todavía aumenta; por un lado, el canal de sodio comienza a cerrarse (por ende,  $I_{NaP}$  disminuye) y, por otro lado,  $I_K$  aumenta su activación (ver valores  $m_K$ ); por lo tanto, ambas situaciones contribuyen a que el  $V_m$  decaiga (repolarización). Tercero, en la región (c)  $V_m(t)$  y  $m_K(t)$  decrecen, esto se debe a que  $I_{NaP}$  es prácticamente cero y que los canales de potasio débilmente, pero aún activos, provocan que el  $V_m(t)$  decaiga más allá de su valor de reposo (hiperpolarización). Por último, la región (d) representa el retorno al reposo donde  $V_m(t)$  aumenta hasta alcanzar el equilibrio, por su parte  $m_K(t)$  aún sigue disminuyendo; la despolarización que retorna el  $V_m(t)$  al reposo se debe a la débil activación de  $I_{NaP}$  y a que  $I_K$  es cercana a cero, ya que  $m_K$  se acerca a su estado no permisivo ( $m_K \rightarrow 0$ ) y por lo tanto no contrarresta la despolarización.

A

$$\frac{dV}{dt} = \frac{f(V, m_K)}{g(V, m_K)} \left[ I - g_{leaks}(V - E_L) - g_{NaP} m_\infty(V - E_{Na}) - g_K m_K(V - E_K) \right]$$

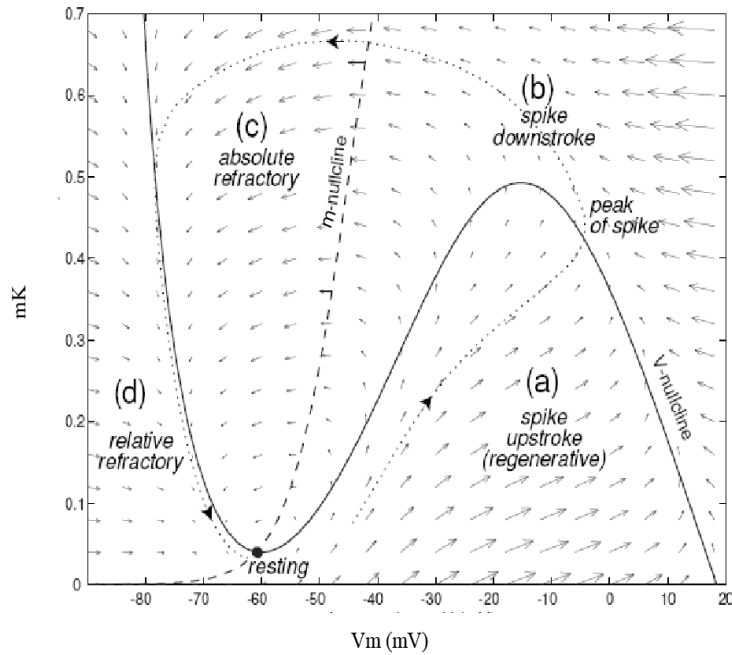
$$\frac{dm_K}{dt} = \frac{m_{K\infty}(V) - m_K}{\tau_K(V)}$$

B

$$\frac{dV}{dt} = 0 \quad \text{nullclina } V_m \quad m_K = \frac{I - g_{leaks}(V - E_L) - g_{NaP} m_\infty(V - E_{Na})}{g_K (V - E_K)}$$

$$\frac{dm_K}{dt} = 0 \quad \text{nullclina } m_K \quad m_K = m_{K\infty}$$

C



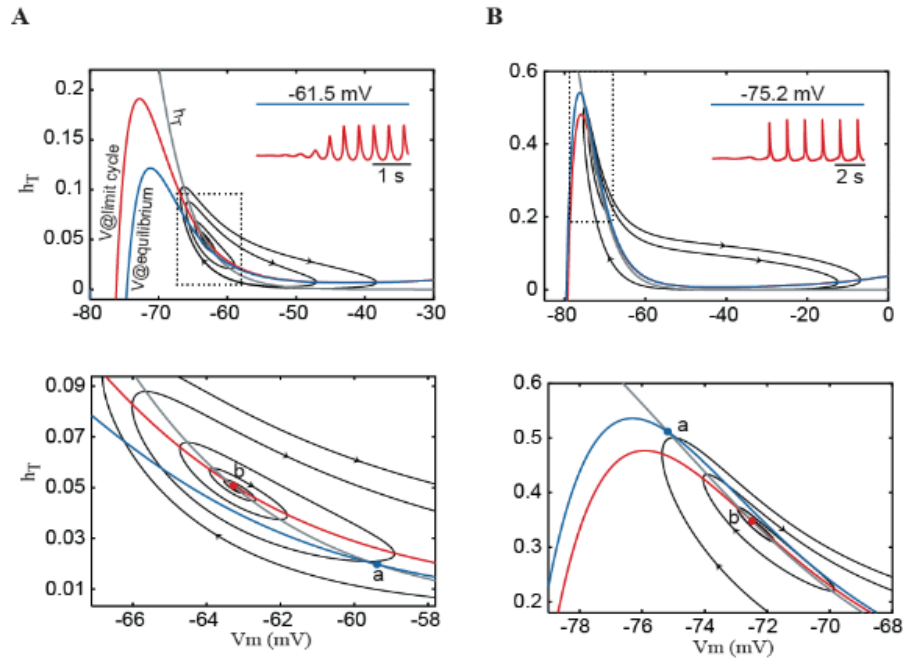
**Figura.2.3. Diagrama de fases del modelo  $I_{NaP}$ - $I_K$ - $I_{leaks}$ .** (A) modelo del SD de dos dimensiones conformados por las variables  $V_m$  y  $m_K$ . (B) Nullclinas del modelo. (C) representación gráfica del SD en el diagrama de fases  $m_K$  versus  $V_m$  para la condición excitable correspondiente a la Fig. 2.1C. Figura modificada de <sup>3</sup>.

Si bien es posible representar el diagrama de fases 2D como un campo vectorial, lo usual en sistemas dinámicos es representar el diagrama de fases sólo con las *nullclinas* correspondientes al sistema de estudio y las trayectorias de interés; siendo esta forma de representación la que se implementó en el presente capítulo.

Un ejemplo de esto último se muestra en la figura 2.4; el diagrama de fases extraído de <sup>52</sup> corresponde al modelo mínimo de la corriente iónica de calcio de bajo umbral  $I_T$  (modelo  $I_T$ -Leaks); en este estudio se analizó la capacidad de  $I_T$  de generar por si sola oscilaciones sub-umbrales; y dado que la activación de esta corriente depende del  $V_m$ , se analizó su comportamiento oscilatorio bajo dos potenciales de membrana diferentes; por un lado se analizó la transición del reposo al régimen oscilatorio desde un  $V_m$  despolarizado (-61.5mV, Fig. 2.4A); y por otro lado, se analizó esta misma transición pero partiendo de un  $V_m$  en reposo más hiperpolarizado (-75.2mV, Fig. 2.4B); estos cambios en el potencial de membrana se generaron con una inyección de corriente constante. El modelo  $I_T$ -Leaks tiene dos dimensiones, dado que la activación del canal T ( $m_T$ ) se simuló como instantánea, al perder la dependencia temporal,  $m_T$  quedó dependiendo solamente del voltaje de membrana, de esta forma el sistema dinámico está conformado por las variables voltaje ( $V_m(t)$ ) y la inactivación del canal T ( $h_T(t)$ ). En la figura 2.4A (panel superior) el diagrama de fases muestra las *V-nullclinas* para dos valores del parámetro, de tal forma de ilustrar en una sola gráfica el punto de bifurcación; como puede verse en la figura el cambio de parámetro (dado por una inyección de corriente negativa) no modifica la *nullclina* de  $h_T$  (curva gris), en cambio la *nullclina* de  $V_m(t)$  se corre hacia arriba (ver cambios en curva azul y curva roja); el cambio en el parámetro provoca que el punto de equilibrio (a) pierda estabilidad y se convierta en un punto fijo inestable al momento de la bifurcación (b) (ver ampliación en Fig.2.4A panel inferior); la dirección de las flechas que se alejan del punto (b) indican que este nuevo PF es inestable y sus trayectorias periódicas, que aumentan en amplitud, indican la aparición de un CL. En el *inset* de la figura se muestra la evolución temporal del voltaje de membrana y como éste pasa del equilibrio (trazo azul) a las oscilaciones sostenidas en el tiempo (trazo rojo), después de producirse la bifurcación.

Una situación similar se muestra en la figura 2.4B, la variación del parámetro (inyección de corriente negativa) cambia sólo las *nullclinas* de  $V_m(t)$  (ver cambios en curva azul y curva roja); nuevamente las *nullclinas*  $V_m(t)$  y  $h_T$  se cruzan en un sólo punto, el cambio de parámetro provoca la pérdida de estabilidad del PF (a) y el surgimiento de trayectorias periódicas, que a diferencia del caso anterior presenta órbitas que inician con una gran amplitud (ver ampliación en Fig.2.4B panel inferior). Este efecto puede verse mejor en el *inset* de la figura, donde se grafican los cambios en el voltaje de membrana antes y después del punto de bifurcación (b), nuevamente se ve cómo la bifurcación produce que el sistema cambie su comportamiento y pase de un estado de reposo (trazo azul) a las oscilaciones periódicas (trazo rojo).

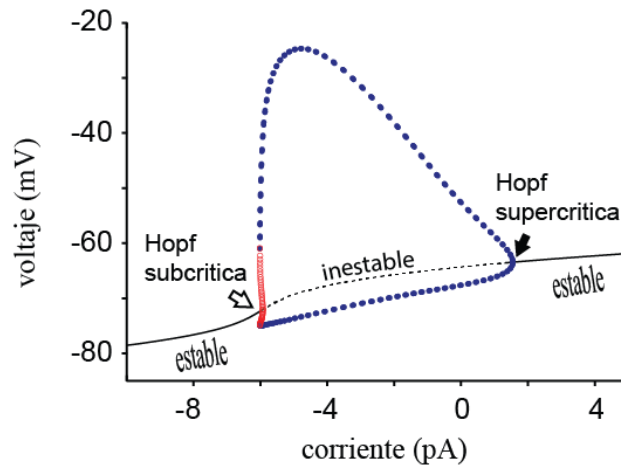
En resumen, a través del comportamiento del sistema en el diagrama de fases podemos ver que el SD presentó un solo PF para los dos potenciales de membrana en reposo que se analizaron, también podemos ver que no se creó ni destruyó ningún PF, el cambio en el parámetro para ambas condiciones provocó la pérdida o cambio de estabilidad del PF, que pasó de ser estable y representar el equilibrio/reposo del sistema, a ser inestable y alejar las trayectorias hacia el CL estable. Los cambios cualitativos en el diagrama de fases, indican que el sistema transitó bifurcaciones tipo Andronov-Hopf; las características de las oscilaciones a  $V_m$  despolarizados (-61.5mV) y a  $V_m$  hiperpolarizados (-75.2mV), que pueden verse en el trazo temporal del voltaje, indicarían una bifurcación supercrítica de Hopf en -61.5mV y una bifurcación subcrítica de Hopf en -75.2mV.



**Figura 2.4. Diagrama de fases modelo mínimo IT-Leaks.** Diagrama de fases de la variable de inactivación de  $I_T$  ( $h_T$ ) versus el voltaje de membrana ( $V_m$ ) para dos  $V_m$  en reposo diferentes, en el (panel inferior) se muestra un zoom de la zona delimitada por las líneas punteadas del (panel superior). (A) Usando un valor de  $P_{Tmax}=7.0 \times 10^{-5}$  cm/seg e inyección de corriente de (6pA) el sistema se estabilizó en un  $V_m$  despolarizado de -61.5mV (trazo azul inset panel superior); donde la nullclina  $h_T$  (curva gris) y la nullclina  $V_m$  (curva azul) se cruzan en un único punto ((a) ver panel inferior) que representa el PF estable del sistema. Una inyección de corriente de (-2pA) preservo la nullclina  $h_T$  pero modificó la nullclina  $V_m$  (curva roja) modificando el PF del sistema ((b) panel inferior) que pasó de ser estable a inestable, además las trayectorias cerradas del sistema muestran la aparición de un CL estable que llevan al sistema a oscilar de forma periódica (trazo rojo del  $V_m$  inset panel superior). (B) para igual valor de  $P_{Tmax}$  y una inyección de corriente de (-7pA) el sistema se estabilizó en -75.2mV (trazo azul inset panel superior) nuevamente ambas nullclinas se intersecan en un único PF estable ((a) ver panel inferior). Un cambio en la inyección de corriente de (-6pA) modifica la nullclina  $V_m$  (trazo rojo) y corre el PF hacia valores del  $V_m$  más despolarizados ((b), ver panel inferior) cambiando su estabilidad y provocando el surgimiento de un CL que lleva a que el SD presente nuevamente oscilaciones periódicas (trazo rojo, inset panel superior). Figura modificada de <sup>52</sup>.



Además del diagrama de fase, los diagramas de bifurcaciones son otra herramienta del análisis dinámico útiles para ver el estado de evolución del sistema con los cambios del parámetro; recordar que nuestro estudio contempla la variación de un único parámetro (matemáticamente definido como codimensión-1), el cual puede ser cualquier parámetro dentro de las ecuaciones que definen el SD en estudio. En la figura 2.5 puede verse un diagrama de bifurcaciones extraído de <sup>52</sup>, el cual corresponde al mismo SD mostrado en la figura anterior (modelo  $I_T$ -Leaks); en el diagrama de bifurcaciones se grafica una variable dinámica del sistema versus el parámetro de bifurcación; en este ejemplo se grafica una curva voltaje / corriente, con el potencial de membrana en el (eje vertical) y la corriente (parámetro de bifurcación) en el (eje horizontal); de tal forma de poder analizar el comportamiento oscilatorio del sistema en función de los cambios en el potencial de membrana. Cada punto de la gráfica representa un estado del sistema (PF) a medida que el parámetro cambia; las líneas negras continuas representan PF estables (estados de equilibrio) y las líneas negras punteadas PF inestables; las flechas indican donde ocurren los puntos de bifurcación, específicamente la flecha negra muestra la bifurcación de Hopf supercrítica a  $V_m$  más depolarizados (-61.5mV, comparar con Fig. 2.4A) y la flecha blanca la bifurcación de Hopf subcrítica a  $V_m$  más hiperpolarizados (-75.2mV, comparar con Fig. 2.4B). Por último, los puntos azules muestran las diferentes amplitudes del ciclo límite estable, específicamente el sistema está oscilando con una amplitud en voltaje indicada en los valores que toma cada punto azul para una dada corriente.



**Figura 2.5. Modelo  $I_T$ -Leaks.** Diagrama de bifurcaciones  $V_m$  versus corriente inyectada para  $PT_{max}=7.0 \times 10^{-5}$  cm/seg. Las líneas continuas negras representan PF estables y la línea discontinua negra PF inestables; los puntos azules representan la amplitud de los CL que cambian con la corriente inyectada. Figura modificada de <sup>52</sup>.

### 2.1.2 Características en la dinámica neuronal según el tipo de bifurcación

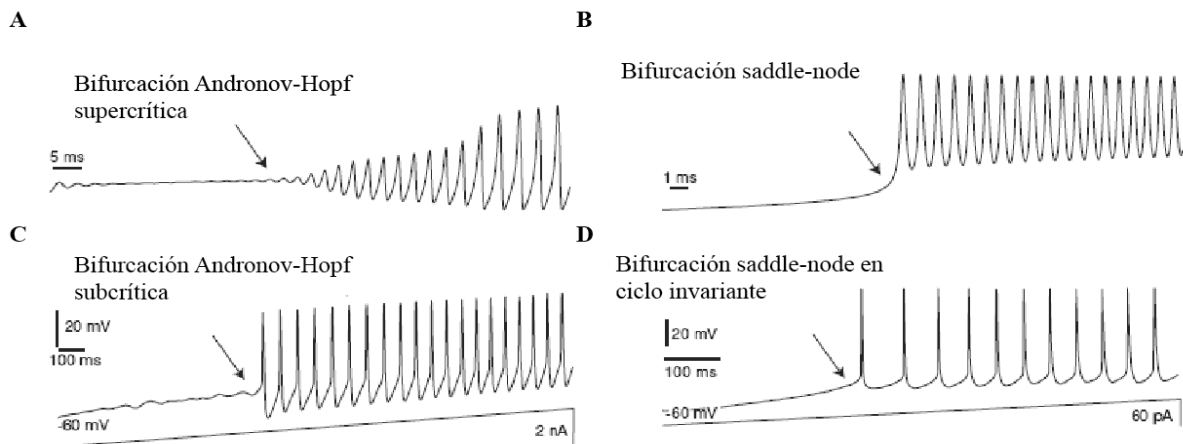
Analizar cómo se comportan las variables dinámicas que definen un sistema en el diagrama de fase y cómo cambios en los parámetros provocan bifurcaciones permite conocer muchas características de excitabilidad que puede presentar un determinado modelo neuronal, sin conocer a fondo todas las propiedades fisiológicas que gobiernan a las neuronas en sí. De esta forma podemos explicar a través del comportamiento dinámico de los modelos neuronales no sólo las observaciones realizadas en un contexto fisiológico, sino también predecir el comportamiento del sistema a valores de los parámetros no evaluados experimentalmente.

Las neuronas que poseen oscilaciones sub-umbrales amortiguadas del potencial de membrana pueden transitar bifurcaciones Andronov-Hopf del tipo subcrítica o supercrítica, dos ejemplos para cada tipo de bifurcación pueden verse en los trazos de voltaje de la figura 2.6A y 2.6B; dado su comportamiento este tipo de neuronas se pueden clasificar como resonadoras. En el diagrama de fases las oscilaciones amortiguadas están representadas por perturbaciones que vuelven a un punto fijo estable con orbitas en forma espiral.

Las oscilaciones sub-umbrales amortiguadas del potencial de membrana pueden determinar en una neurona cuánto se aproxima un potencial postsináptico al umbral de disparo, y por lo tanto determinar la probabilidad de evocar potenciales de acción. Por ejemplo, potenciales postsinápticos excitatorios (EPSPs) que coincidan con la cresta de las oscilaciones del Vm van a tener una menor distancia al umbral de disparo de la neurona mientras que EPSPs que arriben en los valles de las oscilaciones del Vm van a estar más lejos del umbral <sup>76</sup>. Esta característica en la dinámica neuronal muestra que las neuronas que poseen oscilaciones sub-umbrales prefieren ser estimuladas a una frecuencia que coincida con la frecuencia de las oscilaciones, de ahí su clasificación de resonadoras. Una neurona resonante que recibe estímulos repetidos con un período cercano al período de sus oscilaciones sub-umbrales puede alcanzar el umbral de disparo con mayor facilidad, por el contrario, si el período de los estímulos es cercano a la mitad del periodo de las oscilaciones, el umbral de disparo va a estar más lejos <sup>76</sup>.

En este orden de ideas, existen evidencias experimentales que relacionan la resonancia intrínseca de determinadas neuronas (para más detalle ver Capítulo 3) con las frecuencias de sus oscilaciones sub-umbrales. En estas neuronas, las frecuencias de resonancia y de las oscilaciones intrínsecas sub-umbrales no solo coinciden entre sí, sino que también coinciden con ritmos poblacionales generalizados de los circuitos neuronales en los que la neurona o población de neuronas resonantes se encuentran inmersas <sup>77-79</sup>. Estos hallazgos sugieren que la resonancia y las oscilaciones sub-umbrales son potenciales mecanismos de sincronización de ensamblajes neuronales, no solo para la generación de los ritmos electrográficos sino también para la integración de información espacialmente distribuida en el cerebro <sup>28,80</sup>.

Por otro lado, las neuronas que transitan bifurcaciones del tipo saddle-node y saddle-node en ciclo invariante pueden clasificarse como integradoras; caracterizadas por no presentar oscilaciones amortiguadas del potencial de membrana (Fig. 2.6C y 2.6D). Las neuronas integradoras prefieren estímulos a altas frecuencias. En estas neuronas, los estímulos que arriban usualmente provocan potenciales postsinápticos (PSPs) que decaen de forma exponencial con el tiempo, de manera que se requiere que los estímulos arriben muy cercanos en el tiempo para alcanzar el umbral de disparo.



**Figura 2.6. Características de la excitabilidad de las neuronas según el tipo de bifurcación que presentan en la transición del reposo al estado excitable.** Las flechas marcan la transición del  $V_m$  de reposo al comportamiento oscilatorio. (A) respuesta de un modelo neuronal que presenta una bifurcación de Hopf supercrítica; con oscilaciones del  $V_m$  amortiguadas y un comportamiento oscilatorio después de la bifurcación que aumenta en amplitud progresivamente. (B) respuesta de una neurona registrada in vitro, la cual presentó una bifurcación de Hopf subcrítica; con oscilaciones amortiguadas del  $V_m$  y un comportamiento oscilatorio después del punto de bifurcación con la presencia de oscilaciones de gran amplitud. (C) respuesta de un modelo neuronal con una bifurcación saddle-node; cuya transición ocurre sin la aparición de oscilaciones amortiguadas. (D) respuesta de una neurona registrada in vitro, la cual presentó una bifurcación saddle-node en ciclo invariante, caracterizada por una entrada al régimen oscilatorio de gran amplitud y sin la presencia de oscilaciones amortiguadas del  $V_m$ . Figura modificada de <sup>3</sup>.

En la tabla 2.1 se resumen algunas de las propiedades excitables que un modelo neuronal puede presentar según la clasificación de resonadoras o integradoras. Las neuronas que poseen un estado de reposo cercano al régimen oscilatorio (un equilibrio que coexiste con un ciclo límite) se clasifican como biestables y las que no, como monoestables. Otra característica de excitabilidad neuronal que se asocia a las diferentes bifurcaciones es el tipo de input (entrada sináptica) que puede desencadenar una respuesta en la neurona (potencial de acción), las neuronas que presentan bifurcaciones del tipo saddle-node se acercan a su umbral de disparo exclusivamente con inputs excitatorios, mientras que las neuronas con

bifurcaciones del tipo Andronov-Hopf pueden desencadenar una respuesta tanto con inputs excitatorios como inhibitorios. La habilidad de disparar potenciales de acción con entradas inhibitorias se conoce como excitación anodal o respuesta de rebote.

Propiedades	Integradoras		Resonantes	
Tipo de bifurcación	sadle node en ciclo invariante	sadle node	subcrítica (Andronov-Hopf)	supercrítica
Clasificación de Hodgkin	Clase 1	clase 2	Clase 2	clase 2
Oscilaciones del $V_m$	NO	NO	SI	SI
Preferencia en frecuencia	NO	NO	SI	SI
Curva $i/v$	No- monotónica		monotónica	
Potenciales de acción todo o nada	SI		NO	
Potenciales de acción inducidos por inhibición	NO		posible	

**Tabla 2.1. Resonantes versus integradoras.** Propiedades excitables de los modelos neuronales según la clasificación de sus características dinámicas. Modificado de <sup>3</sup>.

## 2.2 Métodos

### 2.2.1 Parte teórica

Para modelar las corrientes iónicas usamos ecuaciones tipo Hodgking-Huxley con parámetros biofísicos realistas obtenidos en Amarillo et al. 2014. Para el análisis de bifurcaciones y el diagrama de fases usamos el programa XPPAUT <sup>81</sup>, este programa admite valores absolutos para la conductancia máxima o permeabilidad máxima para simular la cantidad de los canales iónicos (S o cm/seg, respectivamente). Las simulaciones que muestran los cursos temporales del voltaje, corrientes y variables de activación/inactivación fueron realizadas con el programa de simulaciones NEURON <sup>82</sup>. A diferencia del programa anterior NEURON usa valores por unidad de área para la conductancia y permeabilidad máxima. Para pasar de valores absolutos a valores por unidad de área, usamos la capacitancia total, cuyo valor fue de 0.2 nF para todos los modelos neuronales. Todas las simulaciones fueron realizadas estableciendo una temperatura de 28°C, similar a la temperatura de los registros electrofisiológicos.

Todos los parámetros de las ecuaciones que simulan la biofísica de cada corriente iónica están especificados en el apéndice AI. Los valores de conductancias iónicas implementados en las simulaciones se especifican al pie de figura.

#### ***Modelo $I_{Kir}$ -Leaks***

La activación de la corriente rectificadora hacia adentro  $m_{Kir}$  se simuló como instantánea, por eso se usó la ecuación que representa su estado estacionario ( $m_{Kir\infty}$ ), la cual depende solo del voltaje de membrana. Dado que la única variable dinámica es el voltaje ( $dV/dt$ ), este modelo representa un SD en una dimensión.

$$C \frac{dV}{dt} = I - \bar{g}_{leaks}(V - E_{leaks}) - \bar{g}_{Kir} m_{Kir\infty}(V)(V - E_k) \quad (2.1)$$

#### ***Modelo $I_h$ - $I_{Kir}$ -Leaks***

Este modelo es un SD con 2 dimensiones, las variables dinámicas que describen al sistema son el voltaje ( $dV/dt$ ) y la activación de la corriente catiónica activada por hiperpolarización ( $dm_h/dt$ );  $I_{Kir}$  se simuló nuevamente con una activación instantánea.

$$C \frac{dV}{dt} = I - \bar{g}_{leaks}(V - E_{leaks}) - \bar{g}_{Kir} m_{Kir\infty}(V)(V - E_k) - \bar{g}_h m_h(V - E_h) \quad (2.2)$$

$$\frac{dm_h}{dt} = \frac{m_{h\infty}(V) - mh}{\tau_{mh}} \quad (2.3)$$

### ***Modelo $I_T$ - $I_h$ - $I_{Kir}$ -Leaks***

Este modelo es un SD en 3 dimensiones; simulamos la activación de  $I_{Kir}$  ( $m_{Kir}$ ) y la activación de la corriente de calcio de bajo umbral ( $m_T$ ) como instantáneas, usando la ecuación que representa el estado estacionario de cada corriente ( $m_{Kir}=m_{Kir\infty}$  y  $m_T=m_{T\infty}$ , ver apéndice A). Por lo tanto, las variables dinámicas que describen a nuestro sistema son el voltaje de membrana ( $dV/dt$ ), la activación de la corriente catiónica activada por hiperpolarización  $m_h$  ( $dm_h/dt$ ) y la inactivación del canal de calcio de bajo umbral  $h_T$  ( $dh_T/dt$ ).

$$C \frac{dV}{dt} = I - g_{leaks}(V - E_{leaks}) - g_{Kir} m_{Kir\infty}(V)(V - E_k) - g_h m_h(V - E_h) - pT m_T^2 h_T G(V, Ca_o, Ca_i) \quad (2.4)$$

$$\frac{dm_h}{dt} = \frac{m_{h\infty}(V) - mh}{\tau_{mh}} \quad (2.5)$$

$$\frac{dh_T}{dt} = \frac{h_{T\infty}(V) - hT}{\tau_{h_T}} \quad (2.6)$$

### ***Modelo $I_{Kir}$ sin pendiente negativa***

Nuevamente  $I_{Kir}$  se simuló con una activación instantánea por lo que se usó la ecuación que corresponde a su activación en el estado estacionario; pero para simular la corriente Kir sin pendiente negativa ( $I_{KirNoNS}$ ) la ecuación de  $m_{Kir\infty}$  (especificada en el apéndice A) se modificó por la siguiente ecuación (ver figura 2.13A en resultados).

$$mKirNoNS_{\infty} = \frac{0.9}{1+e^{(V+97.9/9.7)}} + 0.1 \quad (2.7)$$

## 2.2.2 Parte experimental

### *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 y aprobados por el Comité Institucional para el cuidado y uso de animales de laboratorio (CICUAL) de la Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA). Las rodajas de cerebro fueron preparadas usando ratones NIH Swiss, de 2 a 4 semanas de edad. Después de la inducción de la anestesia con tiopental sódico (50 –75 mg/kg pc), los ratones fueron decapitados y sus cerebros removidos dentro de una solución fría y oxigenada (95% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>), compuesta por 125 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.25 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 26 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, and 10 mM dextrosa (solución de corte). El cerebro fue cortado en rodajas de 350 μm de espesor usando un vibrótomo. Los cortes que incluyeron los núcleos ventrobasales talámicos fueron incubados en la solución de corte a 30°C por 1 hora, luego se permitió equilibrar hasta temperatura ambiente; después fueron transferidos a la cámara de registro, la cual fue continuamente perfundida con líquido cefalorraquídeo artificial (ACSF, por sus siglas en inglés) oxigenado, compuesta por 125 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.25 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 26 mM NaHCO<sub>3</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, and 10 mM dextrose. Todos los compuestos para las soluciones fueron adquiridos en Sigma Aldrich (San Luis, MO).

### *Electrofisiología*

Las neuronas del núcleo ventrobasal talámico (núcleos ventroposterolateral y ventroposteromedial) fueron visualizadas con una cámara Panasonic montada sobre un microscopio Zeiss Axioskop FS, equipado con luz infrarroja y óptica de contraste por interferencia diferencial en infrarrojo (IR-DIC por su sigla en inglés). Las pipetas de parche fueron hechas con vidrio borosilicato empleando un puller Sutter P-1000 horizontal (Sutter Instrument, Novato, CA) con una resistencia entre 2MΩ a 5MΩ; y posteriormente llenadas con solución intracelular compuesta por: 119 mM CH<sub>3</sub>KO<sub>3</sub>S, 12 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>,



0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 10 mM HEPES, 0.4 mM Na-GTP, and 2 mM Mg-ATP; fijada a un pH de 7.4. Las neuronas fueron parchadas en *voltaje-clamp* y luego registradas en *current-clamp* usando un amplificador Axoclamp 700B (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Los registros fueron pasados por un filtro pasa bajo de 10KHz; la capacitancia producida por la pipeta fue cancelada y la resistencia de acceso fue compensada. La estabilidad de los registros se evaluó constantemente y los datos fueron descartados si se presentaba un aumento de la resistencia de acceso mayor al 10%. Los datos fueron adquiridos en una computadora personal con el software pCLAMP10 (*Molecular Devices*) y almacenados para su posterior análisis. Todos los experimentos fueron realizados a una temperatura de 28°C, y el potencial de membrana fue mantenido a -70mV con inyección de corriente constante (ver resultados), a menos que se indique lo contrario.

### ***Dynamic clamp***

La técnica de *dynamic clamp* fue implementada y montada en el laboratorio como parte de una tesis de maestría<sup>83</sup>. Esta técnica permite simular de manera electrónica una determinada corriente iónica en una célula viva durante un registro electrofisiológico intracelular, si se conoce la ecuación (usualmente diferencial) que describe su conductancia iónica. En forma *on-line* durante el registro experimental de *patch clamp*, la técnica de *dynamic clamp* permite leer el voltaje real de la membrana plasmática a través de la interfaz DAQ PCIe-6351 (National Instruments, Austin, TX), la cual lee el voltaje analógico en la salida del amplificador (MultiClamp 700B) y lo convierte a una señal digital; esta interfaz es comandada a través del software libre StpC bajo el sistema operativo Windows 7 OS<sup>84</sup>. El voltaje leído en el amplificador es usado por el *software* para implementar el cálculo de la ecuación que describe la conductancia iónica de la corriente que se quiere simular; este cálculo se lleva a cabo con el procesador de la computadora y se realiza iterativamente a una frecuencia de 50KHz. La salida analógica del amplificador se conecta a las entradas analógicas de la tarjeta de adquisición Digidata 1440a (Molecular Devices) y de la tarjeta de adquisición del *dynamic clamp* PCIe-6351. Esta señal es usada para seguir el potencial de membrana con el software pCLAMP10; así como también para implementar el bucle de *dynamic clamp*. Las salidas analógicas de las dos tarjetas se conectaron a un sumador de voltaje en tiempo real, el cual fue hecho en el laboratorio como parte de un trabajo de maestría

(Patente P20170101319, CONICET, Argentina) <sup>85,86</sup>. Esta configuración permitió realizar simultáneamente protocolos de *current clamp* con pCLAMP10 y simulaciones de *dynamic clamp* con el software StdpC en el amplificador MultiClamp 700B.

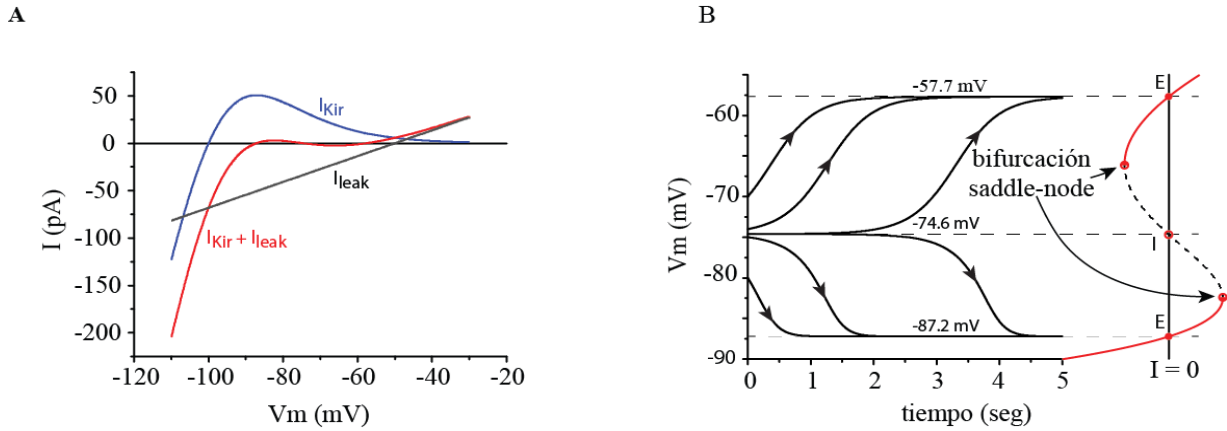
Resumiendo, el potencial de membrana leído por el amplificador es utilizado para resolver las ecuaciones que describen las conductancias iónicas y el resultado numérico del valor de corriente necesaria para simular la presencia de la conductancia de interés es reinyectado a la célula por el mismo amplificador. Todo el proceso se realiza *on-line* en tiempo real.

## 2.3 Resultados

### 2.3.1 $I_{Kir}$ induce biestabilidad en el potencial de membrana

Comenzamos analizando un modelo de una dimensión que incluyó la corriente de potasio rectificadora hacia adentro  $I_{Kir}$  y las corrientes de fuga de sodio y potasio  $I_{Leaks}$  (modelo  $I_{Kir}$ -Leaks, ver ecuación 2.1 en métodos). Las ecuaciones del modelo, junto a los parámetros de ajuste fueron extraídos de <sup>17</sup>. Analizando la relación corriente vs voltaje ( $i/v$ ) para cada corriente del modelo, encontramos que esta relación es lineal para las corrientes Leaks (trazo negro, Fig. 2.7A), que es el comportamiento esperado para una corriente óhmica; por otro lado, la relación  $i/v$  para  $I_{Kir}$  presenta una región de pendiente negativa en la zona de rectificación que se debe a las características del bloqueo del canal por poliaminas y  $Mg^{++}$  <sup>87,88</sup> (trazo azul, Fig. 2.7A). Para ciertos valores de conductancia de  $Kir$ , la combinación de  $I_{Kir}$  e  $I_{Leaks}$  generó una relación  $i/v$  no-monotónica que cruzó el cero en tres valores diferentes de voltaje (-57.7, -74.6 y -87.2 mV, ver trazo rojo en Fig. 2.7A). Como se mencionó antes, los ceros en la relación  $i/v$  representan los puntos fijos del SD en ausencia de corriente de estimulación, para analizar su estabilidad se simuló la evolución temporal del sistema para diferentes condiciones iniciales (CI) cercanas a los PF (Fig. 2.7B). En esta figura puede verse que el potencial de membrana de -74.6mV aleja las trayectorias, comportamiento característico de un PF inestable; si el sistema parte de una CI por arriba de este valor, las trayectorias evolucionan hacia -57.7mV, por el contrario, si el sistema se encuentra por debajo del PF inestable, evoluciona hacia el  $V_m$  de -87.2mV. Los  $V_m$  de -57.7mV y -87.2mV son PF estables y representan los puntos de reposo del sistema (biestabilidad). Para este

sistema dinámico de una dimensión, la relación  $i/v$  muestra que éste presenta una bifurcación tipo Saddle-node con dos PF estables y un PF inestable.

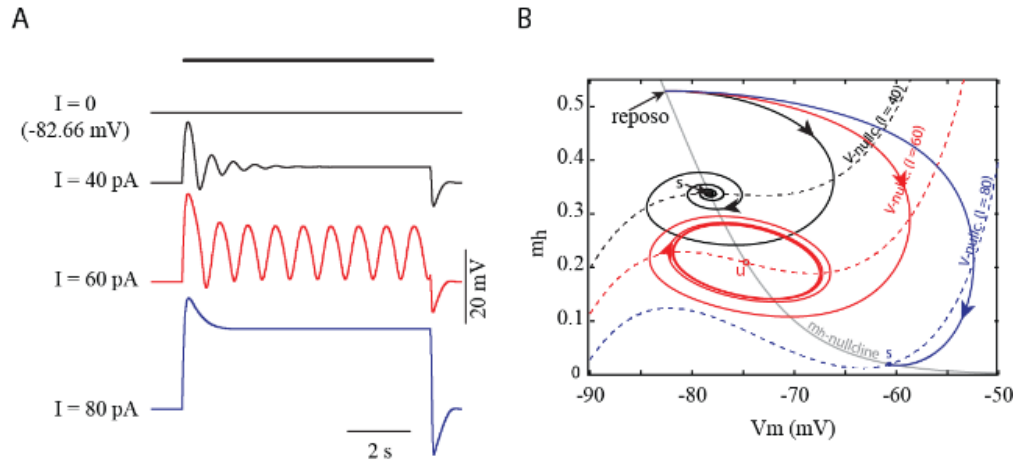


**Figura 2.7.  $I_{Kir}$  induce biestabilidad en el  $V_m$ .** (A) simulación de la relación corriente versus voltaje en el estado estacionario del modelo  $I_{Kir}$ -Leaks (trazo rojo) y de las corrientes individuales ( $I_{leak}$  trazo negro) y ( $I_{Kir}$  trazo azul); con  $\bar{g}_{Kir}=16nS$  y  $\bar{g}_{Kleak}=\bar{g}_{Naleak}=0.7nS$ . (B) Simulación del curso temporal del  $V_m$  para el modelo en (A) para seis diferentes condiciones iniciales (-80, -75, -74.7, -74.5, -74 y -70 mV). A la izquierda se proyecta el diagrama de bifurcaciones del modelo con la corriente inyectada como parámetro de bifurcación; para  $I=0$  el SD cruza el cero en tres puntos donde (I) representa el PF inestable y (E) los PF estables.

### 2.3.2 La interacción de $I_{Kir}$ con $I_h$ genera oscilaciones en un modelo mínimo

Para extender el estudio a otras corrientes que se expresan en las neuronas TC, que son relevantes para el comportamiento fisiológico que nosotros estudiamos, generamos el modelo mínimo  $I_{Kir}$ - $I_h$ -Leaks. La dinámica neuronal es modelada por un SD con 2 dimensiones, gobernado por las variables  $V_m(t)$  y  $m_h(t)$ , que representan al voltaje de membrana y a la activación de la corriente catiónica activada por hiperpolarización  $I_h$ , respectivamente; modelamos a la activación de la corriente de potasio rectificadora hacia adentro  $m_{Kir}$  como instantánea, bajo esta condición  $I_{Kir}$  solo dependió del voltaje de membrana. El sistema dinámico que describe nuestro modelo puede verse en las ecuaciones (2.2) y (2.3) en métodos.

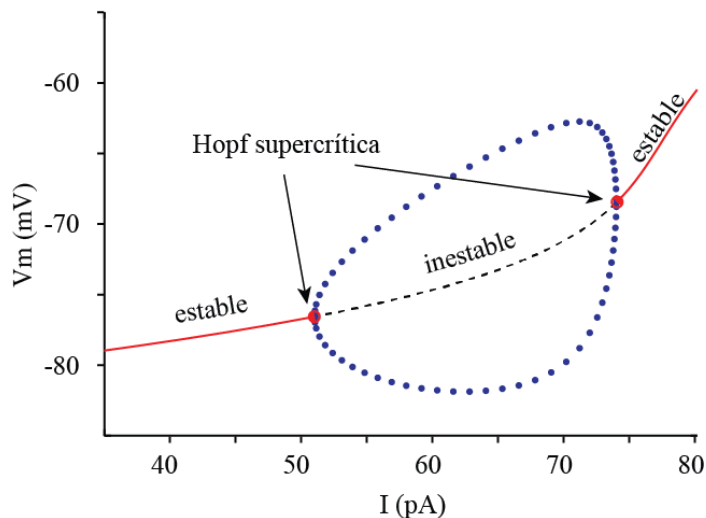
En la figura 2.8A se muestran los cursos temporales del potencial de membrana producidos por el modelo  $I_h$ - $I_{K_{ir}}$ -Leaks bajo diferentes inyecciones de corriente. En ausencia de corriente ( $I=0$ ) el sistema se estabilizó en un potencial de membrana en reposo de  $-82.66\text{mV}$ . La inyección de  $60\text{pA}$  indujo oscilaciones periódicas (ver trazo rojo); las cuales no fueron observadas con inyecciones de corriente de  $40\text{pA}$  (trazo negro) y  $80\text{pA}$  (trazo azul). El diagrama de fases ( $V_m(t)$  versus  $m_h(t)$ ) para las condiciones antes mencionadas puede verse en la figura 2.8B; para los tres diferentes valores del parámetro (inyección de corriente); la *nullclina* del potencial de membrana cruzó a la *nullclina*  $m_h$  en un solo punto. También en la figura 2.8B puede verse que la *nullclina*  $m_h$  no se vio modificada con las diferentes inyecciones de corriente; pero, al contrario, la *nullclina*  $V_m(t)$  tomó diferentes valores para cada cambio en el parámetro. Para una inyección de  $20\text{pA}$  (trazo negro, Fig. 2.8B) el sistema presentó un PF o punto de equilibrio estable, las trayectorias en el diagrama de fases muestran como una perturbación generó que el sistema vuelva al estado de equilibrio en forma de espiral; esta evolución representa oscilaciones amortiguadas en el voltaje de membrana (trazo negro Fig. 2.8A). Por otro lado, una inyección de  $60\text{pA}$  cambió el PF estable a inestable y produjo la aparición de un ciclo límite estable (trazo rojo, Fig. 2.8B); las trayectorias del sistema producen órbitas cerradas que se acercan al CL estable, que en el voltaje de membrana se traducen como oscilaciones periódicas (trazo rojo Fig. 2.8A). Por último, la inyección de  $80\text{pA}$  llevó al sistema a un nuevo PF estable a potenciales más despolarizados (trazo azul, Fig. 2.8B). La transición entre un PF estable a inestable junto a la aparición de un ciclo límite indican la presencia de una bifurcación tipo Hopf.



**Figura 2.8. La interacción de  $I_{Kir}$  e  $I_h$  induce oscilaciones subumbrales.** Comportamiento dinámico del modelo  $I_h$ - $I_{Kir}$ -Leak para un valor de  $\bar{g}_{Kir}=41\text{nS}$  y valores fisiológicos de  $\bar{g}_h=5\text{nS}$  y Leaks ( $\bar{g}_{Kleak}=2.3\text{nS}$ ;  $\bar{g}_{Naleak}=0.7\text{nS}$ ). (A) Simulaciones del curso temporal del  $V_m$  para cuatro inyecciones de corriente diferentes, donde el inicio y final de la inyección se muestra en la barra superior negra; para  $I=0$  el SD se estabilizó en un  $V_m$  en reposo de  $-82.66\text{mV}$ ; partiendo de este mismo  $V_m$  se inyectaron: una  $I=40\text{pA}$  que produjo una respuesta amortiguada del  $V_m$  (trazo negro), una  $I=60\text{pA}$  que indujo oscilaciones periódicas subumbrales (trazo rojo) y, una  $I=80\text{pA}$  que llevo al SD a un nuevo  $V_m$  en reposo (trazo azul). (B) diagrama de fases de las dos variables dinámicas del sistema ( $mh$  versus  $V_m$ ) para las cuatro condiciones simuladas en (A); para todas las condiciones las *nullclinas* se intersecaron en un solo punto fijo, además solo la *nullclina*  $V_m$  se vio modificada por los cambios del parámetro (corriente inyectada). Partiendo del reposo (equivalente a  $I=0$  y  $V_m=-82.66\text{mV}$ ) una  $I=40\text{pA}$  produjo un PF estable cuyas trayectorias de acercan a él en forma de espiral (trazo negro PF (s)); una  $I=60\text{pA}$  produjo un nuevo PF que se convirtió en inestable junto al surgimiento de un CL cuya amplitud se refleja en las órbitas cerradas (trazos rojos PF (u)); por último, una  $I=80\text{pA}$  generó un nuevo PF estable a un  $V_m$  más despolarizado con trayectorias que se acercan a él (trazo azul PF (u)).

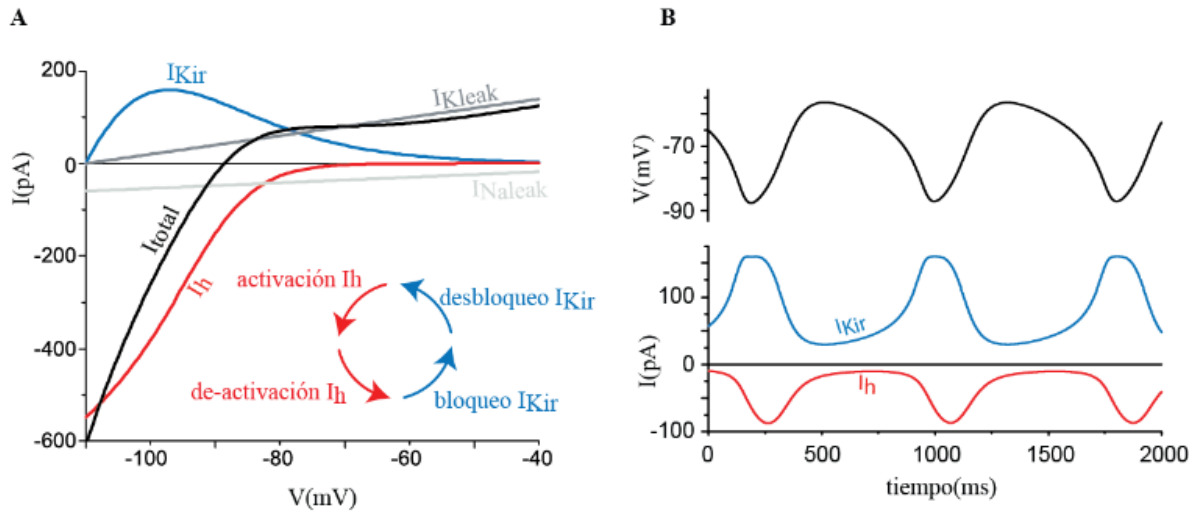
En el análisis anterior partimos de un potencial de membrana en reposo hiperpolarizado ( $-82.66\text{mV}$ ); que se correspondió con el  $V_m$  al cual el sistema se estabilizó sin inyección de corriente externa; para extender nuestro análisis a diferentes valores del  $V_m$

construimos un diagrama de bifurcaciones voltaje vs corriente (ver Fig. 2.9). Dependiendo del potencial de membrana el sistema presentó dos bifurcaciones tipo Hopf (fechas negras); las líneas rojas muestran los equilibrios del sistema (PF estables) y los puntos azules que rodean a los PF inestables (guiones negros) representan las amplitudes (deflexiones positivas y negativas) en las que incursiona el potencial de membrana mientras oscila (ver ejemplo en trazo rojo Fig. 2.8A). Notar que las oscilaciones aumentaron gradualmente en amplitud después de atravesar los puntos de bifurcación, indicando la presencia de bifurcaciones del tipo Andronov-Hopf supercrítica.



**Figura 2.9. El modelo  $I_h$ - $I_{Kir}$ -Leak transita bifurcaciones de Hopf supercríticas cuando  $I$  es el parámetro de bifurcación.** Diagrama de bifurcaciones ( $v/i$ ) para el mismo modelo de la Fig. 2.8; para cierta variación de inyección de corriente ( $I$ ) el SD presentó un PF inestable (región de guiones negros) acompañado de la presencia de un CL estable, cuya amplitud se representa en los puntos azules de la gráfica. Para ciertos valores de  $I$  superior e inferior a este rango, el SD transitó dos bifurcaciones de Hopf supercríticas (ver flechas y puntos rojos) y luego se estabilizó en diferentes PF estables (líneas continuas rojas) a potenciales de membrana despolarizados o hiperpolarizados dependiendo del valor de  $I$  inyectado.

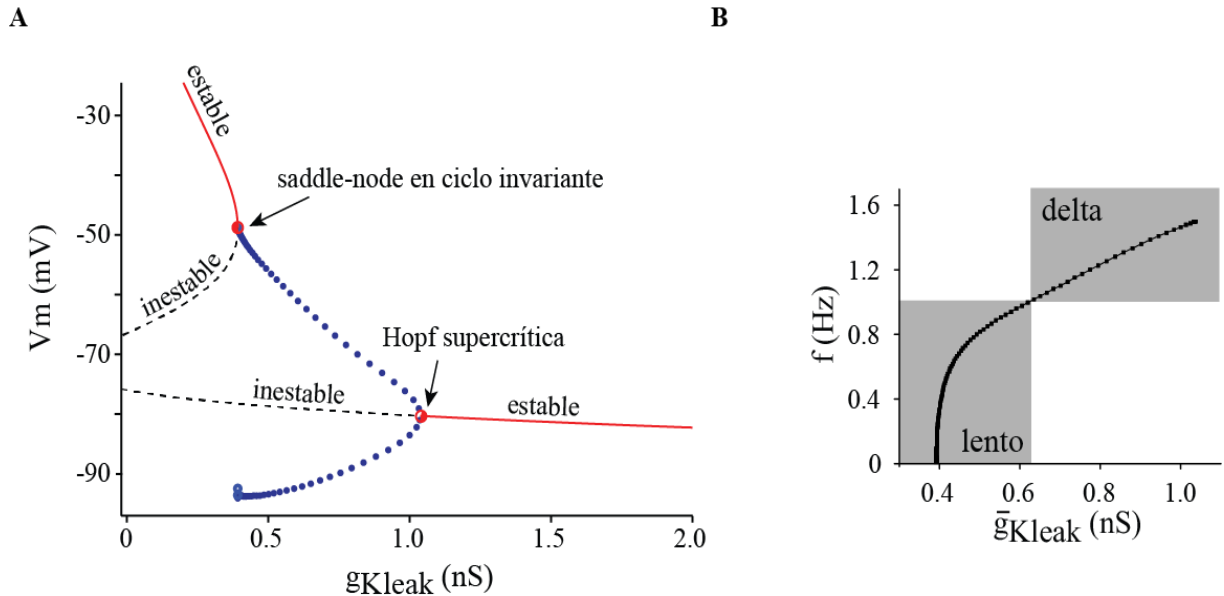
La dinámica del sistema le permitió sostener oscilaciones periódicas del  $V_m$  gracias a las propiedades biofísicas de las corrientes que lo componen, en la figura 2.10A se muestran las curvas  $i/v$  para cada corriente del modelo y para la contribución total (corriente total), junto a un diagrama explicativo del proceso. La amplificación regenerativa de la hiperpolarización inducida por  $I_{Kir}$  (desbloqueo  $I_{Kir}$ ) produce la activación de la corriente resonadora  $I_h$ , la cual induce una despolarización provocando el bloqueo de  $I_{Kir}$ . En el máximo de despolarización  $I_h$  es completamente desactivada mientras que un componente de  $I_{Kir}$  permanece desbloqueado; esta fracción de  $I_{Kir}$  es suficiente para iniciar la hiperpolarización que da comienzo al nuevo ciclo. La interacción de ambas corrientes durante las oscilaciones puede verse también en los cursos temporales del  $V_m$  (Fig. 2.10B); recordar la convención de que las corrientes catiónicas *outward* (hacia afuera) se grafican como positivas y las corrientes catiónicas *inward* (hacia adentro) como negativas.



**Figura 2.10.** La articulación de las características biofísicas de  $I_{Kir}$  e  $I_h$  permiten las oscilaciones del  $V_m$ . Para los mismos valores de conductancia de la Fig. 2.8. (A) simulación de la relación  $i/v$  medido en el estado estacionario para el modelo completo (curva negra) y las corrientes individuales ( $I_{Kir}$  azul;  $I_{Kleak}$  gris oscuro,  $I_{Naleak}$  gris claro y  $I_h$  rojo). En el *inset* de la figura se muestra un esquema de la colaboración dinámica entre  $I_{Kir}$  e  $I_h$  para producir oscilaciones, el desbloqueo de  $I_{Kir}$  hiperpolariza el  $V_m$  e induce la activación de  $I_h$ , que despolariza el  $V_m$  hasta un valor donde el canal se deactiva, donde la fracción de  $I_{Kir}$  presente a estos  $V_m$  despolarizados es suficiente para iniciar un nuevo ciclo de oscilación. Esta interacción puede verse mejor en (B) donde se grafican el curso temporal del  $V_m$  (trazo superior negro) y los cursos temporales de las corrientes individuales  $I_{Kir}$  e  $I_h$  (trazo azul y rojo, respectivamente); durante las oscilaciones subumbrales del  $V_m$  (similar a Fig. 2.8A



Dependiendo del potencial de membrana, las neuronas talamocorticales presentan dos modos de disparo (ráfagas o tónico), los cuales se correlacionan con diferentes estados comportamentales; el mecanismo propuesto que permite el cambio entre ambos modos de disparo, es una modulación sobre los canales Leaks de potasio (para más detalle ver Capitulo 1). Para examinar el rango de valores de  $\bar{g}_{Kleak}$  que inducen oscilaciones, realizamos el análisis de bifurcaciones en el modelo  $I_h$ - $I_{Kir}$ -Leaks, usando  $\bar{g}_{Kleak}$  como parámetro de bifurcación, en vez de la corriente (ver figura 2.11). Ciertos valores de  $\bar{g}_{Kleak}$  mantuvieron al sistema en estado de equilibrio (curvas rojas, PF estables), para  $\bar{g}_{Kleak} (\approx 1nS)$  el sistema salió del equilibrio a través de una bifurcación de Hopf supercrítica; donde la estabilidad del punto fijo paso de estable a inestable (línea negra punteada) y se produjo la aparición de un CL estable (puntos azules), cuya amplitud creció gradualmente a medida que  $\bar{g}_{Kleak}$  fue disminuyendo. Para valores de  $\bar{g}_{Kleak}$  cercanos a 0.4 nS, el CL desapareció mediante una bifurcación saddle-node en ciclo invariante; esta última bifurcación tiene la característica de permitir que el sistema oscile a muy bajas frecuencias; tal como puede verse en la figura 2.11B, donde se muestran los cambios en las frecuencias de las oscilaciones del Vm ante los diferentes valores que tomó  $\bar{g}_{Kleak}$ .

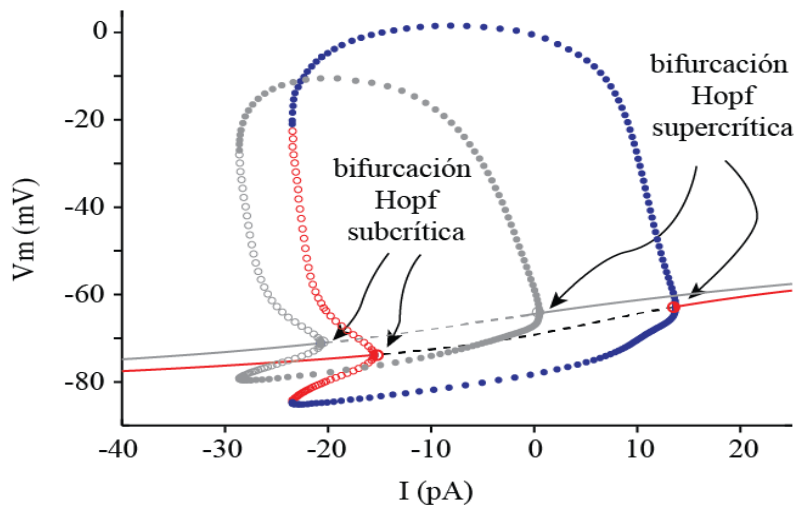


**Figura 2.11. Características del modelo  $I_h$ - $I_{Kir}$ -Leak con  $\bar{g}_{Kleak}$  como parámetro de bifurcación.** Para  $\bar{g}_{Kir}=41\text{nS}$ ,  $\bar{g}_h=5\text{nS}$ ,  $\bar{g}_{Naleak}=0.7\text{n}$  y  $\bar{g}_{Kleak}$  variable, sin inyección de corriente. (A) diagrama de bifurcaciones  $V_m$  versus  $\bar{g}_{Kleak}$ ; para valores de  $\bar{g}_{Kleak} > 1\text{nS}$  el SD es estable (curva roja PF estable), a  $\bar{g}_{Kleak}=1\text{nS}$  ocurre una bifurcación de Hopf supercrítica (flecha) con la aparición de un CL estable (cuya amplitud se grafica en los puntos azules) junto al cambio de estabilidad del PF (curva negra discontinua PF inestable); a valores  $\bar{g}_{Kleak}$  muy pequeños ( $< 0.5\text{nS}$ ) el SD transitó una bifurcación saddle-node de ciclo invariante (flecha) con la aparición de dos PFs (PF estable curva roja) y (PF inestable curva negra discontinua). (B) Frecuencia de las oscilaciones subumbrales del  $V_m$  versus  $\bar{g}_{Kleak}$  para valores ( $\bar{g}_{Kleak} \leq 1\text{nS}$ ) donde el SD transita ambas bifurcaciones; después de la bifurcación tipo Hopf el sistema oscila a frecuencias dentro de la banda delta, las cuales decrecen a medida que  $\bar{g}_{Kleak}$  disminuye, hasta convertirse en oscilaciones lentas en la transición de la bifurcación saddle-node en ciclo invariante.

### 2.3.3 $I_{Kir}$ promueve las oscilaciones en el modelo $I_T$ - $I_h$ - $I_{Kir}$ -Leaks

En <sup>52</sup> se realizó un estudio de bifurcaciones para el sistema  $I_T$ - $I_h$ -Leaks, este modelo presentó las mismas bifurcaciones del modelo  $I_T$ -Leaks (ver Fig. 2.5); sin embargo, la presencia de  $I_h$  introdujo una mayor estabilidad en el potencial de membrana, que se tradujo en un aumento del rango de voltaje donde se produjeron las oscilaciones. Para analizar el

impacto de la amplificación de  $I_{Kir}$  en un modelo más realista de la fisiología de las neuronas TC a  $V_m$  sub-umbrales, incorporamos  $I_{Kir}$  en el modelo anterior. El sistema dinámico  $I_T$ - $I_h$ - $I_{Kir}$ -Leaks es un modelo con 3 dimensiones, ya que impusimos que  $I_{Kir}$  y la variable de activación de  $I_T$  ( $m_T$ ) fueran instantáneas; las variables dinámicas que describieron al sistema fueron  $V_m(t)$ ,  $m_h(t)$  y  $h_T(t)$  (voltaje de membrana, activación de  $I_h$  e inactivación de  $I_T$ , respectivamente); ver las ecuaciones 2.4, 2.5 y 2.6 del modelo en métodos. La incorporación de  $I_{Kir}$  conservó las bifurcaciones del sistema anterior (comparar trazos grises con trazos de colores Fig. 2.12), el SD nuevamente presentó una bifurcación de Hopf subcrítica a potenciales de membrana hiperpolarizados y una bifurcación de Hopf supercrítica a  $V_m$  despolarizados. Los cambios introducidos por  $I_{Kir}$  se manifestaron a nivel de la amplitud del ciclo límite (comparar puntos grises con puntos azules y rojos en Fig. 2.12);  $I_{Kir}$  amplificó el rango de voltaje donde se produjeron las oscilaciones y permitió la presencia de oscilaciones para  $I=0$  y para valores de inyección de corriente positivos.



**Figura 2.12. Efecto de  $I_{Kir}$  en la dinámica del modelo  $I_T-I_h-I_{Kir}-Leaks$ .** Diagrama de bifurcaciones  $v/i$ , para el modelo  $I_T-I_h-Leaks$  (gráfica gris, publicada en <sup>52</sup>) y el modelo  $I_T-I_h-I_{Kir}-Leaks$  (gráfica de colores) ambos con similares valores de  $pT_{max}=14 \times 10^{-9} \text{ cm}^3/\text{seg}$ ,  $\bar{g}_h=5\text{nS}$ ,  $\bar{g}_{Kleak}=2.27\text{nS}$ ,  $\bar{g}_{Naleak}=0.68\text{nS}$  y para el modelo con  $I_{Kir}$  un  $\bar{g}_{Kir}=9\text{nS}$ . Los modelos transitan las mismas bifurcaciones, tipo Hopf supercrítica a  $V_m$  mas despolarizados y tipo Hopf subcrítica a  $V_m$  mas hiperpolarizados; la presencia de  $I_{Kir}$  amplía el rango de corrientes donde se producen las oscilaciones y permite al SD oscilar de forma autónoma (condición  $I=0$ ). Nuevamente las líneas continuas representan PF estables, las líneas discontinuas PF inestables y los puntos la amplitud del CL.

### 2.3.4 Sin pendiente negativa $I_{Kir}$ no puede actuar como marcapaso de las oscilaciones

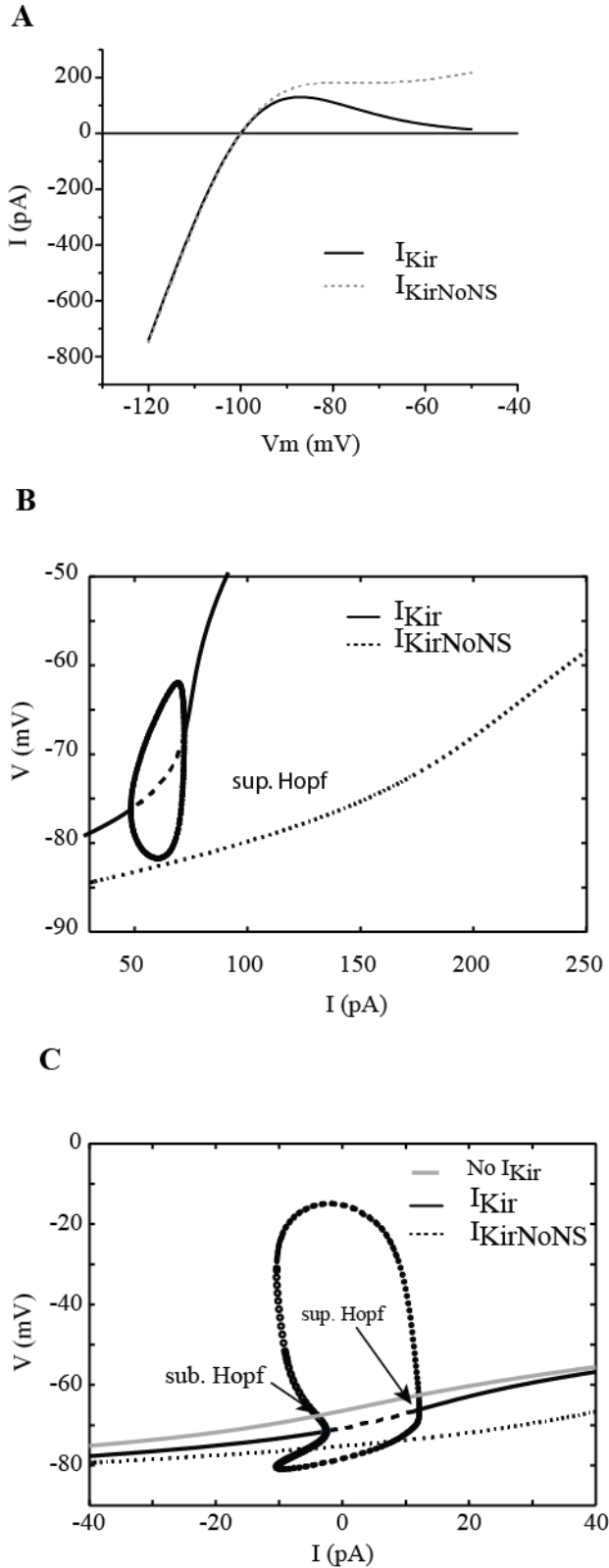
La relación corriente/voltaje de los canales Kir2.2 en las neuronas TC muestra la dependencia de la corriente Kir con el voltaje <sup>17</sup>. Cuando la curva cruza el valor cero de corriente se halla en el punto de equilibrio de  $I_{Kir}$  y su correspondiente valor en voltaje representa el potencial de equilibrio del potasio (-100 mV), ver figura 2.13A (curva continua). A medida que el  $V_m$  se aleja de -100mV hacia potenciales despolarizados,  $I_{Kir}$  disminuye gradualmente hasta acercarse asintóticamente a cero (alrededor de -50mV). Esta dependencia del voltaje de  $I_{Kir}$  se debe al bloqueo electrostático del canal por poliaminas y  $Mg^{++}$ , el cual es también voltaje dependiente <sup>87</sup>. El bloqueo produce una región de pendiente

negativa (región de conductancia con pendiente negativa) a potenciales de membrana entre -90 a -60mV; que si bien es una región característica de los Kir2.x, se presenta de manera más pronunciada en los Kir2.2<sup>88</sup>. Esta particularidad biofísica hace que  $I_{Kir}$  se comporte como una corriente hiperpolarizante activada por hiperpolarización en el rango de voltaje de la región de pendiente negativa. En otras palabras, el desbloqueo del canal inducido por hiperpolarización induce más hiperpolarización, la cual a su vez induce más desbloqueo, generando un ciclo regenerativo que amplifica las hiperpolarizaciones<sup>17,89</sup>.

Para analizar si la región de pendiente negativa que presentan los canales Kir, que se expresan en las neuronas TC y que simulamos en el modelo de  $I_{Kir}$ , es la característica biofísica que dota a esta corriente con la habilidad de promover y amplificar las oscilaciones sub-umbrales, repetimos el análisis de bifurcaciones hecho con los modelos anteriores ( $I_h$ - $I_{Kir}$ -Leaks y  $I_h$ - $I_T$ - $I_{Kir}$ -Leaks), usando una corriente Kir sin región de pendiente negativa ( $I_{KirNoNS}$ , ver ecuación 2.7 en métodos y Fig. 2.13A curva discontinua). Para comparar visualmente ambos resultados, en la figura 12.3B se muestran los diagramas de bifurcaciones del modelo  $I_h$ - $I_{Kir}$ -Leaks, junto con los resultados del modelo  $I_h$ - $I_{KirNoNS}$ -Leaks; la línea negra continua muestra el comportamiento y el tipo de bifurcaciones que atraviesa el modelo  $I_h$ - $I_{Kir}$ -Leaks (correspondiente a Fig. 2.9). Para iguales valores de conductancia, el modelo con  $I_{KirNoNS}$  no presentó ningún tipo de bifurcaciones cuando se usó la corriente inyectada como parámetro, como puede verse en la figura (línea punteada); ante la variación del parámetro, cada punto en el diagrama de bifurcaciones representó un nuevo PF estable del sistema.

El modelo dinámico  $I_T$ -Leaks es capaz de presentar oscilaciones periódicas, si se aumenta en un 30% la permeabilidad del canal T, respecto a su valor default<sup>52</sup>. Dado que estos resultados muestran que  $I_T$  tiene la capacidad de comportarse como una corriente resonadora y amplificadora (revisado en capítulo 3) capaz de generar oscilaciones; analizamos el efecto de la amplificación mediada por la pendiente negativa de  $I_{Kir}$  en un modelo donde se mantuvo la permeabilidad del canal T en su valor default<sup>17</sup>. En la figura 2.13C se muestra el diagrama de bifurcaciones con la corriente como parámetro, para los tres modelos  $I_h$ - $I_T$ -Leaks,  $I_h$ - $I_T$ - $I_{Kir}$ -Leaks e  $I_h$ - $I_T$ - $I_{KirNoNS}$ -Leaks; con todos los valores de

conductancias dentro de un rango fisiológico encontramos que sólo el modelo con Kir normal es capaz de sostener oscilaciones periódicas (líneas continuas negras). Sin  $I_{Kir}$  y para valores de  $pT_{max}$  default, el sistema no transitó ninguna bifurcación (Fig. 2.13C, línea gris continua), lo mismo ocurrió para el modelo  $I_h-I_T-I_{KirNoNS}-I_{leaks}$  (Fig. 2.13C, línea gris punteada). Un valor de conductancia de Kir dentro del rango fisiológico ( $\bar{g}_{Kir}=9nS$ , comparar con valores de <sup>17</sup>) fue suficiente para producir oscilaciones en el modelo  $I_h-I_T-I_{Kir}-Leaks$ , cuando se mantuvieron en sus valores default el resto de los parámetros <sup>17</sup>. Notar que nuevamente Kir es capaz de poner al sistema a oscilar sin necesidad de inyectar corriente.

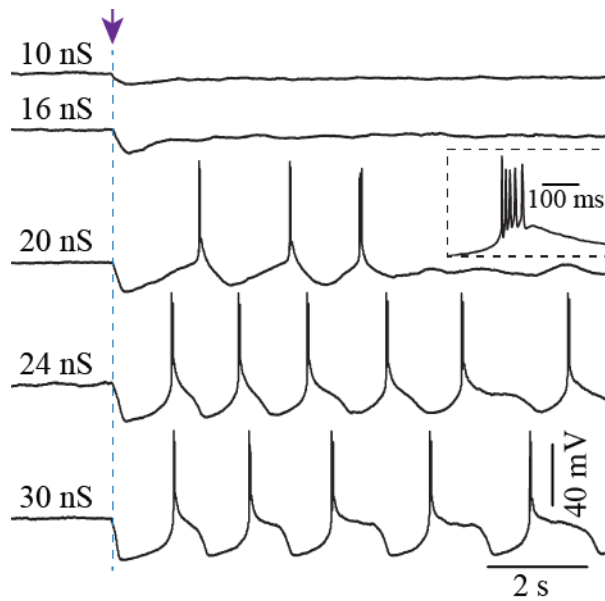


**Figura 2.13.  $I_{Kir}$  amplifica las oscilaciones sub-umbrales debido a la región de pendiente negativa.** (A) Simulación de la relación  $i/v$  para  $I_{Kir}$  con pendiente negativa (curva continua) y  $I_{Kir}$  sin pendiente negativa ( $I_{KirNoNS}$ , curva discontinua) con  $\bar{g}_{Kir}=9nS$ . (B) diagrama de bifurcaciones  $V_m$  versus  $I$  para el modelo  $I_h$ - $I_{Kir}$ -Leaks, el cual presentó dos bifurcaciones tipo Hopf; y para el modelo  $I_h$ - $I_{KirNoNS}$ -Leaks el cual no presentó ninguna bifurcación para las  $I$  evaluadas (curva punteada); con  $\bar{g}_{Kir}=41nS$ ,  $\bar{g}_h=5nS$ ,  $\bar{g}_{Kleak}=2.27nS$ ,  $\bar{g}_{Nleak}=0.68nS$ . (C) comparación del diagrama de bifurcaciones para los tres modelos:  $I_h$ - $I_T$ -Leaks (curva gris claro);  $I_h$ - $I_T$ - $I_{Kir}$ -Leaks (curva continua negra PF estable, curva discontinua negra PF inestables y círculos negros max/min de las oscilaciones) y; por último,  $I_h$ - $I_T$ - $I_{KirNoNS}$ -Leaks (curva punteada gris). Con  $pT_{max}=11.3 \times 10^{-9}cm/seg$ ,  $\bar{g}_h=5nS$ ,  $\bar{g}_{Kleak}=2.27nS$ ,  $\bar{g}_{Nleak}=0.68nS$  y  $\bar{g}_{Kir}=9nS$ .

### 2.3.5 El aumento de $I_{Kir}$ promueve oscilaciones en neuronas talamocorticales de ratón

Las neuronas talamocorticales de ratón, durante registros de actividad eléctrica *in vitro*, no presentan ráfagas repetitivas de forma espontánea<sup>16,90</sup>. Dependiendo del potencial de membrana en reposo, una inyección de corriente despolarizante puede desencadenar el disparo en forma tónica de la neurona, o llevar a la neurona a disparar ráfagas únicas, si por el contrario se inyectan pulsos de corriente hiperpolarizante; el cambio en ambos modos de disparo depende de la activación e inactivación del canal de bajo umbral T. Empleando la teoría de sistemas dinámicos encontramos que, para ciertos incrementos en los valores de conductancia,  $I_{Kir}$  tiene el potencial de producir y amplificar oscilaciones cuando se la combina con las corrientes h y T en los sistemas  $I_{Kir}-I_h-I_{leaks}$  e  $I_{Kir}-I_h-I_T-I_{leaks}$ . Para comprobar experimentalmente lo observado con los modelos, se utilizó un sistema de *dynamic clamp* (ver métodos) para inyectar diferentes valores crecientes de conductancia Kir (renombrada  $d\bar{g}_{Kir}$  debido a que es introducida con el dynamic clamp), en seis neuronas TC durante experimentos de *patch clamp*. En la figura 2.14 se muestran trazos de voltaje obtenidos en *current clamp* para una neurona representativa, partiendo de un potencial de membrana en reposo de -67mV se inyectaron diferentes valores de  $d\bar{g}_{Kir}$  (ver flecha en la figura); la introducción de 20nS respecto a su valor default, produjo una fuerte hiperpolarización en el potencial de membrana induciendo el disparo repetitivo en ráfagas; un leve aumento (4nS) respecto a éste último valor, produjo un comportamiento oscilatorio sostenido en el tiempo, con un incremento en la frecuencia de las oscilaciones. Por último, un fuerte incremento de  $d\bar{g}_{Kir}$  (30nS) interfirió con la forma de las ráfagas, las cuales presentaron una especie de plateau durante la fase de despolarización de la ráfaga, incrementando el tiempo de duración de cada ráfaga durante la oscilación.

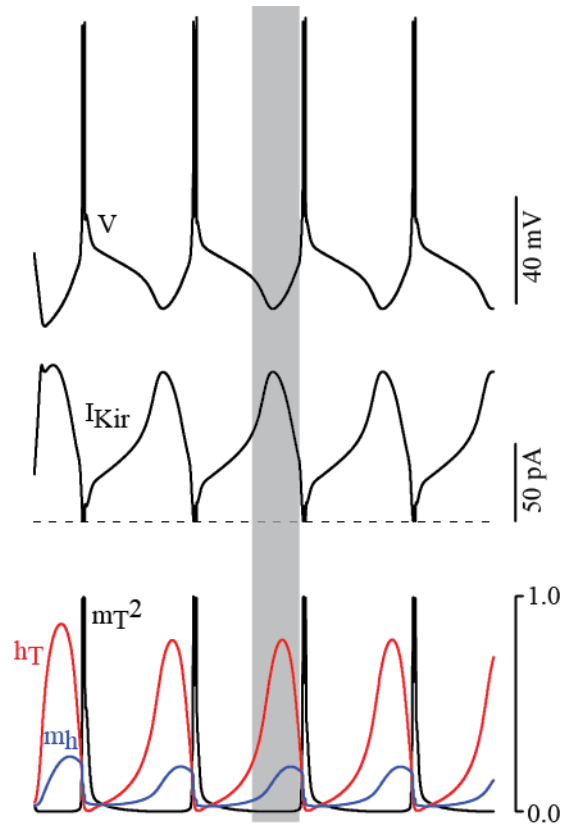




**Figura 2.14. El aumento de  $d\bar{g}_{Kir}$  induce oscilaciones periódicas en neuronas TC.** Registro de *current clamp* de una neurona TC representativa para diferentes valores de  $d\bar{g}_{Kir}$  (10nS, 16nS, 20nS, 24nS y 30nS) introducidos con la técnica de *dynamic clamp* (la flecha y la línea punteada vertical indican el momento donde se inició el *dynamic clamp*). El *inset* de la figura muestra una ráfaga amplificada, compuesta por un LTS y sobre este los potenciales de acción de alta frecuencia.

### 2.3.6 Rol de $I_{Kir}$ en el comportamiento oscilatorio

Tratando de elucidar los mecanismos biofísicos que le permiten a  $I_{Kir}$  iniciar y sostener el modo de disparo en ráfagas repetitivas en neuronas TC reales, empleamos un modelo neuronal más completo con las siete conductancias iónicas que modulan y rigen el comportamiento sub-umbral de estas neuronas  $I_T$ ,  $I_{Kir}$ ,  $I_h$ ,  $I_A$ ,  $I_{NaP}$ ,  $I_{Naleak}$ ,  $I_{Kleak}$  (ver capítulo 1 y <sup>17</sup>); sumado a la corriente catiónica dependiente de calcio  $I_{CAN}$  <sup>91</sup>, que nos permitió reproducir los *plateau* de los registros experimentales (ver Fig. 2.14, condición  $d\bar{g}_{Kir}$  24nS y 30nS); además de la corriente de potasio calcio dependiente  $I_{AHP}$ , la corriente dependiente del voltaje y del calcio  $I_{KCa}$  y la corriente de calcio de alto umbral  $I_L$ ; junto a las corrientes de sodio y potasio necesarias para generar potenciales de acción ( $I_{Na}$  e  $I_K$ ) (para mayor detalle ver apéndice AI). En la figura 2.15 se muestra el curso temporal de las oscilaciones inducidas en el modelo debido a un aumento en la conductancia de Kir, junto con la contribución de la corriente  $I_{Kir}$ , las variables  $h_T$  e  $m_T$  (activación e inactivación de  $I_T$ ) y  $m_h$  (activación de  $I_h$ ).  $I_{Kir}$  fue mínima durante los LTS y los potenciales de acción (que constituyen el disparo en ráfaga) y máxima durante los intervalos inter-ráfagas. La magnitud de  $I_{Kir}$  aumentó durante la fase lenta de hiperpolarización de la ráfaga, hasta un punto crítico en el cuál se produjo un crecimiento abrupto, que llevó a  $I_{Kir}$  a alcanzar su máximo valor; el recuadro sombreado gris permite visualizar mejor este efecto, el cual fue mediado por la activación regenerativa de  $I_{Kir}$ . Esta amplificación de la hiperpolarización produjo una rápida remoción de la inactivación de  $I_T$  (ver aumento en  $h_T$ , trazo rojo) y la activación de  $I_h$  ( $m_h$ , trazo azul). Por último, la disminución de  $I_{Kir}$  se produjo en la fase de iniciación de la ráfaga, en este caso la despolarización inducida por la activación regenerativa de  $I_T$  ( $m_T$ , trazo negro) donde se impuso llevando al  $V_m$  a valores donde  $I_{Kir}$  permaneció mayormente bloqueada.



**Figura 2.15. Rol de  $I_{Kir}$  en el comportamiento oscilatorio de un modelo de neurona TC.** Simulaciones del modelo con  $I_T$ ,  $I_{Kir}$ ,  $I_h$ ,  $I_A$ ,  $I_{NaP}$ ,  $I_{Naleak}$ ,  $I_{Kleak}$ ,  $I_{CAN}$ ,  $I_L$ ,  $I_{AHP}$ ,  $I_{KCa}$  junto a las corrientes necesarias para generar potenciales acción  $I_{Na}$  e  $I_K$ ; implementado en la plataforma de simulación NEURON. Con valores de conductancia  $\bar{g}_{Kir}=30.6nS$ ,  $\bar{g}_{CAN}=2.5nS$ ,  $pTmax=9.1 \times 10^{-9}cm^3/seg$ ,  $\bar{g}_h=1.82nS$ ,  $\bar{g}_{Kleak}=2.27nS$ ,  $\bar{g}_{Naleak}=0.68nS$ ,  $\bar{g}_A=1248,5nS$ ,  $\bar{g}_{NaP}=1.25nS$ ,  $\bar{g}_K=1135nS$ ,  $\bar{g}_{Na}=1135nS$ ,  $\bar{g}_{AHP}=1.14nS$ ,  $\bar{g}_{KCa}=11.35nS$ . El panel superior muestra el curso temporal del potencial de membrana del modelo TC con la presencia de ráfagas repetitivas. El panel del medio muestra el curso temporal de  $I_{Kir}$  durante las ráfagas. El panel inferior muestra el curso temporal de las variables de activación de la corriente  $I_h$  ( $m_h$  trazo azul) junto a la activación de  $I_T$  ( $m_T^2$  trazo negro) y a su variable de inactivación ( $h_T$  trazo rojo). La zona sombreada color gris muestra la región de amplificación del Vm mediado por  $I_{Kir}$ .

## 2.4 Discusión

Combinando técnicas electrofisiológicas y análisis de sistemas dinámicos mostramos que la corriente de potasio rectificadora hacia adentro  $I_{Kir}$  promueve la periodicidad del disparo en ráfagas. Nuestro análisis demuestra que las propiedades biofísicas únicas de  $I_{Kir}$ ,

específicamente la existencia de una región de pendiente negativa del potencial de membrana en la relación corriente / voltaje, inducen la biestabilidad del potencial de membrana y, al interactuar con la corriente catiónica activada por hiperpolarización  $I_h$ , oscila a frecuencias con relevancia fisiológica. Los valles de estas oscilaciones a su vez remueven la inactivación de la corriente de calcio de bajo umbral  $I_T$ , lo que da como resultado la generación del modo disparo de ráfagas repetitivas.

La biestabilidad en neuronas talamocorticales ha sido previamente estudiada <sup>92</sup>. En este trabajo se muestra que las neuronas TC que no presentan biestabilidad de forma fisiológica pueden presentarla con un apropiado balance entre la corriente T y la corriente Leak. Para mostrar este mecanismo en registros electrofisiológicos *in vitro* modificaron los valores endógenos de  $I_T$  e  $I_{leak}$  con la técnica de *dynamic clamp*. Además, usando herramientas de sistemas dinámicos muestran que la biestabilidad se debe a una apropiada combinación entre la corriente de ventana T y la corriente Leak. Con los resultados obtenidos de nuestro estudio sumamos un nuevo mecanismo de inducción de biestabilidad en neuronas TC, mediado por la corriente  $K_{ir}$  y la corriente Leak. Desde una perspectiva dinámica la relación  $i/v$  no monótonica de  $I_{Kir}$  junto con  $I_{leak}$  producen una curva  $i/v$  que cruza el cero en tres puntos, que representan los PF del sistema y le permiten a éste transitar una bifurcación saddle-node en una dimensión. La biestabilidad de este sistema puede verse mejor en los trazos temporales del voltaje para diferentes condiciones iniciales (Fig. 2.7B) obtenidas con el modelo. En un contexto más fisiológico en <sup>53</sup> se muestra que, si se usa como parámetro de bifurcación  $\bar{g}_{leak}$  en vez de la corriente, el sistema sigue preservando la bifurcación de saddle-node, que para un sistema de una dimensión caracteriza la presencia de biestabilidad; mostrando la robustez de  $I_{Kir}$  en inducir y preservar este tipo de comportamiento, aún con el cambio de parámetro.

El sistema  $I_{Kir}$ - $I_h$ -Leaks, presenta dos bifurcaciones Andronov-Hopf supercrítica que le permiten sostener oscilaciones amortiguadas del potencial de membrana y entrar al régimen oscilatorio con una amplitud que crece progresivamente a medida que el parámetro cambia y se aleja del punto de bifurcación. Usando como parámetro de bifurcación  $\bar{g}_{Kleak}$ , en vez de la corriente, para simular un escenario más fisiológico, encontramos que a ciertos

valores de  $\bar{g}_{Kleak}$  la dinámica del sistema transita una bifurcación tipo Andronov-Hopf supercrítica (Fig. 2.11A); pero a medida que  $\bar{g}_{Kleak}$  se hace cada vez más pequeño el sistema salta de la bifurcación anterior a una bifurcación tipo saddle-node en ciclo invariante. Esta última bifurcación caracteriza la dinámica de neuronas tipo I en la clásica clasificación de Hodgkin (ver tabla 1), que permite la generación de oscilaciones a muy bajas frecuencias en la dinámica del sistema. En la figura 2.11B se muestra que este sistema presenta frecuencias oscilatorias que decaen con un comportamiento que sigue la raíz cuadrada de  $\bar{g}_{Kleak}$  abarcando un rango oscilatorio a muy bajas frecuencias  $< 1\text{H}$ ; pudiendo ser un mecanismo que dota a las neuronas con la capacidad de producir oscilaciones compatibles con los ritmos lentos<sup>38,45</sup>.

Un comportamiento oscilatorio que involucra las corrientes  $h$ ,  $Kir$  y  $Leaks$  fue estudiado en interneuronas colinérgicas del estriado<sup>89,93</sup>. Estas interneuronas normalmente están disparando de manera tónica; un comportamiento oscilatorio impuesto por grandes hiperpolarizaciones que interrumpen el disparo tónico ha sido hallado con poca frecuencia en condiciones fisiológicas<sup>89</sup> y de forma más usual, como marcador patológico en modelos animales de Parkinson con Disquinesia<sup>93</sup>. En Wilson 2005 se propone que la interacción de  $I_h$  e  $I_{Kir}$  es fundamental para sostener la actividad oscilatoria en estas interneuronas y desde una perspectiva dinámica,  $I_{Kir}$  induce biestabilidad en el potencial de membrana de las interneuronas siendo la responsable de las grandes hiperpolarizaciones. La contribución de estas corrientes se demuestra en Paz et al. 2021; en este reciente estudio se muestra que las interneuronas colinérgicas del estriado presentan altos valores de  $I_{Kir}$ , junto a una disminución en los  $Leaks$  lo que induce el comportamiento oscilatorio y provoca que las interneuronas oscilen a muy bajas frecuencias (cercanas a  $0.5\text{Hz}$ ). Este comportamiento puede ser inducido en interneuronas que no presentan la actividad oscilatoria, inyectando con *dynamic clamp* valores de  $d\bar{g}_{Kir}$  similares a los usados en nuestro modelo dinámico. Por otro lado, puede ser eliminado usando bloqueadores específicos para  $I_{Kir}$  e  $I_h$ , o empleando la técnica de *dynamic clamp* para disminuir (sustraer) la conductancia de  $Kir$  respecto a su valor basal; o aumentando la conductancia de los  $Leaks$ .

El modelo  $I_h$ - $I_{Kir}$ - $I_T$ - $Leaks$  presenta bifurcaciones Andronov-Hopf, del tipo supercrítica a  $V_m$  despolarizados y subcrítica a  $V_m$  hiperpolarizados. Sumar  $I_{Kir}$  no modifica

el tipo de bifurcación que transita el sistema, ver <sup>52,53</sup>. Cómo puede verse en la figura 2.12,  $I_{Kir}$  produce un aumento en la amplitud de las oscilaciones en el potencial de membrana y brinda al sistema con la posibilidad de generar oscilaciones sin la necesidad de inyectar corriente, mostrando la capacidad de Kir de comportarse como corriente marcapaso de las oscilaciones. A diferencia del sistema  $I_h$ - $I_{Kir}$ -Leaks, donde usamos un alto valor de  $\bar{g}_{Kir} = 40nS$ , el modelo más completo sostiene oscilaciones periódicas que son amplificadas por  $I_{Kir}$  a valores de  $\bar{g}_{Kir} = 9nS$  más cercanos a su valor fisiológico registrado en neuronas talmocorticales (5nS ver <sup>17</sup>).

Los canales Kir son una familia de canales de potasio rectificadores hacia adentro; la subfamilia de los Kir2.x son los canales con mayor poder de rectificación <sup>88</sup>. El bloque con poliaminas y  $Mg^{++}$  en la zona de rectificación del canal producen la región de pendiente negativa que dota a la corriente Kir con la capacidad de amplificar las hiperpolarizaciones <sup>53,89,93</sup>. Empleando modelos dinámicos encontramos que Kir origina oscilaciones sólo cuando está presente la región de pendiente negativa (ver Fig. 2.13); mostrando que la amplificación de la hiperpolarización es el mecanismo biofísico que le permite a Kir no sólo amplificar las oscilaciones, sino también comportarse como corriente marcapaso. El impacto de la pendiente negativa que presentan los canales Kir2.2, fue estudiado en el comportamiento oscilatorio de las interneuronas colinérgicas del estriado, empleando la técnica de *dynamic clamp* <sup>93</sup>; un aumento de la conductancia de  $I_{Kir}$  con pendiente negativa induce el comportamiento oscilatorio en estas neuronas; el cual no puede ser generado si se inyecta con *dynamic clamp* un modelo de Kir sin pendiente negativa.

Aumentar  $I_{Kir}$  respecto a su valor default (Fig. 2.14), induce el modo de disparo repetitivo en ráfagas en todas las neuronas registradas *in vitro*, mostrando experimentalmente lo hallado en el modelo, de que  $I_{Kir}$  tiene la capacidad de iniciar oscilaciones en las neuronas Talamocorticales de manera autónoma, comportándose como una corriente marcapaso de las oscilaciones.

## Capítulo 3

### Contribución de las corrientes iónicas sub-umbrales en la resonancia de neuronas

#### Tálamocorticales

Los potenciales sinápticos y las propiedades individuales de las neuronas se combinan para producir la activación de redes neuronales, que a su vez promueven la conexión de varias estructuras cerebrales; y que tienen como fin generar un estado funcional del cerebro que puede estar acompañado o no, de un cambio comportamental. La actividad eléctrica cerebral que puede ser registrada por varias técnicas, entre ellas el EEG, se manifiesta a través de ritmos globales con frecuencias características, asociados a estados funcionales y comportamentales del individuo <sup>28,37</sup>. Aún hoy en día no se ha podido responder si los ritmos cerebrales tienen una implicancia causal en los estados funcionales del cerebro y por consiguiente del individuo, o son sólo un epifenómeno <sup>94</sup>. Sin embargo hay varias evidencias que relacionan ambos eventos, principalmente asociadas a patologías, que involucran cambios a nivel neuronal y/o sináptico, y que se traducen en alteraciones tanto de los ritmos cerebrales como de los estados comportamentales y funcionales <sup>32,55,68-70</sup>. Buscando el sustrato neuronal de los ritmos cerebrales, se ha puesto énfasis en aquellas neuronas con la capacidad de responder mejor cuando se las estimula en un determinado rango de frecuencias (resonancia intrínseca). Dado que los ritmos cerebrales se manifiestan con patrones eléctricos a determinadas frecuencias, surge la pregunta de qué podría estar generando y contribuyendo a mantener la frecuencia que caracteriza cada ritmo, en este sentido se piensa que la preferencia en frecuencia de las neuronas podría estar colaborando en mantener las frecuencias que caracterizan a los ritmos cerebrales <sup>94</sup>. Dado que las neuronas talamocorticales han sido implicadas en la generación de ritmos tanto fisiológicos como patológicos <sup>33,54,55,68</sup>, en este capítulo analizaremos las características resonantes de las neuronas talamocorticales y los mecanismos que las producen.

## 3.1 Introducción

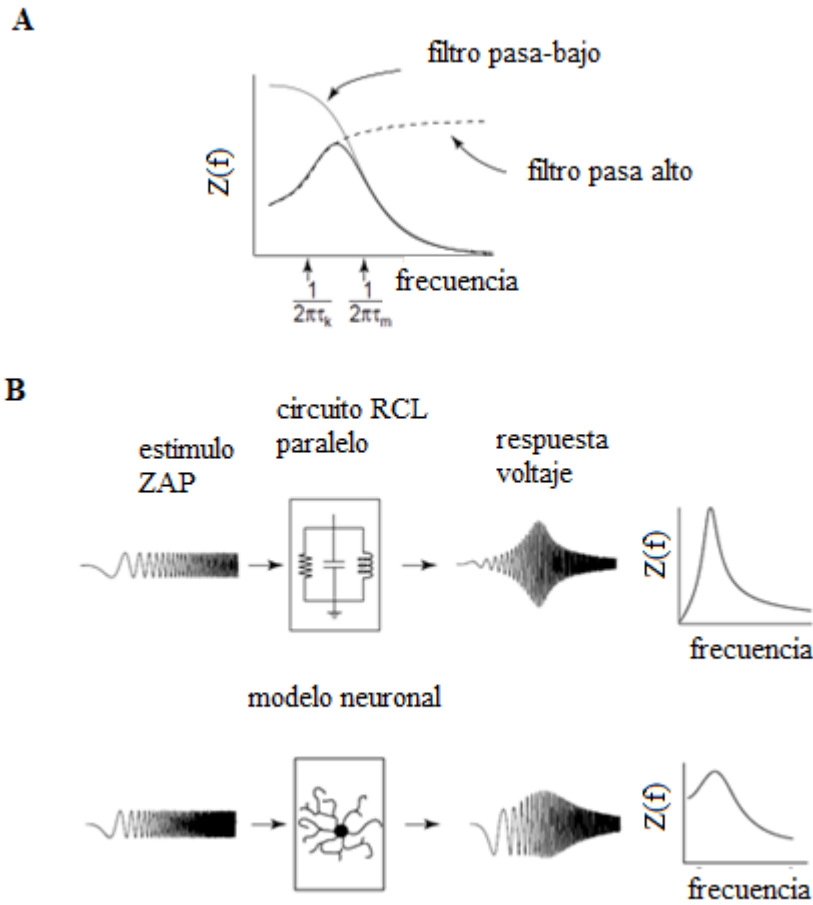
### 3.1.1 Resonancia

Hay neuronas que responden óptimamente cuando son estimuladas de forma periódica dentro de un rango acotado de frecuencias. Esta respuesta preferencial de las neuronas a una determinada banda de frecuencias se debe a la combinación de la actividad de cierto tipo de canales iónicos, que depende tanto del voltaje como del tiempo, con las propiedades pasivas de la membrana plasmática <sup>94</sup>. Las neuronas expresan una gran diversidad de canales iónicos que determinan y modulan su forma de respuesta <sup>95</sup>. Los canales iónicos con una cinética de apertura y/o cierre lenta generan corrientes que pueden oponerse a las variaciones lentas del potencial de membrana sin intervenir con las variaciones rápidas. Este tipo de comportamiento puede modelarse con un circuito eléctrico con características de un filtro pasa alto, que permite el paso de altas frecuencias y bloquea las bajas. Por otra parte, la membrana plasmática se puede modelar como un circuito compuesto por una capacitancia y una resistencia en paralelo; donde la bicapa lipídica actúa como las placas de un capacitor, y los canales iónicos de fuga, que son relativamente independientes del voltaje y el tiempo, actúan como resistencias óhmicas. Este circuito se comporta como un filtro pasa bajo que filtra las altas frecuencias y deja pasar las bajas. La combinación de estas características intrínsecas, pensadas como un filtro pasa bajo y un filtro pasa alto (figura 3.1A), pueden dar como resultado un comportamiento análogo a un filtro pasa banda que se caracteriza por responder mejor ante un estímulo que se ubique dentro de un determinado rango de frecuencias.

Para estudiar la preferencia en frecuencia de las neuronas se utiliza una corriente de estimulación oscilatoria. El método más conocido en el área es la función ZAP (por su sigla en inglés, *Impedance amplitude profile*) en donde el estímulo corresponde a una corriente sinusoidal que varía su frecuencia de forma lineal <sup>96</sup>. En la figura 3.1B puede verse el estímulo ZAP y las respuestas en voltaje obtenidas con un modelo de un filtro pasa banda (representado por un circuito RCL en paralelo) y un modelo neuronal; el estímulo ZAP y el voltaje de salida se utilizan para calcular la magnitud de impedancia eléctrica ( $Z(f)$ ).  $Z(f)$  representa la medida de todo lo que se opone al flujo de corriente en el plano de frecuencias; y como característica de un filtro pasa banda, la  $Z(f)$  varía con la frecuencia en forma



acampanada (Fig. 3.1). El pico máximo de impedancia se define como resonancia y el rango de frecuencias alrededor del máximo representa las frecuencias preferenciales de estimulación. Por último, además de tener la capacidad de producir resonancia, hay corrientes iónicas que pueden amplificar la impedancia y por ende aumentar la resonancia de las neuronas; pudiendo de esta forma favorecer aún más la respuesta neuronal dentro del rango de frecuencias preferenciales.



**Figura 3.1. Características de  $Z(f)$  en modelos resonantes.** (A) grafico  $Z(f)$  versus frecuencia para un modelo con características de filtro pasa bajo (curva gris claro, con una curva que es máxima a bajas frecuencias y decae a altas frecuencias, de tal forma de dejar pasar las bajas frecuencias y filtrar las altas), y de filtro pasa alto (curva discontinua, con una curva que es mínima a bajas frecuencias y máxima a altas frecuencias, lo que le permite filtrar las bajas frecuencias y dejar pasar las altas). La combinación temporal adecuada entre ambas curvas da como resultante una  $Z(f)$  (curva negra continua) en forma acampanada con un pico máximo (resonancia) a un determinado rango de frecuencias. (B) Esquema de cómo obtener la magnitud de impedancia eléctrica de un modelo (curvas  $Z(f)$  paneles derechos). La aplicación de una entrada de corriente con forma sinusoidal (estímulo ZAP) sobre un circuito RCL en paralelo (panel superior) o sobre un modelo neuronal (panel inferior), genera una determinada salida (respuesta en voltaje); la magnitud de impedancia eléctrica de ambos modelos se obtiene del módulo del cociente entre la transformada de Fourier de la salida (voltaje) sobre la entrada (corriente), ver métodos. Figura modificada de 94.

### 3.1.2 Corrientes resonadoras y amplificadoras

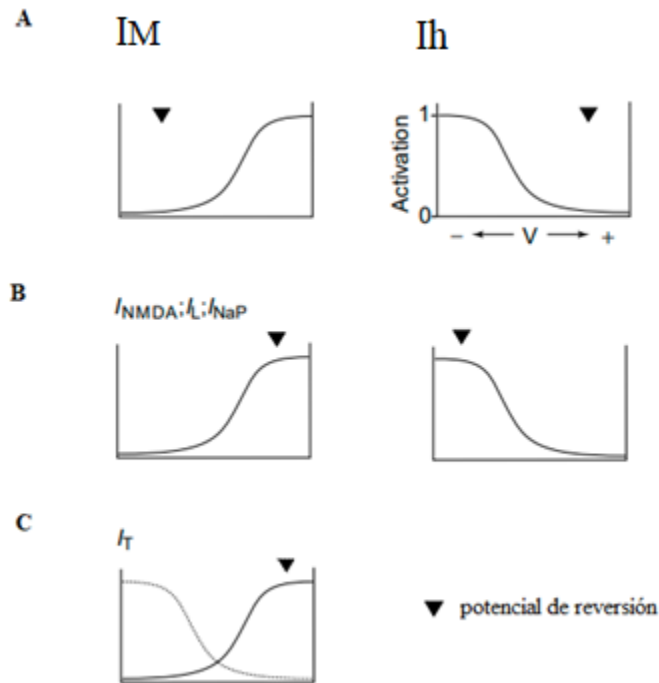
Los canales iónicos poseen propiedades biofísicas con la capacidad de generar corrientes con características resonadoras, amplificadoras o incluso ambas. Una corriente iónica que se opone a los cambios en el potencial de membrana, puede actuar como resonadora; dos ejemplos clásicos de corrientes resonadoras son la corriente lenta no-inactivante de potasio tipo M ( $I_M$ ) y la corriente catiónica activada por hiperpolarización  $I_h$ <sup>97</sup>. Los canales M aumentan su probabilidad de apertura cuando se despolariza el potencial de membrana; esto puede verse en la figura 3.2A (panel izquierdo) donde está representada de forma esquemática la curva de activación de este canal ( $m_K$ ). La apertura del canal genera el flujo del ion potasio hacia fuera de la célula ( $I_M$ ), contrarrestando la despolarización. La  $I_M$  produce una hiperpolarización que tiende a llevar el  $V_m$  hacia su potencial de reversión ( $E_{rev}$ ); pero dado que éste se halla en la base de la curva de activación (ver flecha en la figura) este efecto también produce que la probabilidad de apertura del canal disminuya. Por otro lado, los canales h aumentan su probabilidad de apertura cuando se produce una hiperpolarización del  $V_m$ ; la activación del canal  $m_h$  (esquemática en figura 3.2A, panel derecho) provoca el flujo de cationes hacia el interior celular contrarrestando la hiperpolarización. La  $I_h$  despolariza el  $V_m$  y tiende a llevarlo hacia su  $E_{rev}$ , al igual que  $I_M$ , esto produce una disminución en la probabilidad de apertura del canal, y el  $E_{rev}$  no es alcanzado, dado que su activación tiende a su estado no permisivo ( $m_h \rightarrow 0$ ). En resumen, los requerimientos biofísicos básicos para una corriente resonadora son: poseer una curva de activación/inactivación que aumente para oponerse a cambios en el  $V_m$  (despolarizantes o hiperpolarizantes) y un potencial de reversión situado en su base; cualquier corriente iónica (o variable de activación/inactivación) que cumpla con estos requisitos puede ser resonadora. Sin embargo, la expresión de este tipo de canal en las neuronas no es una condición suficiente para producir resonancia; para que pueda producirse el fenómeno, además de los requisitos antes mencionados, la corriente o variable tiene que tener una cinética lenta respecto a la constante temporal de la membrana plasmática (propiedades pasivas).

Por otra parte, los canales iónicos que tienen una cinética de apertura rápida, cuya activación aumenta en dirección de los cambios del  $V_m$ , pueden producir corrientes amplificadoras. Las características biofísicas de las corrientes amplificadoras están

ejemplificadas en la figura 3.2B; al contrario de las corrientes resonadoras, el potencial de reversión se encuentra cercano al tope de la curva de activación (ver flecha en la figura), de tal forma que el flujo de la corriente aumenta aún más la activación del canal de forma regenerativa. La corriente persistente de sodio ( $I_{NaP}$ ) es la típica corriente amplificadora; cambios en el  $V_m$  que causen despolarización van a producir la apertura del canal, y el  $Na^+$  que fluye hacia el interior de la célula por estos canales a su vez retroalimenta positivamente la despolarización del  $V_m$ .

Un ejemplo donde las corrientes antes mencionadas participan en la generación y amplificación de la resonancia es en las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo <sup>97</sup>. En este estudio se encontró que estas neuronas presentan resonancia en un rango de frecuencias comprendido dentro de la banda de frecuencias del ritmo global theta. Esta resonancia es dependiente del voltaje y se manifiesta a dos potenciales de membrana diferentes: a valores de  $V_m$  despolarizados la resonancia se debe a la interacción de  $I_M$  con las propiedades pasivas de la membrana, mientras que a valores de  $V_m$  hiperpolarizados la resonancia se debe a la interacción de estas últimas con la corriente  $I_h$ . Además, hallan que la amplificación de la resonancia es mediada por  $I_{NaP}$  solo a  $V_m$  despolarizados, donde  $I_M$  media la resonancia.

Por último, un ejemplo de canal iónico por el cual fluye una corriente que podría comportarse como resonadora y al mismo tiempo como amplificadora, es la corriente de calcio de bajo umbral ( $I_T$ ) <sup>98</sup>, debido a la combinación de sus propiedades biofísicas de inactivación y activación del canal. Por un lado, la variable de inactivación ( $h_T$ ) cumple con los requisitos de resonadora debido a que posee una cinética lenta y el  $E_{rev}$  en la base de su curva y; por otro lado, la variable de activación ( $m_T$ ) cumple con los requisitos de amplificadora, ya que es una variable rápida y el  $E_{rev}$  se halla en el tope de su curva (ver figura 3.2C).



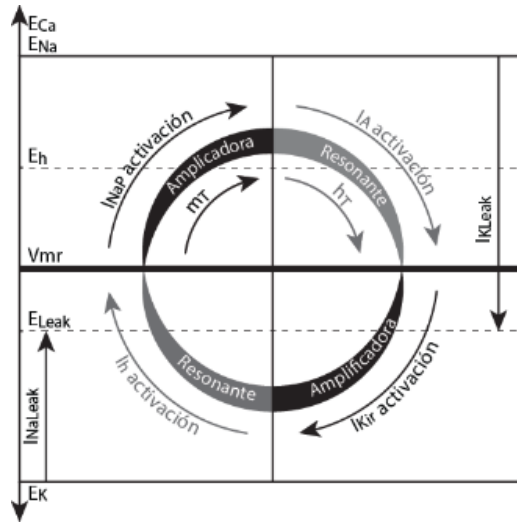
**Figura 3.2. Propiedades biofísicas de corrientes con potencial de resonadoras y amplificadoras.** (A) gráfico esquemático de las variables de activación de  $I_M$  (panel izquierdo) e  $I_h$  (panel derecho) en función del voltaje de membrana. Ambas variables aumentan su activación (activación  $\rightarrow$  1) con cambios en el  $V_m$  ( $I_M$  con despolarización e  $I_h$  con hiperpolarización), y poseen un potencial de reversión (flecha) en la base de sus curvas de activación, que contrarresta la activación. (B) gráfico esquemático de corrientes amplificadoras, las cuales tienen la característica de aumentar su activación con cambios en el  $V_m$ , ya sean despolarizantes (panel izquierdo) o hiperpolarizantes (panel derecho), y además poseen un potencial de reversión en el máximo de su curva de activación que retroalimenta su activación. (C) gráfica esquemática de la variable de activación (curva continua) e inactivación (curva discontinua) para la corriente T, que combina las características de corriente resonadora (A) y las de corriente amplificadora (B). Figura modificada <sup>94</sup>.

### 3.1.3 Resonancia en neuronas TC

La resonancia en neuronas TC, pertenecientes a los núcleos medio dorsales talámicos, ha sido estudiada <sup>98,99</sup> usando registros electrofisiológicos y modelado computacional. En estos estudios clásicos se encontró que las neuronas TC tienen un comportamiento resonante a frecuencias entre 2 - 4 Hz mediado por la corriente de calcio de bajo umbral  $I_T$  en combinación con las propiedades pasivas de la membrana plasmática. Específicamente se halló, usando modelado computacional, que la variable de inactivación del canal  $I_T$  es la responsable del comportamiento resonante debido a su cinética lenta. Otra corriente que también fue estudiada en forma experimental, es la corriente catiónica activada por hiperpolarización  $I_h$ ; sin embargo, el bloqueo de  $I_h$  con Cesio (un bloqueador inespecífico) no tuvo efecto sobre el comportamiento resonante de las neuronas TC y por lo tanto esta corriente se omitió del estudio teórico.

En estudios previos del grupo <sup>17</sup> se estudió la contribución de siete corrientes iónicas al control del potencial de membrana en reposo y a la generación de oscilaciones sub-umbrales dentro del rango de frecuencia delta (1- 4 Hz) en neuronas TC pertenecientes a los núcleos ventrobasales (VB) (ver capítulo 1). Con base en estos datos experimentales se desarrolló un modelo computacional que permitió estudiar la contribución de cada una de estas siete corrientes iónicas en el establecimiento y mantenimiento del potencial de membrana en reposo, y en la generación del disparo en ráfagas repetitivo que caracteriza a las neuronas TC. Los resultados del estudio muestran que además de  $I_T$  hay otras corrientes que se expresan en las neuronas TC que podrían comportarse como resonadoras o amplificadoras. En la figura 3.3 se muestra un esquema de la interacción entre las distintas conductancias sub-umbrales para mantener el potencial de membrana en reposo y el comportamiento oscilatorio en neuronas TC; donde esto último es generado a través de la interacción dinámica entre sus variables resonadoras y amplificadoras. Por su parte, las corrientes de fuga  $I_{Nleak}$  e  $I_{Kleak}$  generan un balance que contribuye mayoritariamente a establecer el potencial de membrana en reposo ( $V_{mr}$ ) y a proveer el escenario electrotónico óptimo para permitir las distintas fluctuaciones funcionales del potencial de membrana. Una perturbación del  $V_m$  hacia el lado despolarizante, promueve la activación de  $I_{NaP}$  e  $I_T$  ( $m_T$ ) amplificando la despolarización y desencadenando la activación de la corriente de potasio

inactivante tipo A ( $I_A$ ), que actúa como corriente resonadora para restablecer el  $V_{mr}$ . Al contrario, una perturbación que hiperpolarice el  $V_m$ , provoca la activación del canal de potasio rectificador hacia adentro  $I_{Kir}$ , que actúa como amplificador de la hiperpolarización promoviendo la activación de  $I_h$  la cual restablece el  $V_{mr}$ .



**Figura 3.3. Esquema de la interacción entre las siete conductancias sub-umbrales que generan un comportamiento oscilatorio y establecen el  $V_{mr}$  en neuronas TC.**

$I_{NaP}$  e  $I_{leak}$  son las corrientes de fuga que contribuyen al potencial de reversión  $E_{leak}$ , (línea horizontal discontinua), las corrientes despolarizantes abiertas de manera tónica (cuadrante izquierdo) alejan el  $V_m$  del  $E_{leak}$ ; al contrario, las corrientes hiperpolarizantes abiertas de manera tónica empujan el  $V_m$  hacia  $E_{leak}$ ; el balance entre todas estas fuerzas da como resultado el potencial membrana en reposo ( $V_{mr}$ , línea negra continua horizontal). El comportamiento oscilatorio surge de la interacción dinámica entre las corrientes despolarizantes que contribuyen a restaurar el  $V_{mr}$  (resonante ( $I_h$ ), cuadrante izquierdo inferior), o que empujan el  $V_m$  y lo alejan del reposo (amplificadora ( $I_{NaP}$  y  $m_T$ ), cuadrante izquierdo superior); junto a las corrientes hiperpolarizantes que contribuyen a la restauración del  $V_{mr}$  (resonante ( $I_A$  y  $I_h$ ), cuadrante derecho superior) o las que lo empujan y alejan del reposo (amplificadora ( $I_{Kir}$ ), cuadrante derecho inferior). Figura modificada de <sup>17</sup>.

Como se mencionó antes, la expresión de corrientes con las características biofísicas para generar resonancia y amplificación no es condición suficiente para producir el comportamiento resonante en neuronas. Un ejemplo de esto ocurre con la corriente T; por un lado,  $I_T$  en las neuronas de la oliva inferior actúa como corriente amplificadora y no resonadora <sup>77</sup>; y por otro lado la expresión del mismo canal (la subunidad CaV3.1) en neuronas TC genera una  $I_T$  que produce resonancia y amplificación <sup>99</sup>.

Dado que los estudios de nuestro grupo arrojan nuevas evidencias sobre las corrientes iónicas que se expresan en neuronas talamocorticales, y que estas tienen el potencial de producir resonancia y amplificación; decidimos ampliar el estudio de la resonancia en estas neuronas; primero revisamos las características de resonancia de las neuronas TC de los núcleos VB y el impacto de  $I_T$  en este comportamiento, y por último analizamos la influencia de las corrientes h y  $K_{ir}$ . Para desarrollar el estudio, realizamos registros electrofisiológicos en rodajas de cerebro de ratón, empleando la técnica de *patch-clamp*, bloqueadores específicos de canales iónicos y *dynamic-clamp*. Además, sumamos al estudio experimental diversos modelos computacionales de la neurona TC, que nos permitieron examinar a fondo cómo los parámetros biofísicos de las corrientes involucradas intervienen en el comportamiento resonante.

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Parte experimental

La metodología de la preparación de las rodajas y los experimentos de electrofisiología se especifican en los métodos del capítulo 2. A continuación se definen los fármacos que se implementaron para bloquear canales iónicos específicos y los protocolos experimentales.

#### *Fármacos*

Para eliminar corrientes iónicas, usamos bloqueadores específicos de canales iónicos: 10  $\mu$ M ZD 7288 para  $I_h$ , 10  $\mu$ M Ba<sup>++</sup> para  $I_{K_{ir}}$  y 3  $\mu$ M TTA P2 para  $I_T$ . Cada bloqueador fue directamente diluido a su concentración final dentro del fluido ACSF, que perfunde a la



cámara de registro. El fármaco ZD 7288 fue comprado a Tocris (Mineapolis, MN); el Bario a Sigma Aldrich (San Luis, MO) y el TTA P2 donado por laboratorios Alomone (Jerusalen, Israel).

### ***Protocolo de pulsos cuadrados***

Fueron implementados en *current clamp* y aplicados desde un potencial de membrana inicial que se corresponde con -65mV, el cual fue fijado por una inyección de corriente constante ya sea despolarizante o hiperpolarizante; cada pulso cuadrado representa una inyección de corriente de amplitud y duración constante. Un protocolo de pulsos cuadrados consta de 5 pulsos de corriente hiperpolarizante y 5 pulsos de corriente despolarizante. La duración de cada pulso es de 2 segundos, y la corriente inyectada para generar los saltos constantes en el protocolo es ajustada manualmente en el experimento ya que depende de las características de la neurona parchada.

### ***Impedancia eléctrica***

Para el análisis de resonancia usamos la función *Impedance Amplitude Profile* (ZAP)<sup>96</sup> como corriente de estímulo para medir la impedancia eléctrica en neuronas TC. Esta función varía linealmente en frecuencia y su amplitud fue ajustada manualmente durante el registro experimental, de forma que la respuesta en voltaje no superara los 10mVpp. Usamos dos protocolos de estimulación de corriente ZAP, un protocolo en un rango entre 0.0025 y 10Hz, y otro protocolo entre 0.0025 y 5 Hz; ambos protocolos con una duración de 40 segundos. Los protocolos de estimulación fueron aplicados 4 veces para cada condición, y la repuesta en voltaje obtenida fue promediada para su posterior análisis.

La impedancia eléctrica fue calculada como el cociente entre la transformada de Fourier (FFT) del voltaje (salida) y la transformada de Fourier de la corriente de estímulo ZAP (entrada), (ecuación 3.1), el cual es un número complejo. Para obtener la magnitud de Impedancia  $Z(f)$ , necesaria para el estudio de resonancia, se calculó el módulo de este número complejo (ecuación 3.2).

$$z(f) = \frac{FFT(voltaje)}{FFT(corriente)} \quad (3.1)$$

$$Z(f) = |z(f)| = \sqrt{z_{Real}^2(f) + z_{Imaginario}^2(f)} \quad (3.2)$$

Para separar las neuronas resonantes de aquellas que no lo son usamos el valor  $Q^{100}$ , que se obtiene del cociente entre la magnitud de impedancia que corresponde al pico de resonancia, y la magnitud de impedancia que se obtiene a la mínima frecuencia considerada para el estudio; en nuestro caso 0.2 Hz. Debido a que el trazo de datos fue ruidoso y presentó cierta dificultad para estimar el pico de resonancia; ajustamos los datos a una curva teórica que corresponde a la respuesta en impedancia de un circuito RCL en paralelo<sup>100</sup> para obtener los valores de impedancia necesarios para el cálculo del valor  $Q$ .

### ***Test estadístico***

Los resultados promediados se expresan como valor medio  $\pm$  desvió estándar. Para la significancia estadística se utilizó la prueba t de Student y el test de Wilcoxon con  $\alpha < 0,05$  como criterio de significación.

### **3.2.2 Modelo computacional**

Usamos ecuaciones tipo Hodgkin y Huxley similares a las usadas en<sup>17,52,53</sup> para construir modelos de un compartimiento de la neurona TC; usando la plataforma de simulación *Neuron*<sup>82</sup>. Para el estudio presentado en este capítulo se usaron las siguientes corrientes: corriente de calcio de bajo umbral T ( $I_T$ ); corriente catiónica activada por hiperpolarización ( $I_h$ ); corriente de potasio rectificadora hacia adentro ( $I_{Kir}$ ); corriente Kir sin pendiente negativa ( $I_{KirNoNS}$ , ver capítulo 2); y por último los Leaks, que se corresponde con la corriente de fuga de potasio ( $I_{Kleak}$ ) y con la corriente de fuga de sodio ( $I_{Naleak}$ ). Para mayor detalle de las ecuaciones diferenciales ver (apéndice AI) donde se describe la biofísica de cada corriente iónica. A continuación, se muestran de forma simplificada la combinación de las distintas corrientes iónicas que se emplearon para generar los diferentes modelos de la neurona TC usados en este capítulo.

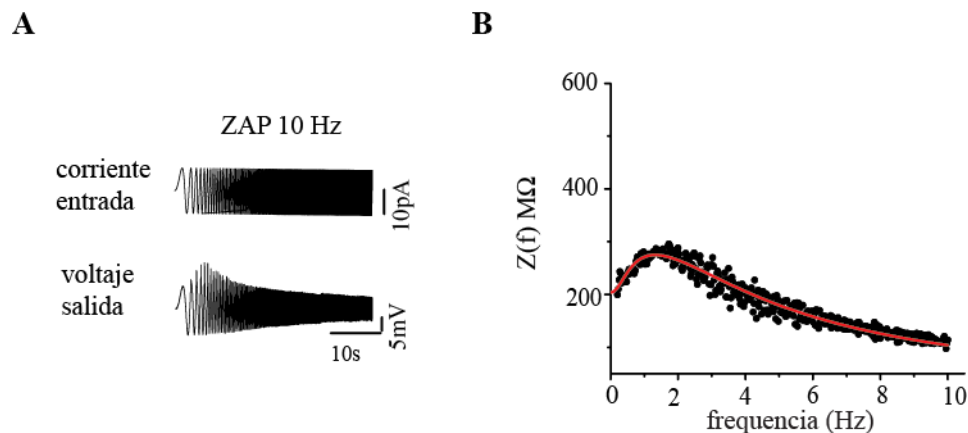
- Modelo simplificado  $I_T+I_h+I_{K_{ir}}+Leaks$
- Modelo mínimo  $I_T+Leaks$
- Modelo mínimo  $I_h+Leaks$
- Modelo mínimo  $I_T+I_h+Leaks$
- Modelo mínimo  $I_T+I_{K_{ir}}+Leaks$

Los valores de conductancias iónicas implementados en las simulaciones se especifican al pie de figura.

### 3.3 Resultados

#### 3.3.1 Caracterización de la resonancia

Para estudiar la presencia de resonancia en las neuronas TC se utilizó la técnica de *patch-clamp* en la configuración *whole cell* y se registró en modo *current clamp*. Bajo este modo de registro, se estimuló a las neuronas con una inyección de corriente sinusoidal ZAP (ver métodos). En la figura 3.4A se muestra la corriente ZAP (protocolo hasta 10Hz) que se usó para estimular las neuronas, y el voltaje de salida de una neurona TC como respuesta al estímulo. La respuesta en voltaje permite una primera estimación del tipo de comportamiento de la neurona, la forma de huso del voltaje de salida muestra que hay componentes de la corriente ZAP ubicadas en un rango acotado de frecuencias, que generan una respuesta de mayor amplitud en la neurona. En la figura 3.4B se muestran los valores de magnitud de impedancia eléctrica en función de la frecuencia, calculados con los datos de la (Fig. 3.4A), dado que el estímulo es una corriente que se mantiene constante en su amplitud, la forma acampanada de  $Z(f)$  muestra que la neurona presenta frecuencias de estimulación donde su respuesta es máxima. Para ubicar el valor máximo de impedancia eléctrica ( $Z_{max}$ ) en cada curva, ajustamos los datos experimentales a una función que describe la respuesta de impedancia eléctrica de un circuito fenomenológico RCL en paralelo (curva roja superpuesta, Fig. 3.4B); de esta forma se obtuvieron los  $Z_{max}$  y sus frecuencias correspondientes para 42 neuronas registradas bajo este protocolo ( $Z_{max} = 300.54M\Omega \pm 141.46M\Omega$ ;  $f_r = 1.08Hz \pm 0.34Hz$ ;  $n = 42$ ).

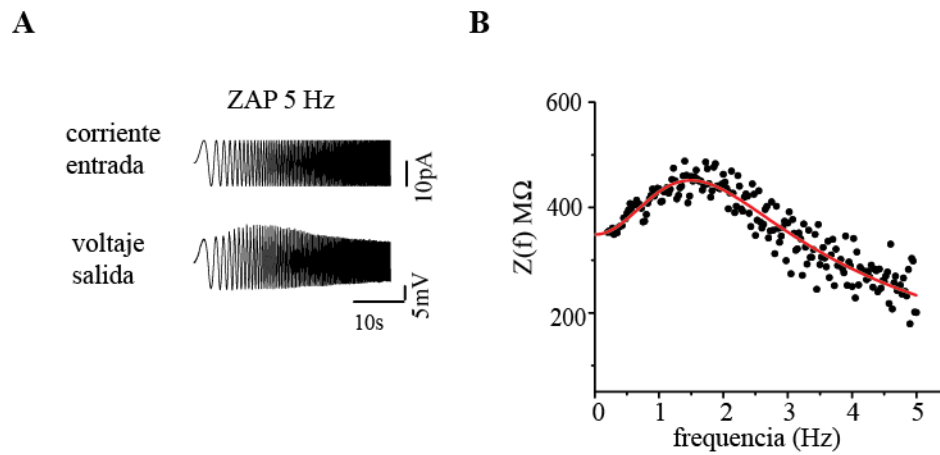


**Figura 3.4. Resonancia en neuronas TC con una ZAP de 10Hz.** (A) Protocolo de estimulación ZAP de 10Hz y la correspondiente respuesta en voltaje de una neurona representativa. (B) Respuesta  $Z(f)$  de la neurona (A), junto al ajuste de los datos experimentales con un modelo fenomenológico de un circuito RCL en paralelo (curva roja superpuesta).

Dado que la variación relevante de la respuesta eléctrica en las neuronas TC ocurre a bajas frecuencias, intentamos aumentar la resolución utilizando un protocolo de estimulación ZAP que varía hasta 5Hz en el mismo tiempo. En la figura 3.5A se muestra el protocolo de estimulación y la respuesta en voltaje para una neurona representativa y su correspondiente perfil de impedancia eléctrica (Fig. 3.5B). Registramos 19 neuronas bajo este protocolo experimental, los valores obtenidos a partir del ajuste fueron ( $Z_{max} = 389.16M\Omega \pm 139.17M\Omega$ ;  $fr = 0.99Hz \pm 0.29Hz$ ;  $n = 19$ ).

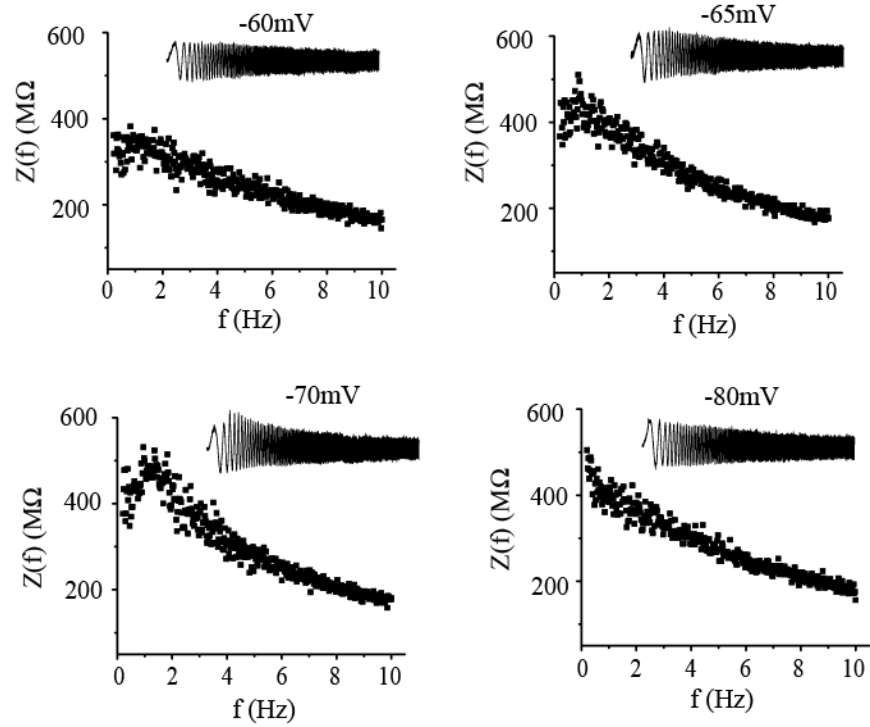
Después de contrastar los resultados obtenidos con los dos protocolos de estimulación ZAP observamos que el protocolo de 5Hz no mostró una mejora en la resolución a bajas frecuencias, la comparación de ambos protocolos no presentó diferencias significativas respecto a la frecuencia de resonancia ( $fr = 1.08 \pm 0.34$ ;  $n = 42$  y  $fr = 0.99 \pm 0.29$ ;  $n = 19$  para 10 Hz-protocolo y 5Hz-protocolo respectivamente;  $p = 0.34$ ; t-test); por lo tanto, los

resultados obtenidos con ambos protocolos fueron agrupados y analizados en conjunto a lo largo del estudio.



**Figura 3.5. Resonancia en neuronas TC con una ZAP de 5Hz.** (A) Protocolo de estimulación ZAP de 5Hz y la correspondiente respuesta en voltaje de una neurona representativa. (B) Respuesta  $Z(f)$  de la neurona (A), junto al ajuste de los datos experimentales con un modelo fenomenológico de un circuito RCL en paralelo (curva roja superpuesta).

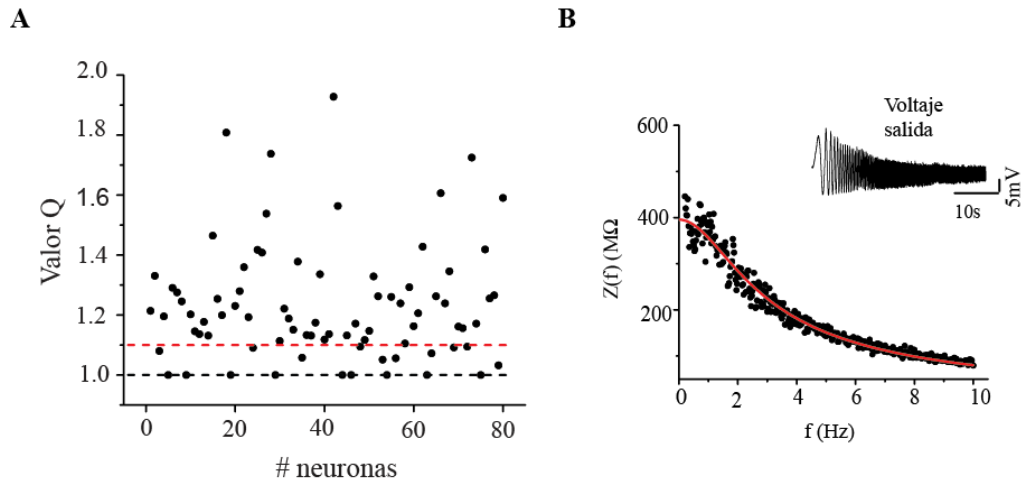
El comportamiento eléctrico de las neuronas se debe a las propiedades pasivas de la membrana plasmática y a las corrientes iónicas que fluyen por los canales iónicos dependientes de voltaje que expresa; por esta razón no es sorprendente que dicho comportamiento varíe en función del potencial de membrana. En la figura 3.6 se ve cómo la respuesta eléctrica está influenciada por el potencial de membrana en que se encuentre la neurona al momento de realizar el experimento. Para encontrar el  $V_m$  óptimo para el estudio de resonancia realizamos experimentos de estimulación con el protocolo ZAP después de fijar el potencial de membrana a diferentes valores mediante la inyección constante de corriente despolarizante o hiperpolarizante. La figura 3.6 muestra la respuesta de una neurona a cuatro diferentes valores de  $V_m$ . El comportamiento eléctrico resonante prevaleció para los  $V_m$  de -60, -65 y -70mV y desapareció cuando la neurona se mantuvo en -80mV. Sin embargo, como se puede apreciar en la figura, el potencial de membrana a -70mV presentó el comportamiento resonante de mayor amplitud. Este valor coincide con el potencial de membrana en reposo de las neuronas TC <sup>17</sup>. Por ambos motivos se decidió fijar a -70mV el potencial de membrana para el análisis del comportamiento resonante.



**Figura 3.6.** Cambios en la resonancia con el  $V_m$ .  $Z(f)$  a diferentes potenciales de membrana (-60mV, -65mV, -70mV y -80mV) para una neurona representativa. Los *insets* muestran la respuesta en voltaje debidas al input ZAP para cada condición de  $V_m$ .



La presencia o ausencia de resonancia fue determinada mediante el ajuste del perfil de impedancia eléctrica de todas las neuronas registradas a un circuito RCL fenomenológico. Para este propósito calculamos el valor  $Q^{100}$ , que se obtiene del cociente entre el  $Z_{max}$  y el valor de impedancia eléctrica a la mínima frecuencia considerada. Si bien la frecuencia mínima inicial de los protocolos ZAP fue de 0.0025Hz, consideramos para los cálculos una mínima frecuencia de corte a 0.2Hz, de forma de minimizar las distorsiones a muy bajas frecuencias<sup>100</sup>. Calculamos el valor  $Q$  para 80 células usando la ecuación  $Q=Z_{max}/Z(0.2Hz)$ , y establecimos que aquellas neuronas con un  $Q \geq 1.1$  presentaron un comportamiento resonante, y aquellas con un  $Q < 1.1$  no; este valor de corte establece que el máximo de  $Z(f)$  se diferencie de su valor inicial  $Z(0.2Hz)$  en al menos un 10%. Usando este criterio encontramos 61 neuronas resonantes (figura 3.7A) y 19 no resonantes. Sin embargo, en este grupo de neuronas con  $Q < 1.1$  hubo neuronas con una débil resonancia ( $1 < Q < 1.1$ ), y otras con  $Q=1$  que se comportaron como verdaderos filtros pasa bajos (Fig. 3.7A, línea negra punteada). En la Fig. 3.7B se muestra el comportamiento eléctrico de una neurona representativa de la población con  $Q=1$ ; como puede verse en la figura, la respuesta en voltaje ante un estímulo ZAP presentó grandes deflexiones en voltaje que se correspondieron a las oscilaciones lentas del estímulo; las cuales luego decayeron conforme las oscilaciones del estímulo se hicieron más rápidas; esto mismo puede verse reflejado en su respuesta de impedancia eléctrica, cuyo perfil  $Z(f)$  posee un máximo a bajas frecuencias y luego decae a medida que las frecuencias aumentan (comparar respuesta pasa bajo de Fig. 3.7B con Fig. 3.1A curva gris).



**Figura 3.7. Diversidad de la respuesta eléctrica en neuronas TC.** (A) Gráfica de valores Q versus número de neuronas registradas; donde cada punto representa el valor Q de una neurona TC. Las neuronas con valores  $Q \geq 1.1$  (línea discontinua roja horizontal) fueron consideradas resonantes. Neuronas con valores  $Q < 1.1$  se consideraron como no resonantes; perteneciendo a este último grupo las neuronas con una resonancia débil ( $Q < 1.1$  y  $> 1$ ) y las neuronas con comportamiento pasa bajo ( $Q = 1$ , línea discontinua negra horizontal). (B) perfil  $Z(f)$  de una neurona con  $Q = 1$ , cuya respuesta de voltaje puede verse en el *inset* de la figura.

Del ajuste RCL también obtuvimos una aproximación de los parámetros pasivos para todas neuronas registradas (ver tabla 3.1), comparando los valores de resistencia y capacitancia entre las neuronas resonantes y las no resonantes no hallamos diferencias significativas.

Neuronas	Resistencia de membrana ( $R_m$ )	Capacitancia (C)
Resonantes (n=45)	$347.2 \pm 22M\Omega$	$0.147 \pm 0.006nF$
No resonantes (n=19)	$424 \pm 22M\Omega$	$0.142 \pm 0.009nF$
p valor (t-test)	0.08	0.6

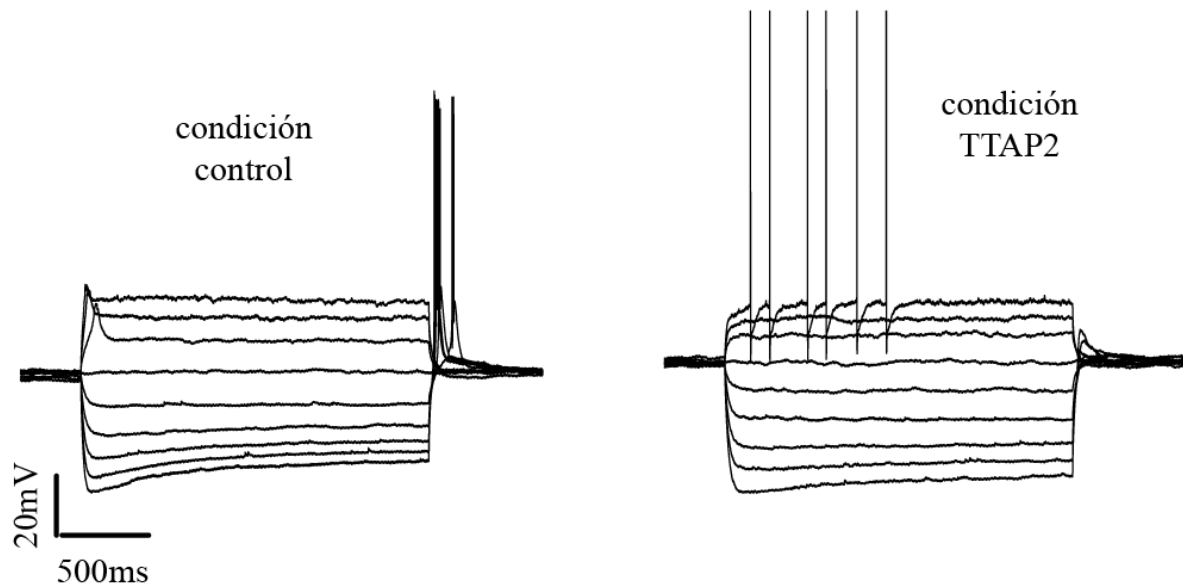
**Tabla 3.1. Resonantes versus no resonantes.** Comparación de las propiedades pasivas (resistencia de membrana y la capacitancia) para neuronas resonantes y no resonantes. Obtenidas del ajuste a los datos experimentales con la respuesta de impedancia de un circuito RCL para las neuronas resonantes y un circuito RC para las no resonantes.

### 3.3.2 Contribución de $I_T$ a la resonancia de neuronas TC

Los canales de calcio de bajo umbral que se expresan mayoritariamente en las neuronas TC están constituidos por las subunidades principales CaV3.1. Para estudiar cómo influye la corriente T ( $I_T$ ), que circula por los canales CaV3.1, en la resonancia de las neuronas, usamos TTAP2 un bloqueador específico de canales iónicos de la familia CaV3<sup>101</sup> y evaluamos cómo se modifica el comportamiento eléctrico de la neurona sin la presencia de esta corriente. Para esto, primero inyectamos la corriente ZAP a las neuronas, en condición control (sin TTAP2), medimos su respuesta en voltaje y nos quedamos con aquellas que su perfil  $Z(f)$  cumplió el criterio resonante de ( $Q \geq 1.1$ ). Luego, pusimos en la solución de registro la droga TTAP2 y realizamos nuevamente el experimento, bajo esta nueva condición.

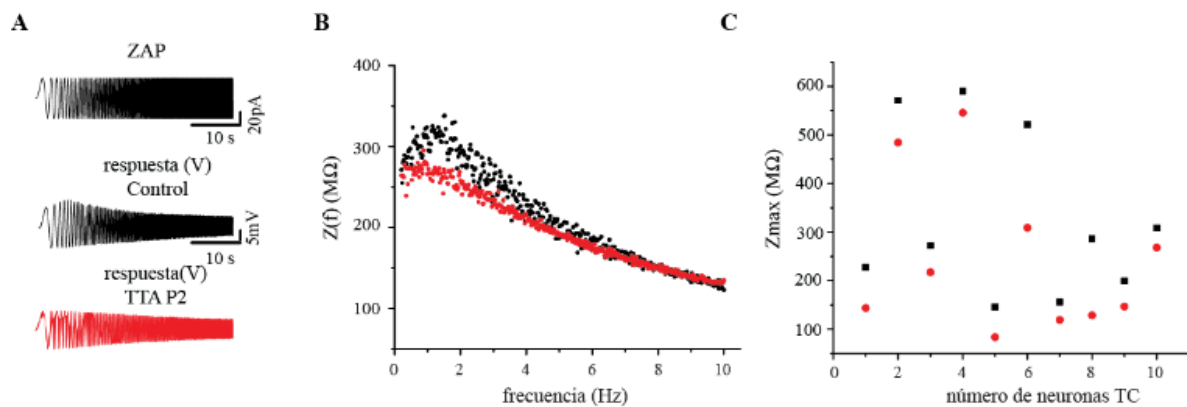
El indicador que usamos para establecer la eliminación de la corriente T fue un protocolo experimental de pulsos cuadrados (ver en métodos); la pérdida de la ráfaga de rebote al final de los pulsos es un indicador del bloqueo del canal T (Fig. 3.8, respuesta al

protocolo de pulsos cuadrados antes y después de TTAP2). El bloqueo del canal con TTAP2 produce una hiperpolarización del  $V_m$ , que se corrigió con una inyección de corriente constante para mantener a lo largo de todos los experimentos el potencial de membrana en  $-70\text{mV}$ .



**Figura 3.8.** *TTAP2 bloquea  $I_T$  y los LTS.* Empleamos el protocolo de pulsos cuadrados para chequear el correcto bloqueo de  $I_T$ ; para la condición control (trazo izquierdo) puede verse la presencia de ráfagas de rebote al final del protocolo para ciertos pulsos de corriente hiperpolarizante; además de LTS sin la presencia de potenciales de acción al comienzo del pulso (para los valores de inyección de corriente positiva). La presencia de  $3\mu\text{M}$  de TTAP2 en la solución de registro produjo el bloqueo de  $I_T$  y por ende la ausencia de ráfagas de rebote y LTS (trazo derecho); los potenciales de acción presentes en este último trazo se debieron al modo de disparo tónico.

Se registraron 10 neuronas resonantes con el posterior bloqueo de  $I_T$ ; la eliminación de esta corriente tuvo grandes efectos en la resonancia. Sin  $I_T$  la neurona perdió la capacidad de amplificar su respuesta ante el estímulo ZAP, este efecto puede verse en la disminución de la respuesta en voltaje (Fig. 3.9A, comparar trazo negro control con trazo rojo TTAP2), o a través de la disminución en el perfil de impedancia eléctrica (Fig. 3.9B) y en el decaimiento de los valores  $Z_{max}$  de las 10 neuronas registradas, cuando el bloqueador estuvo presente (Fig. 3.9C). El otro efecto que produjo el bloqueo de  $I_T$  es la pérdida del comportamiento resonante, esto se manifiesta en el cambio de los valores  $Q$  ( $Q = 1.15 \pm 0.04$  y  $Q = 1.02 \pm 0.04$ ;  $n = 10$  para condición control y TTAP2 respectivamente;  $p = 0.002$ ; Wilcoxon test).

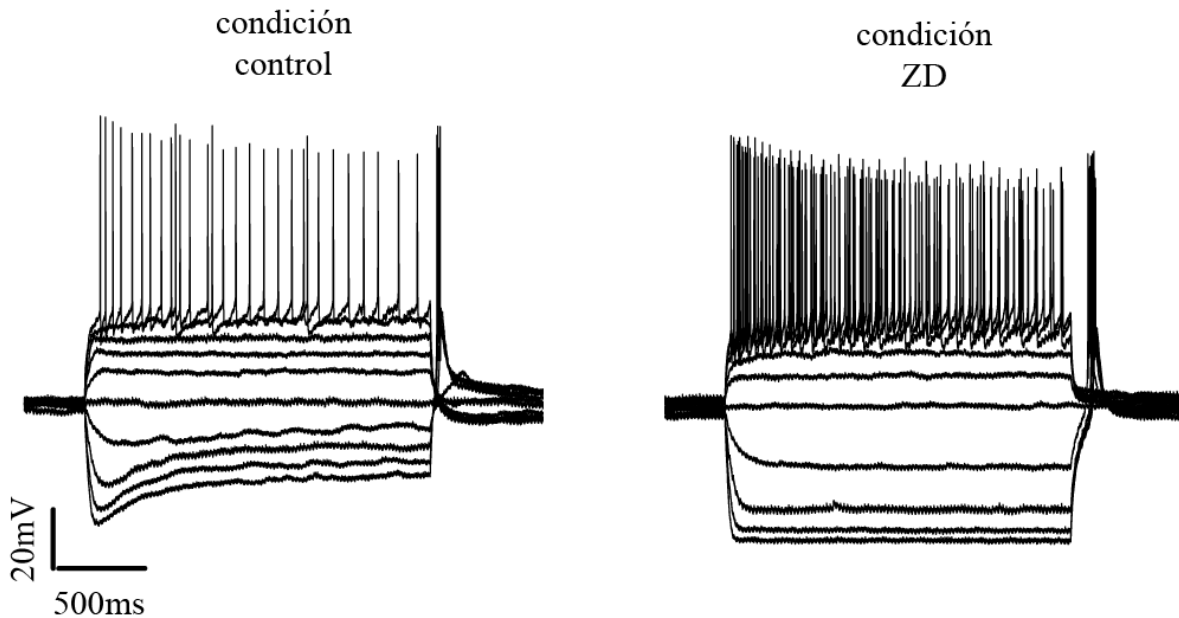


**Figura 3.9. Efecto de  $I_T$  en la resonancia.** (A) protocolo de estimulación ZAP (trazo negro superior) y la correspondiente respuesta en voltaje de una neurona TC representativa, para condición control (trazo negro) y después de 3 μM-TTAP2 (trazo rojo). (B)  $Z(f)$  obtenido de los trazos de la neurona (A), con condición control (puntos negros) y después de TTAP2 (puntos rojos). (C) valores  $Z(f)$  máximos para las  $n=10$  neuronas registradas, bajo condición control (cuadrados negros) y después de 3 μM-TTAP2 (círculos rojos).

### 3.3.3 Contribución de $I_h$ a la resonancia de neuronas TC

Cuatro tipos de subunidad de canales catiónicos activados por hiperpolarización (HCN, por sus siglas en inglés) han sido caracterizados: HCN1, HCN2, HCN3 y HCN4. Si bien, todos los HCN generan una corriente despolarizante cuando el potencial de membrana se hiperpolariza, la biofísica de activación de los canales en cuanto a la dependencia de voltaje y a la cinética de apertura varían; siendo los canales HCN1 los más rápidos y los que se activan a  $V_m$  más despolarizados y los canales HCN4 los más lentos y los que requieren el mayor nivel de hiperpolarización para activarse<sup>24,102</sup>. Se ha determinado que los HCN2 y HCN4 se expresen en el tálamo de ratón, y son los responsables de generar la corriente  $I_h$  en las neuronas TC de esta y otras especies<sup>24</sup>.

Debido a su dependencia en voltaje y su lenta cinética de activación, la corriente  $I_h$  tiene potencial de corriente resonadora; como consecuencia de esto  $I_h$  es responsable de generar el comportamiento resonante en muchas neuronas que la expresan<sup>78,79,97</sup>. Para evaluar el efecto de  $I_h$  en la resonancia de las neuronas TC repetimos la metodología de  $I_T$ ; una vez establecida la presencia de resonancia en las neuronas colocamos un bloqueador específico de esta corriente (ZD 7288<sup>103</sup>) y evaluamos los cambios producidos en la resonancia. Para verificar el correcto bloqueo farmacológico de esta corriente usamos nuevamente un protocolo de pulsos cuadrados;  $I_h$  produce una respuesta en voltaje en las neuronas que se caracteriza por la presencia de una respuesta estereotipada llamada “sag”, como puede verse en la figura 3.10; esta respuesta se debe a la activación de  $I_h$  cuando el protocolo de pulsos cuadrados inyecta corrientes negativas;  $I_h$  contrarresta la hiperpolarización y lleva al  $V_m$  hacia su valor de reposo. El bloqueo de los canales HCN con ZD 7288, elimina la corriente  $I_h$  y su efecto “sag” en el  $V_m$  (ver Fig. 3.10, antes y después de ZD).

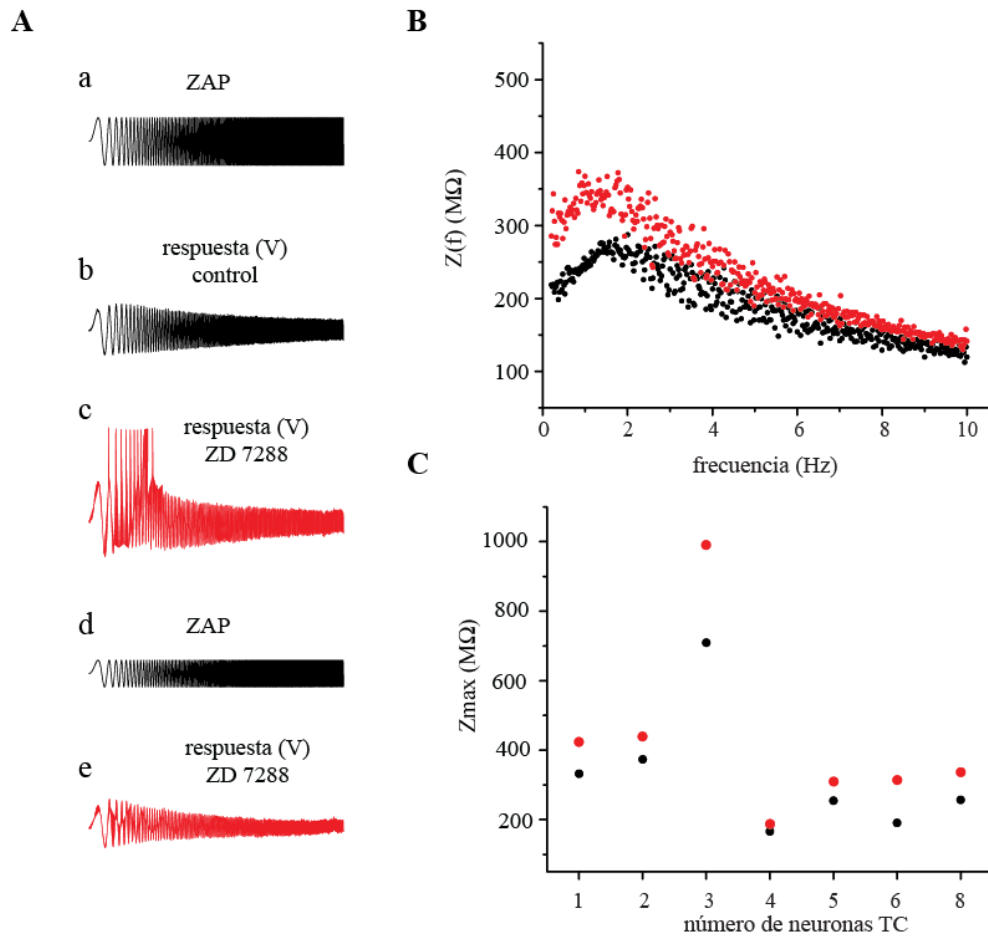


**Figura 3.10. ZD bloquea  $I_h$  y la respuesta “sag”.** Empleamos el protocolo de pulsos cuadrados (similar a Fig. 3.8) para chequear el correcto bloqueo de  $I_h$ ; para condición control (trazo izquierdo) la respuesta del  $V_m$  a inyecciones de corriente negativas no alcanza a preservar un  $V_m$  hiperpolarizado en toda la duración del pulso, debido a la activación de  $I_h$  que se opone a la hiperpolarización; esto produce una respuesta conocida como “sag” que es eliminada debido al bloqueo de  $I_h$  con  $10\mu\text{M}$  ZD 7288 (trazo derecho).

El experimento de eliminación de  $I_h$  se realizó en siete neuronas. El primer efecto observado, debido al bloqueo de  $I_h$ , fue un cambio global en la excitabilidad neuronal, que se tradujo en un aumento de la respuesta en voltaje respecto de la condición control (ver figura 3.11A). Debido a este aumento en la excitabilidad fue necesario disminuir la amplitud de la corriente ZAP para evitar la generación de LTS y mantener la variación de voltaje dentro del régimen sub-umbral (en otras palabras, evitar contaminación de la respuesta con procesos regenerativos no lineales) (Fig. 3.11C). El bloqueo de  $I_h$  produjo un aumento global del perfil de impedancia eléctrica, (Fig. 3.11B) en todas las neuronas registradas sin eliminar el comportamiento de resonancia; en todos los casos el valor  $Q$  se mantuvo por encima de

nuestro criterio de selección ( $Q \geq 1.1$ ) ( $Q = 1.27 \pm 0.16$  y  $Q = 1.23 \pm 0.08$ ;  $n = 7$  para control y ZD7288 respectivamente;  $p = 0.5$ ; t-test). A pesar de que a simple vista la eliminación de  $I_h$ , pareciera provocar un aumento del valor  $Q$  respecto a la condición control (ver figura), los valores de  $Q$  para ambas condiciones no fueron significativamente diferentes. Igualmente, las frecuencias de resonancia parecieran tener un corrimiento hacia las bajas frecuencias; sin embargo, el análisis teórico muestra que no hubo cambios significativos ( $f = 1.04 \pm 0.30$  para control y  $f = 0.95 \pm 0.37$  para ZD7288;  $n = 7$ ;  $p = 0.38$ ; t-test). Los cambios significativos se dieron a nivel del máximo en el perfil de impedancia ( $Z_{\max} = 326.38 \pm 183.86$  para control y  $Z_{\max} = 428.91 \pm 261.41$  para ZD7288;  $n = 7$ ;  $p = 0.018$ ; t-test), ver figura 3.11C.





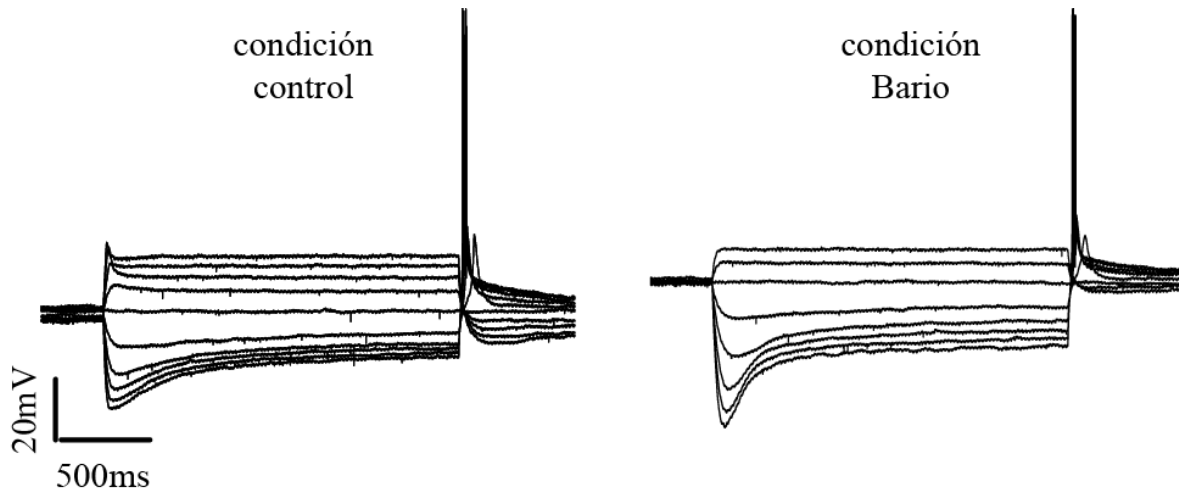
**Figura 3.11. Impacto de  $I_h$  en la resonancia.** (A) protocolo de estimulación ZAP (trazo negro (a)) y la respuesta en voltaje de una neurona TC representativa, para condición control (trazo negro (b)) y después de ZD7288 (trazo rojo (c)); debido a que el bloqueo de  $I_h$  aumenta la excitabilidad de las neuronas se disminuyó la amplitud de la estimulación ZAP (trazo negro (d)) para las  $n=8$  neuronas registradas en presencia del bloqueador ZD7288 para obtener una respuesta en voltaje sub-umbral (trazo rojo (e)). (B)  $Z(f)$  obtenido de los trazos de la neurona (A), con condición control (puntos negros) y después de ZD (puntos rojos). (C) valores  $Z(f)$  máximos para las  $n=8$  neuronas registradas, bajo condición control (círculos negros) y después de  $10\mu\text{M}$ - ZD7288 (círculos rojos).

### 3.3.4 Contribución de $I_{Kir}$ en la resonancia de neuronas TC

Como ya se mencionó antes, las neuronas Talamocorticales de los núcleos VB expresan canales Kir2.2<sup>17</sup>, los cuales forman parte de la subfamilia de los canales kir2.x. Dentro de la familia de los canales rectificadores hacia adentro, los Kir2.x son los que presentan la rectificación más pronunciada. El término rectificador es un concepto eléctrico que hace referencia a la propiedad de este tipo de canales iónicos de dejar circular corrientes de potasio en una dirección, en este caso hacia el interior de las células, y bloquear la circulación en la otra dirección, en este caso hacia afuera de las células. El mecanismo de rectificación en los canales de potasio rectificadores hacia adentro está dado por el bloqueo electrostático del poro por magnesio y otros cationes inorgánicos como las poliaminas a medida que se despolariza la membrana<sup>87,88</sup>. La rectificación hacia adentro se evidencia en la curva corriente/voltaje como una fuerte reducción de la corriente a valores positivos a  $E_K$  (ver figura 3.19A trazo negro). Aunque bajo condiciones experimentales es posible obtener el flujo de corriente de potasio hacia el interior de la célula, dado que es posible inducir grandes hiperpolarizaciones de la membrana, en condiciones fisiológicas no suele haber corrientes de potasio hacia el interior de las neuronas a través de los canales Kir dado que el potencial de membrana es usualmente positivo al potencial de equilibrio del potasio ( $E_K$ ). Por esta razón, la corriente Kir con relevancia fisiológica es la corriente que circula hacia afuera por los pocos canales que permanecen desbloqueados durante la despolarización.

Para evaluar el efecto de la corriente Kir en la resonancia se registraron neuronas con comportamiento resonante y luego se utilizó 10 $\mu$ M de bario aplicado en la solución de registro como bloqueador de  $I_{Kir}$ . El bario bloquea de forma inespecífica varios tipos de canales de potasio a concentraciones altas; sin embargo, es un potente bloqueador de los canales Kir2.2 de manera que al ser usado a bajas concentraciones se comporta como un bloqueador selectivo de estos canales<sup>17</sup>. Para verificar el correcto bloqueo de esta corriente, se usó el protocolo de pulsos cuadrados. En presencia de  $I_{Kir}$ , los pulsos de corriente de magnitud uniformemente creciente provocan cambios en el  $V_m$  que no varían de forma lineal debido a la característica rectificadora de  $I_{Kir}$ . La eliminación de  $I_{Kir}$  tras el bloqueo de los canales Kir2.2 con bario elimina esta no linealidad (ver figura 3.12, trazos de voltaje antes y después de Bario). El efecto del Bario se caracteriza por ser reversible así que después de

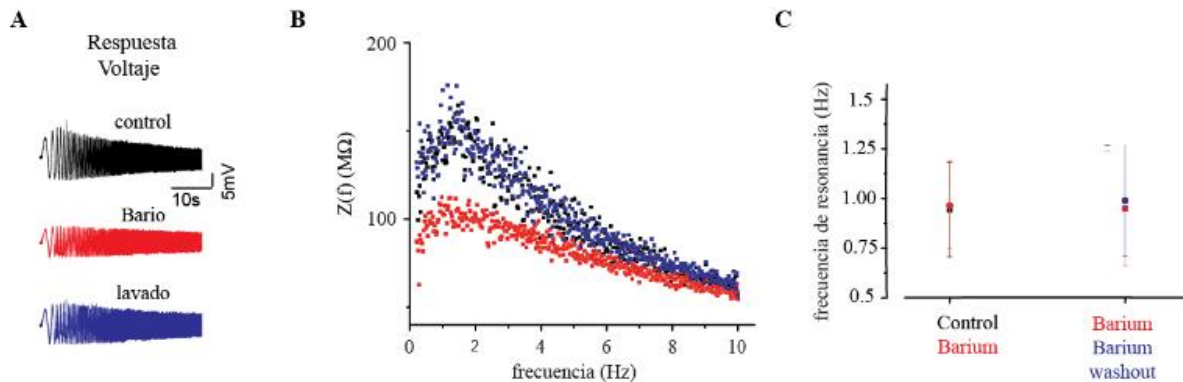
removerlo, mediante el reemplazo de la solución, se recupera la no linealidad en la respuesta de voltaje a la aplicación de pulsos cuadrados de corriente.



**Figura 3.12. Bajas concentraciones de Ba<sup>++</sup> bloquean I<sub>Kir</sub>.** Empleamos el protocolo de pulsos cuadrados (similar a Fig. 3.8 y 3.10) para chequear el correcto bloqueo de I<sub>Kir</sub>; para la condición control (trazo izquierdo) la respuesta del Vm presentó una no linealidad de la respuesta en voltaje a cada pulso de corriente negativo del protocolo; esta característica desaparece de la respuesta del Vm cuando se colocó 10μM de Ba<sup>++</sup> en la solución de registro (trazo derecho).

La respuesta en voltaje debido a la inyección de una corriente ZAP, bajo las tres condiciones antes mencionadas (control, 10μMBa y lavado) se muestran en la figura 3.13A, donde puede verse que la ausencia de Kir provoca una disminución en la respuesta en voltaje, que es recuperada con el lavado del Bario. El bloqueo de los canales Kir2.2 también muestra una disminución en el perfil de impedancia eléctrico, que es recuperado después del lavado de la droga (Fig. 3.13B); esto se reflejó en la disminución significativa del valor Q en todas las neuronas tratadas ( $Q = 1.30 \pm 0.11$  y  $Q = 1.18 \pm 0.08$ ;  $n = 11$  para control y 10 μM Ba<sup>++</sup> respectivamente;  $p = 0.0048$ ; t-test). Asimismo, la eliminación de I<sub>Kir</sub> con Bario no afectó la

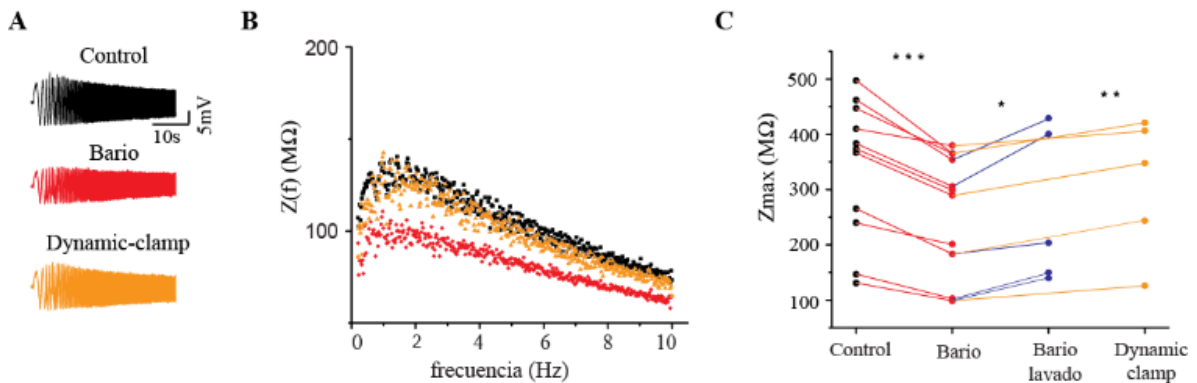
frecuencia de resonancia, bajo ninguna de las condiciones antes mencionadas ( $f = 0.90 \pm 0.26$  y  $f = 0.92 \pm 0.24$ ;  $n = 11$  para control y bario respectivamente;  $p = 0.7$ ; t-test) y ( $f = 0.95 \pm 0.29$  y  $f = 0.99 \pm 0.28$ ;  $n = 5$  para bario y lavado respectivamente;  $p = 0.17$ ; t-test) ver figura 3.13C.



**Figura 3.13  $I_{Kir}$  amplifica la resonancia.** (A) respuesta en voltaje a la estimulación ZAP de una neurona TC representativa para condición control (trazo negro),  $10\mu\text{M Ba}^{++}$  (trazo rojo) y lavado (trazo azul). (B)  $Z(f)$  obtenido de los trazos de la neurona (A), con condición control (puntos negros), después de  $\text{Ba}^{++}$  (puntos rojos) y lavado (puntos azules). (C) gráfica de la frecuencia de resonancia donde los símbolos izquierdos representan el promedio de la frecuencia de resonancia para  $n=11$  de controles (negro) y con la presencia de  $\text{Ba}^{++}$  (rojo); y los símbolos derechos representan el promedio de la frecuencia de resonancia para  $n=5$  para condición con  $\text{Ba}^{++}$  (rojo) y lavado (azul).

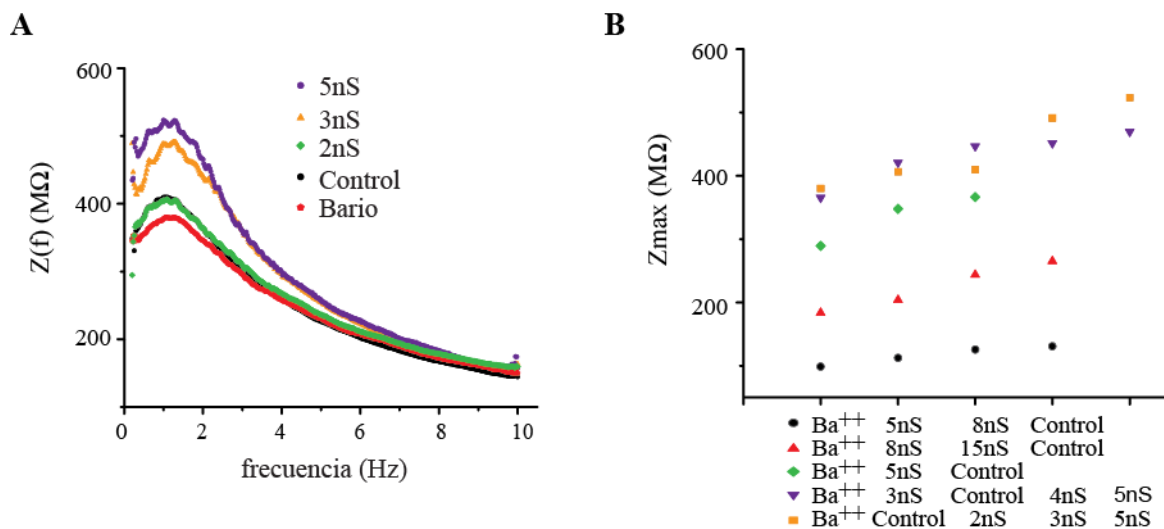
Para corroborar que la corriente Kir es la responsable de este comportamiento, usamos *dynamic-clamp* para insertar en la neurona una corriente Kir simulada (ver descripción de la técnica en métodos del capítulo 2). Repetimos el protocolo experimental, inyectando una corriente ZAP bajo las condiciones control, después de bloquear  $I_{Kir}$  con  $10\mu\text{M}$  de Bario y, después de agregar  $I_{Kir}$  simulado con *dynamic-clamp* ( $d\bar{g}_{Kir}$ ) en presencia de bario (figura 3.14). Como era de esperarse, la respuesta en voltaje disminuye después del bloqueo farmacológico con  $\text{Ba}^{++}$ , al igual que en la figura 3.13A, y después de la inyección de la magnitud apropiada de  $d\bar{g}_{Kir}$  vuelve a recuperarse (Fig. 3.14A trazo naranja). El mismo

efecto puede verse sobre el perfil  $Z(f)$ ; aunque la forma acampanada de  $Z(f)$  característica del comportamiento resonante no desaparece en ninguna de las condiciones, se observa una disminución tras el bloqueo de  $I_{Kir}$ , y la recuperación después de la inyección de  $d\bar{g}_{Kir}$  (Fig. 3.14B); similar a la condición lavado de  $Ba^{++}$ . En la figura 3.14C se muestra un resumen de los resultados obtenidos sobre el impacto de  $I_{Kir}$  en la amplificación de la resonancia; donde se expresan los promedios de los parámetros  $Z_{max}$  para las condiciones control, bario, lavado y *dynamic-clamp*.  $Z_{max}$  disminuye significativamente en todas las células tratadas con Bario ( $Z_{max} = 353.82 \pm 120.59$  y  $Z_{max} = 266.25 \pm 104.19$ ; para control y  $10 \mu M Ba^{++}$  respectivamente;  $n = 11$ ;  $p < 0.0001$ ; t-test); cuyo valor es recuperado cuando la droga fue lavada ( $Z_{max} = 207.68 \pm 117.21$  y  $Z_{max} = 268.47 \pm 139.72$ ;  $n = 5$ ; para  $10 \mu M Ba^{++}$  y lavado de  $Ba^{++}$  respectivamente;  $p = 0.01$ ; t-tets). Además, el valor máximo de  $Z(f)$  fue recuperado en cada neurona tratada con Bario mediante la inyección de  $I_{Kir}$  ( $d\bar{g}_{Kir}$ ) con *dynamic clamp* ( $Z_{max} = 261.68 \pm 120.52$  y  $Z_{max} = 309.61 \pm 125.99$ ;  $n= 5$  para  $10 \mu M Ba^{++}$  y *dynamic clamp* respectivamente;  $p= 0.0027$ ; t-test).



**Figura 3.14.  $d\bar{g}_{Kir}$  recupera la amplificación de la resonancia mediada por  $I_{Kir}$ .** (A) respuesta en voltaje de una neurona representativa para condición control (trazo negro), después de la introducción de  $10\mu M Ba^{++}$  (trazo rojo) y después de la introducción de  $d\bar{g}_{Kir}=8nS$  con la técnica de *dynamic clamp* (trazo naranja). (B)  $Z(f)$  de la neurona en (A) bajo las mismas condiciones (similar convención de colores que en (A)). (C) valores  $Z(f)$  máximos para control (negro), después de Bario (rojo), Bario lavado (azul) y re-introducción de  $d\bar{g}_{Kir}$  con *dynamic clamp* bajo la condición de  $I_{Kir}$  bloqueado (naranja). Cada símbolo representa una neurona particular bajo las condiciones antes mencionadas y las líneas relacionan a una misma neurona que a traviesa las diferentes condiciones. (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$ ).

En otro grupo de experimentos utilizamos la técnica de *dynamic clamp* para inyectar diferentes valores de conductancia Kir (estrategia experimental también implementada en el capítulo 2) y ver su efecto sobre la resonancia. Inyectamos valores crecientes de  $d\bar{g}_{Kir}$  en neuronas bajo condiciones de bloqueo de  $I_{Kir}$  (presencia de  $10 \mu\text{M}$  de Bario); y encontramos que, en todas las neuronas, el aumento de  $d\bar{g}_{Kir}$  provocó un incremento en las magnitudes de los perfiles  $Z(f)$ . En la figura 3.15A se muestran los trazos de impedancia para una neurona representativa y en la figura 3.15B están graficados los  $Z_{\text{max}}$  en función de los valores de  $d\bar{g}_{Kir}$  para las 5 neuronas tratadas en el experimento.



**Figura 3.15. El incremento de  $I_{Kir}$  mediante  $d\bar{g}_{Kir}$  aumenta la amplificación de la resonancia en neuronas TC.** (A)  $Z(f)$  de una neurona TC bajo las condiciones de control (negro), después de  $10\mu\text{M}$  Ba<sup>++</sup> (rojo) y bajo los diferentes valores crecientes de  $d\bar{g}_{Kir}$  indicados en la gráfica, los cuales fueron re-introducidos con *dynamic clamp* bajo la condición de  $I_{Kir}$  bloqueado. (B) gráfica de  $Z(f)$  máximos para  $n=5$  neuronas (cada una representada por un color) bajo similares condiciones que la neurona en (A).

### 3.3.5 Estudio teórico de la resonancia en neuronas TC

Experimentalmente hallamos que las corrientes T, h y Kir, son importantes para la generación y expresión del comportamiento resonante de las neuronas talamocorticales de los núcleos VB. Para estudiar más a fondo cómo los parámetros biofísicos que describen a estos canales impactan en la resonancia, desarrollamos diferentes modelos monocompartmentales de la neurona TC y simulamos el estudio de resonancia inyectando la corriente ZAP al modelo para obtener la respuesta en voltaje, y luego la impedancia eléctrica; al igual que hicimos de manera experimental con los registros electrofisiológicos en las rodajas de cerebro de ratón.

Como se mencionó antes, los parámetros de las ecuaciones que describen el comportamiento de los canales iónicos utilizados en estos modelos computacionales, fueron obtenidos mediante el ajuste a datos experimentales obtenidos de registros en neuronas talamocorticales en estudios previos de nuestro grupo <sup>17</sup>.

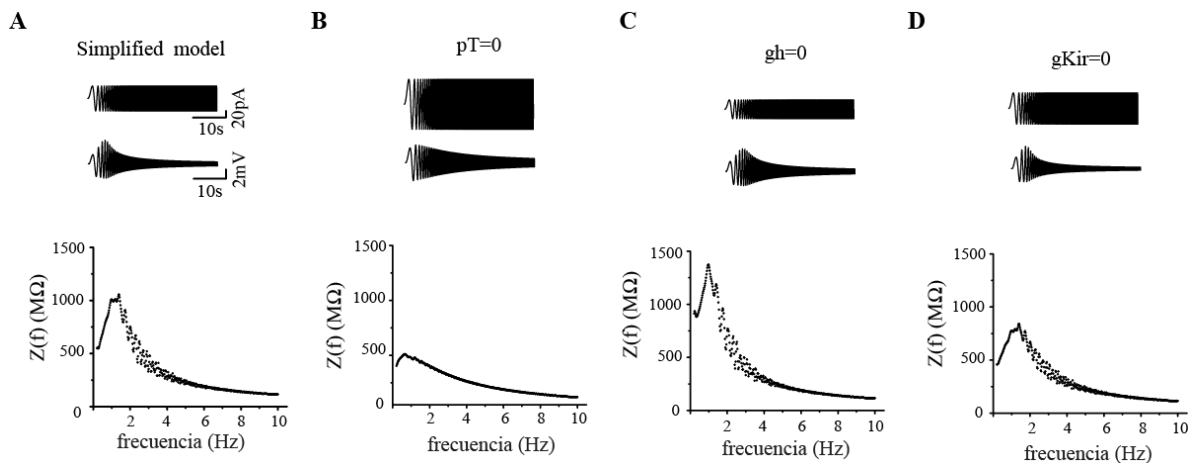
#### *Modelo Simplificado*

Primero generamos un modelo con las corrientes estudiadas experimentalmente para probar si la presencia de estas únicas corrientes podía generar resonancia, y lo llamamos el modelo simplificado  $I_T + I_h + I_{Kir} + I_{leaks}$ . El perfil  $Z(f)$  de este modelo (figura 3.16A) reproduce la respuesta de las neuronas resonantes (comparar con Fig. 3.4), siendo su frecuencia de resonancia muy cercana a lo hallado en los experimentos ( $f = 1.04 \pm 0.33$  y  $f = 1.21$ Hz, para 61 células y el modelo respectivamente). El potencial de membrana fue mantenido en todas las simulaciones en  $-70$ mV mediante la inyección simulada de una corriente constante (positiva o negativa) durante todo el protocolo (40segundos); para mantener el mismo  $V_m$  que en los registros electrofisiológicos.

Para simular el efecto de la eliminación de las corrientes iónicas con bloqueadores específicos, realizamos el estudio de resonancia con el modelo simplificado igualando a cero los valores de conductancia máxima (permeabilidad máxima en el caso de  $I_T$ ) de cada una de las corrientes de interés). En la figura 3.16B puede verse el perfil  $Z(f)$  para  $p_{Tmax}=0$ ; al igual que para el caso experimental,  $Z(f)$  disminuyó respecto a la condición control (comparar con Fig. 3.9). Además, en el panel superior (Fig. 3.16B) puede verse que la función ZAP necesitó

de una gran amplitud para preservar el rango de la respuesta en voltaje (10mVpp, ver métodos) debido a la pérdida de amplificación mediada por  $I_T$ .

La eliminación de la corriente  $h$ , imponiendo la condición  $\bar{g}_h=0$ , produjo un aumento en la respuesta de voltaje por encima del umbral de generación de LTSs. El análisis de impedancia se hizo luego de corregir la amplitud del protocolo ZAP para mantener la salida en el rango sub-umbral al igual que se hizo durante los experimentos *ex-vivo* (ver panel superior Fig. 3.16C). El perfil  $Z(f)$  para  $\bar{g}_h=0$  mantuvo la forma característica de un sistema resonante, pero aumentó respecto del control al igual que lo ocurrido experimentalmente (comparar figuras 3.16C con 3.11A y 3.11B). Por último, bajo la condición  $\bar{g}_{Kir}=0$  el perfil  $Z(f)$  disminuyó respecto del control (comparar figuras 3.16D con 3.13A y 3.13B) sin perder la forma característica de un sistema resonante, nuevamente el modelo mostró una respuesta similar a la hallada experimentalmente; esto también puede verse en la forma de huso que mantuvo la respuesta en voltaje (ver panel superior en la figura).



**Figura 3.16. Comportamiento resonante en el modelo simplificado.** Simulaciones de la amplitud ZAP, respuesta en voltaje y  $Z(f)$  en el modelo simplificado para condición control (A);  $P_{Tmax}=0$  (B);  $\bar{g}_h=0$  (C) y  $\bar{g}_{Kir}=0$  (D).

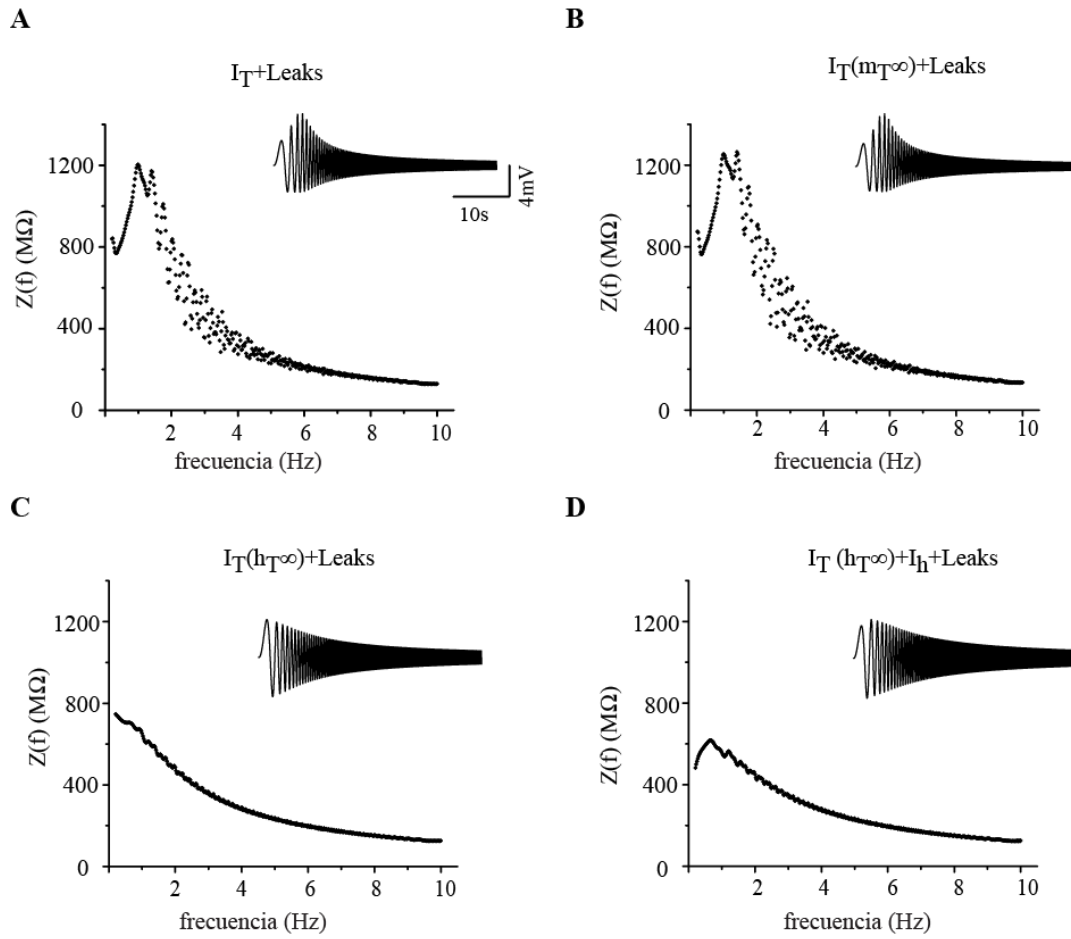
### **Modelo mínimo $I_T$**

Los datos experimentales indican que  $I_T$  es la corriente determinante en la producción de resonancia en neuronas TC. Con el objeto de profundizar en la investigación de los



mecanismos involucrados en este proceso, se construyó un modelo mínimo que contenía exclusivamente la corriente T y las corrientes de fuga de sodio y potasio ( $I_T + I_{leaks}$ ). Ante la estimulación de corriente ZAP de este modelo, se obtuvo una respuesta en voltaje *crescendo-decrescendo* similar a la respuesta obtenida durante los experimentos (ver *inset* Fig. 3.17A). El perfil de impedancia  $Z(f)$  del modelo (Fig. 3.17A) fue también similar a los resultados experimentales, con la presencia de un pico de resonancia en el mismo rango de frecuencias, indicando aún más fehacientemente que la corriente T es el principal determinante de la resonancia a bajas frecuencias en neuronas TC. Para investigar cual o cuales características cinéticas de  $I_T$  son importantes para la generación de resonancia, realizamos simulaciones en las que se modificó la dependencia temporal de las variables de activación e inactivación. En primer lugar, eliminamos la dependencia temporal de la variable de activación  $m_T$  reemplazando la ecuación diferencial que describe esta dependencia ( $m_T = dm_T/dt$ ; ver ecuación en apéndice A) por la ecuación que describe el comportamiento en estado estacionario ( $m_T = m_{T\infty}$ ; ver ecuación en apéndice A). Esta manipulación no produjo cambios, respecto del control, en la respuesta de voltaje. El perfil  $Z(f)$  también fue indistinguible entre las dos condiciones, presentando un pico de resonancia de magnitud y frecuencias similares (comparar Fig. 3.17A con 3.17B). En segundo lugar, modificamos la variable de inactivación  $h_T$ , cambiando la ecuación ( $h_T = dh_T/dt$ ) por la ecuación ( $h_T = h_{T\infty}$ ) que describe el estado estacionario. La figura 3.17C (*inset*) muestra la respuesta en voltaje de una simulación en estas condiciones; claramente diferente a la respuesta en condiciones control. Las oscilaciones del potencial de membrana iniciaron con gran amplitud y decayeron monótonicamente a medida que el protocolo ZAP progresó en el tiempo. El perfil  $Z(f)$ , por otra parte, (Fig. 3.17C), corresponde al perfil de impedancia de un filtro pasa-bajo (comparar respuesta con Fig. 3.7B). Todo lo anterior indica que la lenta inactivación de  $I_T$  es la variable determinante de la expresión de resonancia a bajas frecuencias en neuronas TC de los núcleos ventrobasales del tálamo de ratón. Estos resultados están en concordancia con el estudio teórico previo de Hutcheon y colaboradores, basado en la resonancia de neuronas TC de los núcleos Medio Dorsales de cobayo<sup>98,99</sup>, en el cual la inactivación de T es también la variable crítica en la producción de resonancia.

En contraste con los estudios clásicos mencionados arriba en los que la corriente  $h$  no fue considerada debido a que no fue posible aislarla farmacológicamente, nuestro estudio experimental indica que esta corriente juega un papel modulador de la resonancia. Por esta razón repetimos las simulaciones con  $h_T$  instantánea en presencia de  $I_h$  (modelo  $I_T(h_T \infty) + I_h + I_{leaks}$ ). Los resultados obtenidos bajo estas condiciones se muestran en la figura 3.17D, en la cual se puede ver que la inclusión de  $I_h$  reprodujo el perfil de impedancia que se obtiene después de eliminar farmacológicamente la corriente  $T$  en neuronas TC o después de igualar a cero la permeabilidad máxima de  $I_T$  ( $p_{Tmax}=0$ ) en el modelo simplificado. Este resultado refuerza aún más el concepto de que la inactivación lenta de  $I_T$  es la variable que produce la resonancia a frecuencias bajas en neuronas TC, al punto que la eliminación de la dependencia temporal de  $h_T$  es equivalente a la eliminación total de  $I_T$ .



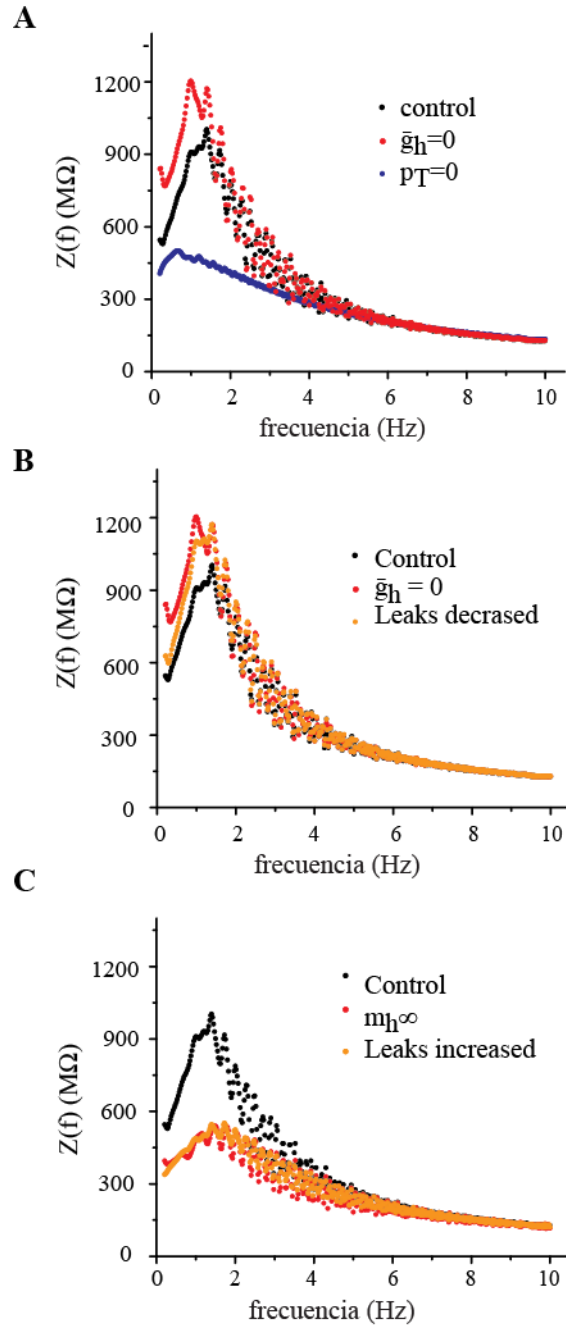
**Figura 3.17.**  $I_T$  genera resonancia en un modelo mínimo.  $Z(f)$  y respuesta en voltaje para el modelo mínimo  $I_T$ -Leaks (A); para el modelo mínimo  $I_T(m_T^\infty)$ -Leaks (B); para el modelo mínimo  $I_T(h_T^\infty)$ -Leaks (C) y para el modelo  $I_T(h_T^\infty)$ - $I_h$ -Leaks (D).

### ***Modelo mínimo $I_h$***

Como se mencionó antes,  $I_h$  tiene potencial de corriente resonadora y produce resonancia en muchas neuronas que la expresan<sup>78,79,97</sup>; sin embargo, en nuestros registros experimentales en neuronas, el comportamiento resonante se preservó cuando eliminamos  $I_h$ , al igual que en el modelo simplificado bajo la condición  $\bar{g}_h=0$  (Fig. 3.16C). El efecto observado tras la eliminación de  $I_h$  fue un aumento global de la magnitud de la impedancia en el perfil  $Z(f)$ . Para estudiar con más detalle cual podría ser el aporte de  $I_h$  a la resonancia creamos el modelo mínimo  $I_h+I_T+I_{leaks}$ . Este modelo también incluyó a la corriente T debido a que la sola inclusión de  $I_h$  junto con las corrientes Leak no es suficiente para generar un modelo resonante. La figura 3.18A muestra el perfil  $Z(f)$  obtenido con este modelo para la condición control (negro), en ausencia de  $I_T$  ( $pT_{max}=0$ ) (violeta) y en ausencia de  $I_h$  ( $\bar{g}_h=0$ ) (roja). El modelo reprodujo los resultados obtenidos experimentalmente después del bloqueo farmacológico de  $I_T$  o  $I_h$ , y las respuestas de las simulaciones con el modelo simplificado (ver Fig. 3.16); la eliminación de  $I_h$  produce un aumento global de la magnitud de la impedancia.

Se sabe que el bloqueo de  $I_h$  con ZD produce cambios en la resistencia de membrana en diversos tipos neuronales<sup>77,78</sup>. En las neuronas TC en particular,  $I_h$  contribuye de manera importante a la conductancia de membrana en reposo, siendo el principal componente involucrado en la desviación del potencial de reposo lejos del potencial de equilibrio para el potasio<sup>17,104</sup>. En estas neuronas, la eliminación de la corriente h provoca un gran aumento en la resistencia de membrana en reposo<sup>17</sup>. Nosotros razonamos que, si el aumento producido por la eliminación de  $I_h$  es debido al aumento en la resistencia de membrana, este efecto debería ser reproducido modificando la resistencia por otro mecanismo diferente al bloqueo de  $I_h$ ; por ejemplo, modificando las conductancias de fuga. En la figura 3.18B puede verse que disminuir los Leaks en el modelo, produce el mismo efecto que hacer  $\bar{g}_h=0$ ; para ambos casos el perfil  $Z(f)$  aumentó, sin verse modificada la forma de la curva; para que esta simulación fuera lo más comparable posible, para ambas condiciones, se mantuvieron constantes la amplitud de la corriente ZAP y la inyección de corriente que contribuye a mantener el  $V_m$  en  $-70mV$ , y se buscó el mínimo cambio en los Leaks capaz de reproducir el efecto de  $I_h$  sobre la resistencia de membrana. Por otro lado, para simular el efecto de un aumento en la conductancia (disminución de la resistencia) inducido por  $I_h$ , modificamos su

dependencia temporal cambiando la función que describe la activación  $m_h$  (ver  $I_h$  en apéndice AI) por la ecuación que describe el estado estacionario ( $m_h = m_{h\infty}$ , ver apéndice AI). Aunque el canal h nativo mantiene cierto nivel de activación estacionaria, este nivel de activación puede cambiar durante fluctuaciones del potencial de membrana que sean más lentas que la constante de tiempo de activación. Hacer la activación instantánea con la manipulación mencionada induce un aumento neto en la conductancia, a los potenciales estudiados, sin la imposición temporal. En la figura 3.18C puede verse el perfil  $Z(f)$  obtenido bajo esta situación, nuevamente el comportamiento resonante se preservó, pero hubo una disminución en la curva de impedancia. Este efecto de  $I_h$  pudo ser reproducido aumentando los valores de las corrientes Leaks en el modelo (trazo naranja, Fig. 3.18C).

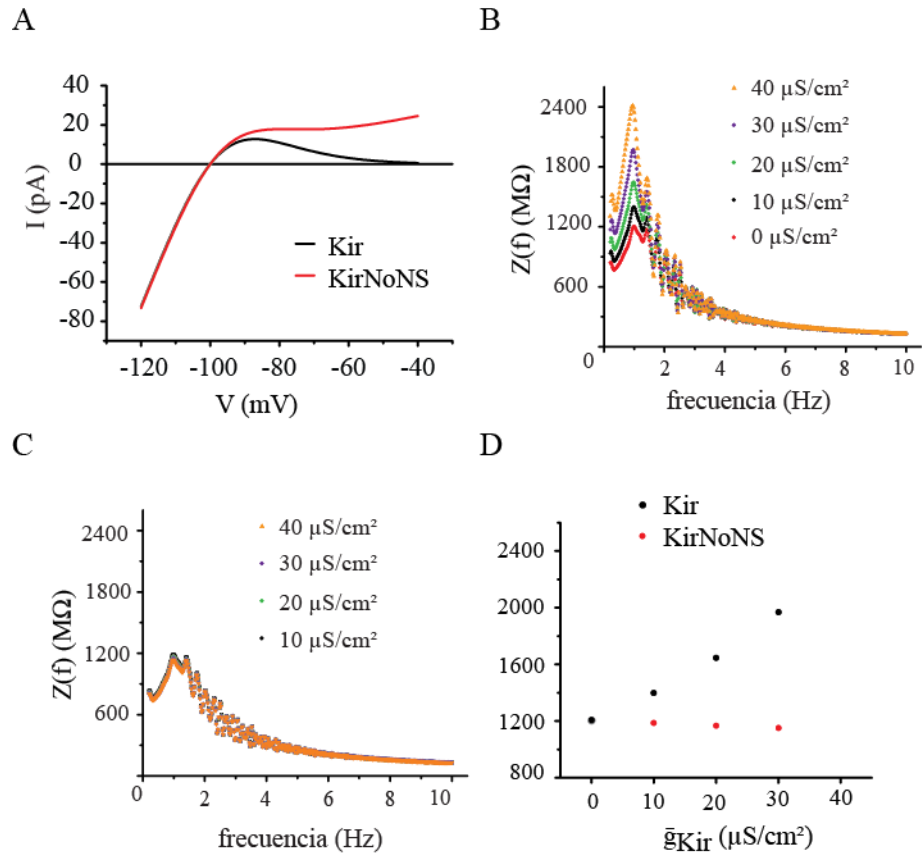


**Figura 3.18. Impacto de  $I_h$  en la resonancia de un modelo mínimo.** (A) comparación de la  $Z(f)$  del modelo  $I_T$ - $I_h$ -Leaks para condiciones de simulación control (negro),  $\bar{g}_h=0$  (rojo) y  $P_T$ max=0 (azul). (B) comparación de la  $Z(f)$  del modelo  $I_T$ - $I_h$ -Leaks para las condiciones de simulación control (negro),  $\bar{g}_h=0$  (rojo) y Leaks disminuidos (naranja,  $\bar{g}_{KLeak}=9.48 \mu S/cm^2$  y  $\bar{g}_{NaLeak}=2 \mu S/cm^2$ ). (C) comparación de la  $Z(f)$  del modelo  $I_T$ - $I_h$ -Leaks para las condiciones de simulación control (negro), para el cambio de la variable de activación ( $m_h$ ) de  $I_h$  por su expresión en el estado estacionario ( $m_h^\infty$ ) (rojo) y Leaks aumentados (naranja;  $\bar{g}_{KLeak}=15 \mu S/cm^2$  y  $\bar{g}_{NaLeak}=5.14 \mu S/cm^2$ ).

### ***Modelo mínimo $I_{Kir}$***

La relación corriente/voltaje de los canales Kir2.2 en las neuronas TC muestra la dependencia de la corriente Kir con el voltaje de membrana, la cual presenta una región de pendiente negativa (figura 3.19A trazo negro) que le permite a esta corriente amplificar las hiperpolarizaciones.

Para estudiar si la región de pendiente negativa donde se produce el fenómeno de amplificación de la hiperpolarización es relevante para que el canal produzca también la amplificación de la resonancia; generamos un modelo con una corriente Kir sin pendiente negativa (KirNoNS, Amarillo et al. 2018) (ver figura 3.19A trazo rojo; y métodos capítulo 2). Primero reprodujimos el estudio para un modelo que genere resonancia con un Kir control ( $I_T$ - $I_{Kir}$ - $I_{leaks}$ ), en la figura 3.19B puede verse que no sólo este modelo reprodujo el comportamiento resonante, sino que también reprodujo el efecto de amplificación de la resonancia ante cambios crecientes de  $\bar{g}_{Kir}$  (comparar con Fig. 3.15). En segundo lugar, las simulaciones hechas con el modelo con Kir alterado ( $I_T$ - $I_{KirNoNS}$ - $I_{leaks}$ ) muestran que este modelo produce resonancia, pero no genera amplificación mediada por  $I_{KirNoNS}$ ; ya que las simulaciones con los cambios crecientes en  $\bar{g}_{Kir}$  produjeron perfiles idénticos de impedancia eléctrica (Fig. 3.19C y 3.19D).

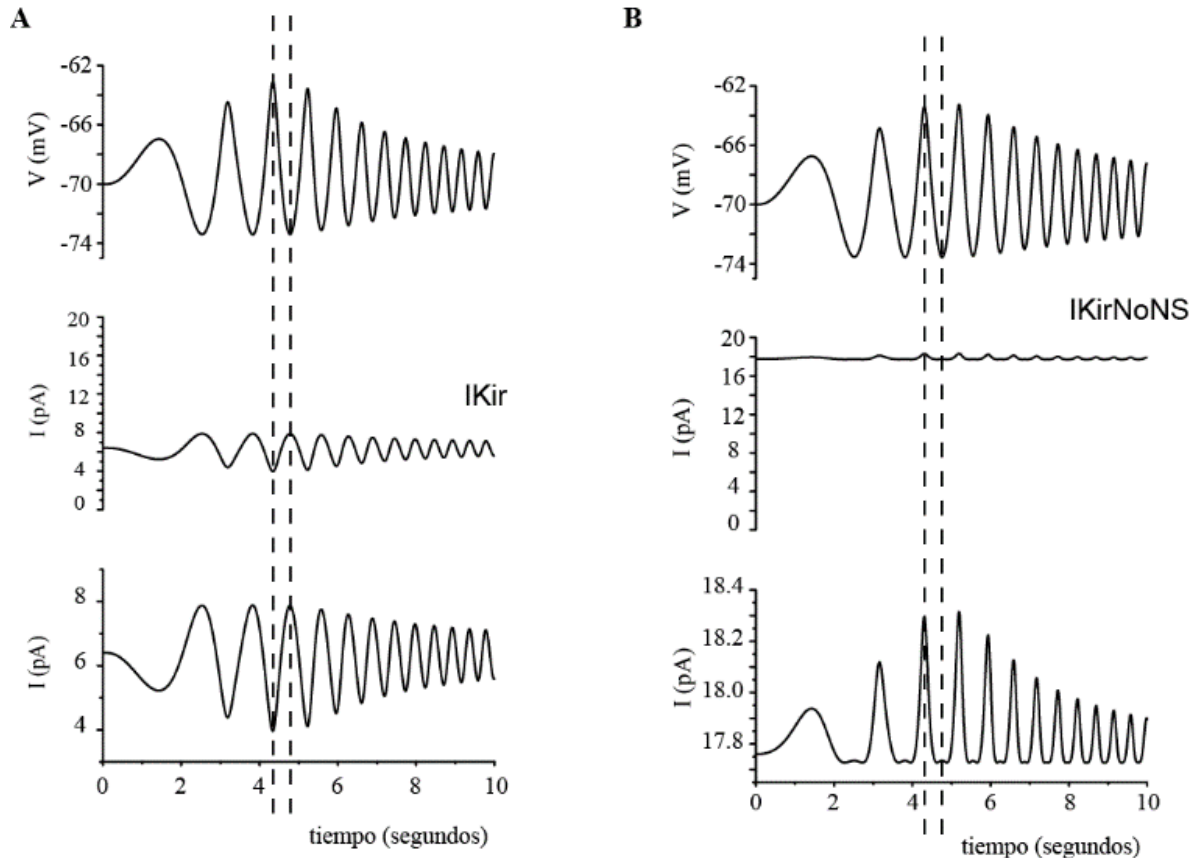


**Figura 3.19.  $I_{Kir}$  amplifica la resonancia debido a su región de pendiente negativa.** (A) Simulación de la relación  $i/v$  para  $I_{Kir}$  con pendiente negativa (curva negra) y  $I_{Kir}$  sin pendiente negativa ( $I_{KirNoNS}$ , curva roja). (B) comparación de las distintas  $Z(f)$  para el modelo  $I_T$ - $I_{Kir}$ -Leaks con diferentes valores crecientes de  $\bar{g}_{Kir}$ . (C) similar a (B) pero empleando el modelo  $I_T$ - $I_{KirNoNS}$ -Leaks. (D) comparación de los valores de  $Z(f)$  máximo ( $Z_{max}$ ) para las simulaciones del modelo  $I_T$ - $I_{Kir}$ -Leaks en (B) (puntos negros) y para las simulaciones del modelo  $I_T$ - $I_{KirNoNS}$ -Leaks en (C) (puntos rojos).



Para analizar cómo los cambios en la pendiente negativa modifican la característica amplificadora de la resonancia mediada por  $I_{Kir}$  simulamos la inyección de una corriente ZAP y comparamos los trazos temporales del voltaje y la corriente Kir obtenidos con los dos modelos:  $I_T + I_{Kir} + I_{leaks}$  e  $I_T + I_{KirNoNS} + I_{leaks}$ . En la figura 3.20A puede verse la respuesta obtenida con el modelo de Kir sin modificaciones. La corriente Kir (trazo del medio e inferior) oscila en contra fase respecto al voltaje de membrana (trazo superior); disminuye durante las deflexiones positivas (despolarizantes) y aumenta durante las deflexiones negativas (hiperpolarizantes) (ver líneas verticales en la figura). El aporte de  $I_{Kir}$  puede entenderse mirando su curva I/V: dado que la respuesta en voltaje oscila alrededor de -70mV y este valor está ubicado justo en el medio de la región de pendiente negativa (ver trazo negro, Fig. 3.19A), durante las oscilaciones, cuando el  $V_m$  se mueve hacia valores positivos, la corriente Kir se reduce prácticamente a cero y no se opone a la despolarización. Por otra parte, cuando el  $V_m$  se mueve hacia valores negativos,  $I_{Kir}$  entra en la región de amplificación de la hiperpolarización contribuyendo aún más a la hiperpolarización del potencial de membrana.

En contraste, en el modelo con KirNoNs (Fig. 3.20B), la corriente Kir presenta un valor medio alto (alrededor de 17pA), y sus fluctuaciones temporales acompañan en fase a la respuesta de voltaje. Observando la curva I/V (ver trazo rojo Fig. 3.19A) puede notarse que los cambios en el  $V_m$  durante las oscilaciones hiperpolarizantes mantienen una componente de corriente constante. Sin embargo, durante las oscilaciones despolarizantes,  $I_{KirNoNS}$  presenta una fuerte componente de corriente que se opone a la despolarización.



**Figura 3.20. Mecanismo de amplificación de la resonancia mediado por  $I_{Kir}$ .** Simulaciones del curso temporal del voltaje (trazos superiores) y corriente Kir (trazos del medio) durante la estimulación ZAP para el modelo  $I_T$ - $I_{Kir}$ -Leaks (A) y el modelo  $I_T$ - $I_{KirNoNS}$ -Leaks (B). Los trazos inferiores representan la ampliación del curso temporal de  $I_{Kir}$  (ampliación trazos del medio) para ambos modelos. Todos los trazos de voltaje y corriente están alineados, y las líneas discontinuas verticales indican los valles y crestas de las oscilaciones.

### 3.4 Discusión

Encontramos que la mayoría de las neuronas Talamocorticales pertenecientes a los núcleos VB presentan resonancia a una frecuencia entre 0.5 – 2Hz, que se corresponde con el rango de frecuencia de las oscilaciones en la banda delta del potencial de membrana de estas neuronas; y de forma más global, con la frecuencia de las ondas delta que aparecen durante las fases del sueño profundo en el EEG <sup>54</sup>. A su vez, la resonancia presenta una

dependencia en voltaje (Fig. 3.6) cuyo voltaje óptimo (-70mV) también se corresponde al potencial de membrana propicio, donde se producen las ráfagas repetitivas de las neuronas TC <sup>17</sup>. La concordancia entre el voltaje y las frecuencias en que se manifiestan ambos fenómenos es una evidencia más que apunta en la dirección de que ambos acontecimientos podrían colaborar en la sincronización de ritmos globales.

La resonancia en las neuronas TC se debe a la combinación de la corriente T con las propiedades pasivas de membrana. Sin esta corriente el perfil  $Z(f)$  decae y se corre hacia bajas frecuencias (Fig. 3.9), el valor Q promedio cambia de 1.15 para las condiciones control a 1.02 para las condiciones con el bloqueador TTAP2, mostrando la eliminación de la resonancia. La  $I_T$  no sólo es una corriente con características de resonadora, sino también de amplificadora; en la figura 3.9C puede verse que el bloqueo de  $I_T$  también elimina el efecto amplificador producido por esta corriente. Usando un modelo mínimo de  $I_T$ +leaks pudimos modificar la biofísica del canal y simular como ésta interfiere en la resonancia, hallamos que la dependencia temporal de la inactivación del canal T es la variable crucial para producir resonancia; en la figura 3.17C puede verse que eliminando la dependencia temporal de  $h_T$  se elimina la resonancia. Nuestros datos están en concordancia con los estudios experimentales que muestran que las neuronas de los núcleos MD presentan resonancia a frecuencias entre (2 – 4Hz), la cual es mediada por la corriente T <sup>98,99</sup>. Por último, encontramos una población de neuronas con comportamiento similar al de un filtro pasa-bajo, que preservó la capacidad de generar el modo de disparo en ráfagas. Dado que este modo de disparo involucra la corriente T, esta población de neuronas indicaría que su presencia no es suficiente para producir resonancia; esto refuerza la idea de que la presencia de una corriente resonante es condición necesaria pero no suficiente para producir resonancia. Dado que el modelo predice que la dependencia temporal de la inactivación de T es relevante para el comportamiento resonante, nosotros especulamos que una variación en la dependencia temporal de  $h_T$  podría estar ocurriendo en aquellas neuronas TC con comportamiento de pasa-bajo, los resultados mostrados en la tabla 3.1 revelan que no hay cambios significativos en los parámetros pasivos entre neuronas resonantes y no resonantes, soportando esta idea. Además, evidencias experimentales muestran que una modulación en la dependencia temporal de  $h_T$  es posible, en <sup>105</sup> se encontró que los canales de calcio tipo T (Cav3.1), que se expresan en neuronas TC

de los núcleos VB, pueden ser modulados por ATP; mediante un mecanismo de fosforilación que produce la aceleración de la inactivación del canal.

La corriente catiónica activada por hiperpolarización  $I_h$  ha sido considerada la clásica corriente resonadora <sup>77-79,97,106</sup> debido a su lenta cinética de activación. En las neuronas TC encontramos que  $I_h$  no tiene un efecto en la generación del mecanismo de resonancia, su eliminación con el bloqueador específico ZD preserva la resonancia en estas neuronas (Fig. 3.11); también este resultado pudo ser reproducido en el modelo para la condición de  $\bar{g}_h=0$  (Fig. 3.16E). El bloqueo de  $I_h$  produce grandes cambios en la resistencia de membrana, si bien este efecto es conocido, su impacto en la resonancia no había sido tenido en cuenta. Nosotros hallamos que  $I_h$  modula y estabiliza la resonancia, manteniendo los valores de impedancia de las neuronas TC dentro de un determinado rango de excitabilidad, sin  $I_h$  el perfil  $Z(f)$  aumenta y la neurona se vuelve más excitable, siendo más susceptible a generar respuestas supra-umbrales (ver trazos de voltaje Fig. 3.11A).  $I_h$  tiende a estabilizar el potencial de membrana en reposo, oponiéndose a las fluctuaciones en el potencial de membrana. Los mecanismos por los cuales  $I_h$  puede tener este efecto en las neuronas es conocido. Por un lado, se debe a su dependencia temporal, al tener una lenta cinética de activación,  $I_h$  sólo puede oponerse a los cambios lentos en la membrana; esta propiedad es la que predomina en las neuronas donde  $I_h$  es la principal corriente en producir resonancia. Por otro lado,  $I_h$  está tónicamente activa a ciertos potenciales de membrana <sup>17,104</sup>, como es en nuestro caso, y el mecanismo por el cual se opone a las fluctuaciones del  $V_m$  se debe a que contribuye a disminuir la resistencia de membrana. Nosotros encontramos que el impacto en la resonancia mediado por  $I_h$  se debe a esta última propiedad del canal. Modificando los Leaks para simular el efecto de  $I_h$  en la resistencia de membrana (Fig. 3.18B y C), pudimos reproducir los resultados del bloqueo experimental de  $I_h$  y de su eliminación en el modelo. Por último, consideramos que el efecto de la dependencia temporal de  $I_h$  está levemente presente cuando bloqueamos  $I_T$  en las neuronas, en la figura 3.9B es posible ver un pequeño hombro a bajas frecuencias en el perfil  $Z(f)$ , este resultado pudo ser reproducido con el modelo simplificado y con modelo mínimo  $I_T(h_T\infty)-I_h-I_{leaks}$  (Fig. 3.17D). El pico en el perfil  $Z(f)$ , que si bien no alcanza a nuestro umbral de resonancia ( $Q \geq 1.1$ ), no corresponde a un  $Z(f)$  de un pasa-bajo perfecto ( $Q=1$ ); en base a estos resultados, creemos que el pico en  $Z(f)$

es debido a la dependencia temporal de  $I_h$ ; sin embargo, especulamos que dado que el canal es muy lento no llega a combinarse con las propiedades pasivas de la membrana para producir resonancia, al menos dentro de la resolución en frecuencia que nos permitió nuestro estudio (0.2 Hz).

En <sup>94</sup> se proponen los requisitos básicos que una corriente iónica hiperpolarizante debe cumplir para tener la potencialidad de amplificar la resonancia (ver Fig. 3.1); sin embargo, hasta el momento sólo se conoce que la capacidad de amplificar resonancia es mediada por corrientes despolarizantes, como el caso de  $I_T$  e  $I_{NaP}$  (ref). La habilidad de los canales Kir para amplificar las hiperpolarizaciones del potencial de membrana y promover las oscilaciones, fue estudiada de forma teórica <sup>3</sup>, y de forma experimental en neuronas colinérgicas del Estriado <sup>89,93</sup>; sin embargo, esta propiedad de Kir, no fue relacionada en el contexto de resonancia.

En el capítulo anterior mostramos que Kir2.2 tiene la capacidad de amplificar las oscilaciones del potencial de membrana en neuronas TC, dentro del rango de oscilaciones delta, y que éstas dependen de la conductancia de Kir inyectada ( $d\bar{g}_{Kir}$ ). En el presente trabajo extendemos este estudio temporal al dominio de frecuencias y mostramos, que los canales Kir2.2 amplifican la resonancia en neuronas TC (ver Fig. 3.13, 3.14, 3.15). La eliminación de  $I_{Kir}$  con Bario disminuye el perfil  $Z(f)$  en todas las neuronas tratadas (Fig. 3.13B), sin modificar la resonancia, esto puede verse en los valores  $Q$  antes y después de la droga, que siguieron representando a una neurona resonante ( $Q \geq 1.1$ ). Empleando la técnica de *dynamic clamp* mostramos que el efecto amplificador de la resonancia aumenta con el aumento de  $d\bar{g}_{Kir}$  (Fig. 3.15), lo mismo ocurre de forma teórica (Fig. 3.19B).

Pudimos a través del modelo teórico desentrañar la maquinaria biofísica que permite a esta corriente amplificar la resonancia y, encontramos que la región de pendiente negativa es la responsable de este fenómeno, la eliminación de la pendiente negativa usando el modelo  $I_T$ - $I_{KirNoNS}$ - $I_{leaks}$  muestra la pérdida de amplificación de la resonancia mediada por  $I_{Kir}$  (Fig. 3.19C y D). El mecanismo por el cual Kir amplifica la resonancia puede verse en la figura 3.20, en donde contrastamos el curso temporal de la corriente Kir durante las oscilaciones de

membrana que induce la corriente ZAP, para los modelos teóricos  $I_T$ - $I_{Kir}$ - $I_{leaks}$  e  $I_T$ - $I_{KirNoNS}$ - $I_{leaks}$ . Una corriente  $Kir$  control acompaña y amplifica las oscilaciones del  $V_m$  hiperpolarizantes, mientras que no interfiere en las oscilaciones despolarizantes. Por otro lado, la corriente  $KirNoNS$  tiene una contribución al  $V_m$  aproximadamente constante a potenciales más hiperpolarizados que  $-70mV$  (ver curva  $i/v$  Fig. 3.19A) y al perder la capacidad de rectificación,  $I_{KirNoNS}$  no disminuye cuando el  $V_m$  oscila hacia valores más despolarizados, sino que aumenta y se opone a las despolarizaciones.

## Capítulo 4

### **Análisis del efecto de la distribución subcelular de las conductancias subumbrales sobre el disparo repetitivo de ráfagas en un modelo multicompartimental**

La actividad eléctrica de las neuronas junto a los canales iónicos involucrados en producirla han sido extensamente estudiados a lo largo de los años; la utilización de bloqueadores específicos y el empleo de modelos animales genéticamente modificados han permitido caracterizar los tipos de canales iónicos que producen las corrientes que en última instancia generan la identidad eléctrica de una determinada neurona. Sin embargo, poco se sabe de la distribución espacial de los canales iónicos sobre la compleja morfología de las neuronas y su posible impacto en la respuesta eléctrica. Dado que las sinapsis pueden tener sitios de unión específicos entre neuronas como las espinas dendríticas, o ubicarse en cualquier sitio dentro de su morfología; es relevante estudiar la distribución espacial de los canales iónicos y sus posibles implicancias en los procesos de integración sináptica tanto espaciales como temporales. Dentro de este contexto en este capítulo realizaremos un análisis sistemático del efecto de la distribución espacial de las conductancias iónicas sub-umbrales en la generación de ráfagas repetitivas en presencia o ausencia de input sinápticos bajo condiciones de simulaciones fisiológicas y patológicas, empleando un modelo multicompartimental de neurona Talamocortical.

#### **4.1 Introducción**

Las neuronas se comunican entre sí para transmitir información; las vías de comunicación pueden ser a través de sinapsis químicas o eléctricas, o de forma indirecta por cambios extra-celulares a través de interacciones efápticas o modificaciones de la concentración extra-celular iónica como consecuencia de la misma actividad eléctrica<sup>37</sup>. A diferencia de estas dos últimas, las sinapsis involucran contacto anatómico entre las estructuras neuronales; estas conexiones se pueden dar a nivel del soma, axón o árbol dendrítico. Desde un punto de vista muy simplificado, cerca del soma se integra la información sináptica que, si el estímulo resultante de esta integración es suficiente para desencadenar un potencial de acción, va a viajar por el axón y contactar con otras neuronas.

Sin embargo, dado que la mayoría de los inputs sinápticos se dan a nivel del árbol dendrítico cuyas propiedades intrínsecas no son sólo pasivas, sino también activas; el viaje de las señales eléctricas en estas estructuras hacia el sitio donde se desencadena el potencial de acción (Haz de Hillock) suman mayor complejidad al proceso de transmisión de información. Por lo que es relevante para el proceso conocer no sólo qué tipos de canales iónicos expresa una neurona sino también donde los expresa.

#### **4.1.1 Las dendritas como entidades pasivas y activas**

Las dendritas fueron descubiertas por Camillo Golgi en 1873 quien originalmente las llamó prolongaciones protoplasmáticas, hasta que en 1889 Wilhelm His introdujo el concepto actual de dendritas (revisado en <sup>107</sup>). A estas estructuras arriban la mayoría de las conexiones sinápticas excitatorias e inhibitorias, que en última instancia desencadenan en ellas los potenciales postsinápticos excitatorios e inhibitorios (EPSP e IPSP por sus siglas en inglés). Por mucho tiempo se consideró que las dendritas solo poseían propiedades pasivas que conducían los EPSP/IPSP hacia el soma con una eficiencia que dependía de la geometría de las dendritas, como por ejemplo su longitud y diámetro, y de sus propiedades pasivas tal como la resistencia y capacidad de membrana, y la resistencia intracelular <sup>108</sup>.

Para modelar teóricamente las propiedades pasivas de las dendritas, Rall <sup>108</sup> adaptó la teoría del cable a los sistemas neuronales, utilizando una descripción matemática de cómo una señal eléctrica se desplaza y atenúa mediante mecanismos pasivos en su viaje por las dendritas hasta llegar al soma. Si bien esta teoría se sigue empleando para describir las propiedades pasivas de las neuronas y sus dendritas, y es empleada para describir las propiedades pasivas de nuestro modelo, en la actualidad se sabe que las dendritas no son sólo estructuras pasivas, sino que expresan una gran diversidad de canales iónicos que también interfieren en la integración espacial y temporal de las sinapsis que arriban a ellas <sup>109,110</sup>.

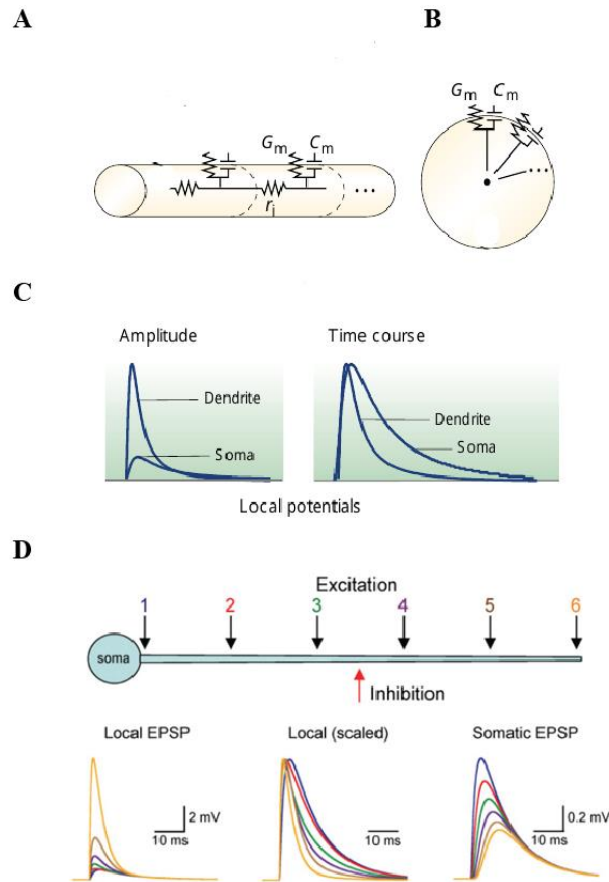
#### **4.1.2 Influencia de las propiedades pasivas en la integración sináptica**

Si pensamos a las dendritas como cables conductores pasivos, su comportamiento puede modelarse como el circuito equivalente de la figura 4.1A; donde  $r_m$  representa el valor de la resistencia de membrana,  $c_m$  la capacitancia y  $r_i$  la resistencia intracelular. Si  $r_m$  es alta



la dendrita va a tener una buena eficiencia como conductora y por el contrario si  $r_m$  es baja, mayor es la corriente que escapa hacia afuera de la dendrita en su viaje al soma y por lo tanto mayor la atenuación de la señal. Además, la membrana celular separa y almacena carga eléctrica comportándose como un capacitor; la  $c_m$  actúa como filtro pasa-bajo aumentando la atenuación de las señales sinápticas rápidas. Por otro lado, el diámetro de las dendritas tiende a disminuir con la distancia al soma, la conducción de la señal hacia el soma es desfavorecida debido a los cambios en la resistencia intracelular  $r_i$ , que va a ir disminuyendo conforme aumente el área dendrítica. Sin embargo, las entradas sinápticas y las señales que estas generen, se ven también afectadas por la resistencia de entrada, la cual es inversamente proporcional al área del compartimiento o segmento donde contactan, por lo tanto, cuanto menor sea el área dendrítica mayor va a ser la resistencia de entrada y mayor la amplitud de los EPSP/IPSP que se generen localmente. En contraste, el soma se puede modelar como una esfera cuyo circuito equivalente corresponde a una resistencia ( $r_m$ ) y capacitancia de membrana ( $c_m$ ) conectados en paralelo; siendo la membrana plasmática la única estructura pasiva por donde puede fluir la corriente dentro del soma (Fig. 4.1B).

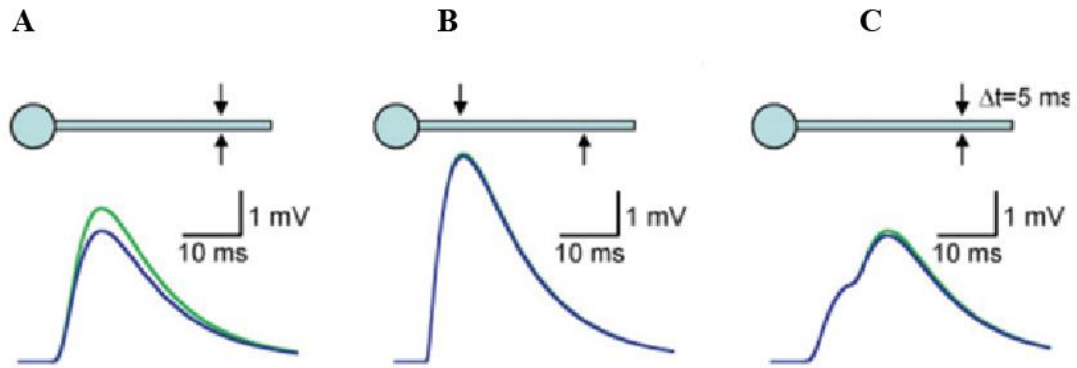
En la figura 4.1C y 4.1D puede verse cómo las diferencias en la geometría y en las propiedades pasivas impactan en los potenciales pos-sinápticos. La geometría de las dendritas influye en la resistencia de entrada y en la  $c_m$ , dado que éstas presentan áreas relativamente pequeñas, los EPSP/IPSP que se generen localmente en las dendritas van a tener mayor amplitud que los que se producen en el soma, pero también van a ser más transitorios (comparar ambas señales en Fig. 4.1C). Esto último también ocurre comparando las señales locales que ocurren dentro de distintos segmentos dendríticos (Fig. 4.1D panel derecho); como consecuencia del aumento en la capacitancia de membrana de las dendritas más cercanas al soma respecto a aquellas más distales, los potenciales postsinápticos distales son más transitorios que los proximales (Fig. 4.1D panel del medio) <sup>111</sup>. Sin embargo, el impacto de los cambios en  $c_m$ ,  $r_m$  y  $r_i$  sobre la señal eléctrica en su viaje al soma, provocan que los EPSP/IPSP tengan menor amplitud que los registrados localmente debido al decaimiento de la señal mientras se propaga (ver Fig. 4.1D).



**Figura 4.1. Dependencia teórica de las propiedades pasivas y morfológicas en la integración sináptica.** (A) La morfología de las dendritas se puede modelar empleando una geometría cilíndrica, y sus propiedades pasivas se modelan con un circuito eléctrico RC en paralelo que simula el comportamiento de la membrana plasmática, además de una resistencia  $r_i$  que se conecta en serie y representa la resistencia del interior celular. (B) La morfología del soma de una neurona se puede modelar como una esfera y sus propiedades pasivas con un circuito equivalente RC en paralelo. (C) Los potenciales postsinápticos presentan diferentes amplitudes y cursos temporales dependiendo del área y de las propiedades pasivas donde se generen. En el panel izquierdo se grafican la amplitud de dos EPSP, uno generado en el soma y otro en la dendrita. En el panel derecho se muestran ambas señales re-escaladas, para comparar sus diferentes cursos temporales. (D) La amplitud y curso temporal de los potenciales postsinápticos también dependen del sitio de iniciación dendrítico. El panel superior muestra entradas sinápticas excitatorias (flechas) con seis ubicaciones diferentes a lo largo de distintos segmentos dendríticos en un modelo neuronal; respetando el código de colores de las flechas, en los paneles inferiores se grafican la amplitud de los seis EPSP locales superpuestos (panel inferior derecho); re-escalados en amplitud (panel inferior del medio) y la amplitud de los seis EPSP superpuestos registrados en el soma (panel inferior izquierdo). Figura modificada de <sup>109,111</sup>.

### 4.1.3 Sumación temporal y espacial

La generación de EPSP o IPSP aislados usualmente no alcanza para desencadenar una respuesta en la neurona postsináptica; para producirse un potencial de acción es requerida la suma de múltiples potenciales postsinápticos. La suma de estas señales va a depender de la ubicación anatómica y de la dependencia temporal de las diferentes entradas sinápticas que la neurona recibe. Las entradas sinápticas excitatorias que estén ubicadas muy cercanas en tiempo y espacio, pueden producir una suma sub-lineal de sus señales individuales (Fig. 4.2A), debido a que la apertura de los receptores sinápticos altera la *driving force* de otros receptores que se activan cerca. Por lo que una separación espacial adecuada (Fig. 4.2B) puede generar una suma casi lineal de las señales individuales si la despolarización que causa la apertura de un receptor sináptico no altera la *driving force* de otros receptores simultáneamente activos; pudiendo ser relevante para este proceso la amplia distribución anatómica de entradas sinápticas que presentan las neuronas en todo su árbol dendrítico <sup>109</sup>. Por otro lado, la suma de los EPSPs también puede ser aproximadamente lineal para entradas sinápticas cercanas en el espacio, pero con diferentes activaciones temporales (Fig. 4.2C), tales que la activación de un receptor no interfiera temporalmente con otros receptores. Por último, la activación y ubicación de entradas sinápticas inhibitorias pueden contrarrestar la respuesta de la suma de EPSP disminuyendo el voltaje de membrana por debajo del umbral de disparo o generando una respuesta de *shunting*, que se produce por la activación de varios receptores sinápticos inhibitorios que causan una caída en la resistencia de membrana, disminuyendo la deflexión en voltaje que podría generarse ante determinadas entradas sinápticas excitatorias. Se cree que el *shunting* puede ser un mecanismo que sirva para desconectar o limitar el arribo de señales al soma de ciertas regiones dendríticas para ocultar a la neurona postsináptica la información de sectores que reciben determinadas conexiones excitatorias <sup>109</sup>.



**Figura 4.2. Sumación espacial y temporal de EPSP en un modelo neuronal.** (A) Dos EPSP simultáneos (flechas negras) generan una respuesta menor (curva azul) cuando se la compara con la respuesta obtenida de la suma teórica de sus señales individuales (curva verde). (B) La activación de eventos sinápticos separados espacialmente (flechas negras) generan una suma de sus EPSPs (curva azul) idéntica a su suma teórica (curva verde). (C) Similar a (B); pero en vez de una separación espacial los eventos sinápticos presentan una adecuada separación temporal (5ms) tal que la suma de sus señales (curva verde) es casi idéntica a su suma teórica (curva azul). Figura modificada de <sup>109</sup>.

#### 4.1.4 Influencia de las propiedades activas en la integración sináptica

Los avances en las técnicas de electrofisiología que brindaron la posibilidad de registrar la actividad eléctrica en dendritas, junto al empleo de herramientas ópticas y marcadores intracelulares específicos que permitieron medir las señales de calcio en dendritas o incluso en espinas dendríticas, ampliaron el conocimiento que se tenía hasta el momento sobre estas estructuras <sup>110</sup>. Hoy en día se sabe que las dendritas tienen una expresión específica de canales iónicos dependientes de voltaje y tiempo que varía dependiendo del tipo de neurona y de la localización sub-celular dentro del árbol dendrítico. La eficiencia de cada dendrita para transmitir los potenciales postsinápticos hacia el soma va a depender de esta dependencia de voltaje, especificidad iónica y cinética de los canales iónicos presentes, de tal forma que las entradas sinápticas pueden ser adelantadas o atrasadas temporalmente, como también aumentadas o disminuidas en amplitud <sup>109,110</sup>.

Por ejemplo, el impacto en la integración sináptica debido a la expresión de canales iónicos en las dendritas de neuronas piramidales de la región CA1 en el hipocampo ha sido

ampliamente estudiado. Estas neuronas expresan en sus dendritas canales HCN con una distribución espacial heterogénea; la corriente que circula por estos canales  $I_h$  se comporta como un inductor fenomenológico generando diferentes retrasos en las señales de voltaje que arriban al soma <sup>106</sup>. El impacto de estos retrasos está relacionado con la expresión no uniforme del canal, permitiendo que los EPSP producidos en diferentes regiones de las dendritas debido a la amplia distribución espacial de receptores AMPA, lleguen de manera sincronizada al soma <sup>112</sup>.

Las dendritas también pueden expresar canales de sodio y calcio dependientes del voltaje y del tiempo. La expresión de canales de  $Na^+$  en dendritas contribuye a amplificar la señal de los EPSPs, en la propagación retrógrada del potencial de acción y también pueden colaborar en la generación de *spikes* dendríticos; los cuales son potenciales de membrana producidos exclusivamente en estas estructuras debido a las propiedades eléctricas del árbol dendrítico <sup>109,110</sup>. Se han encontrado varios subtipos de canales de calcio expresado en dendritas, cuya expresión varía dependiendo del tipo celular y localización sub-celular. Se considera que los canales de calcio de bajo umbral colaboran en la amplificación de las señales excitatorias dado que poseen un umbral de activación cercano al potencial de membrana en reposo; además se piensa que el calcio que circula por estos canales podría colaborar en los procesos de plasticidad sináptica. Los canales de calcio también pueden producir *spikes* dendríticos, los cuales están asociados a canales de calcio de alto umbral, específicamente los canales tipo-L son los responsables de producir *spikes* de calcio en dendritas de células de Purkinje y neuronas del hipocampo <sup>113 114</sup>.

#### **4.1.5 Propagación retrógrada del potencial de acción**

El potencial de acción producido por una neurona puede propagarse hacia atrás, es decir desde la porción inicial del axón hacia el soma y el árbol dendrítico, complicando aún más los procesos de integración sináptica en estas estructuras; este fenómeno ha sido medido experimentalmente en registros *in vitro* e *in vivo*.

La morfología del árbol dendrítico es un factor clave en la propagación retrógrada, pero además la presencia de conductancias activas en las dendritas acompaña al efecto de la

morfología, que dependiendo del tipo neuronal puede potenciar, atenuar o no interferir significativamente, en la propagación retrógrada <sup>115</sup>. Por ejemplo, los canales de sodio TTX-sensibles en las dendritas pueden no interferir significativamente en la propagación retrógrada del potencial de acción en células de purkinje, las cuales poseen una intrincada morfología; pero sí impactar en su amplificación en neuronas piramidales del hipocampo <sup>115,116</sup>.

La presencia de canales de sodio en las dendritas de neuronas piramidales de la región CA1 presenta una distribución espacial aproximadamente homogénea en densidad, pero difieren en su cinética de inactivación respecto a los mismos canales expresados a nivel del soma. Registros a lo largo del árbol dendrítico muestran que la cinética de inactivación de estos canales se hace más lenta a medida que la distribución espacial de los canales aumenta su distancia respecto al soma, provocando una disminución en la amplitud de los potenciales de acción retrógrados <sup>117</sup>. Este efecto es potenciado por la presencia de canales de potasio tipo-A en estas mismas neuronas, los cuales también limitan la propagación retrógrada. A diferencia de los canales de sodio, la densidad de canales tipo-A aumenta fuertemente con la distancia en las dendritas y, dado que se activan a potenciales de membrana cercanos al reposo y tienen una rápida cinética de activación disminuyen fuertemente la amplitud de los potenciales de acción retrógrados <sup>117</sup>.

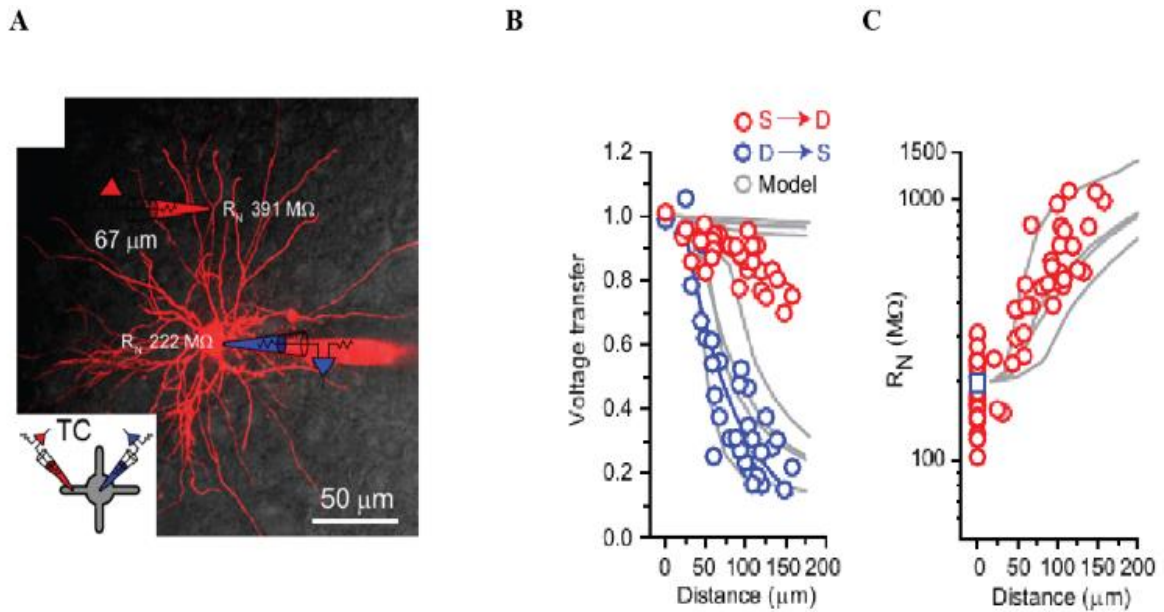
#### **4.1.6 Conducción de señales en dendritas de neuronas TC**

El impacto en la integración sináptica debido a las propiedades pasivas y geométricas de las dendritas TC fue medido experimentalmente <sup>118</sup>. Empleando registros duales en soma y dendritas (ver Fig. 4.3A) se pudo medir las señales pasivas que viajan desde el soma hacia las dendritas o desde las dendritas hacia el soma. Una inyección de corriente en el soma ( $I_s$ ) produjo un voltaje somático  $V_{S_s}$  y un voltaje de transferencia dendrítico ( $V_{soma \rightarrow dendrita}$   $V_{D_s}$ ); cuyo cociente  $V_{D_s}/V_{S_s}$  fue cercano a la unidad, independientemente de la distancia en la dendrita donde se registró el voltaje ( $V_{D_s}$ ) (ver círculos rojos en Fig. 4.3B), mostrando una alta eficiencia en la conducción de la señal desde el soma hacia las dendritas. Por el contrario, una inyección de corriente sobre las dendritas generó un voltaje dendrítico  $V_{D_D}$  y un voltaje de transferencia somático ( $V_{dendrita \rightarrow soma}$   $V_{S_D}$ ) cuyo cociente ( $V_{S_D}/V_{D_D}$ ) fue

menor a uno; el cuál decayó a medida que la distancia dendrítica donde se inyectó la corriente aumentó respecto al soma (ver círculos azules en Fig. 4.3B). Se atribuyó esta disminución en la amplitud de la señal que viaja desde las dendritas al soma únicamente a los cambios morfológicos de las dendritas a medida que se acercan al soma y no a la pérdida de corriente que se escapa por la membrana celular, debido a que estas neuronas son altamente compactas

118

Sin embargo, como consecuencia de la disminución en el área de las dendritas conforme aumenta su distancia respecto al soma, la resistencia de entrada aumenta con la distancia (ver Fig. 4.3C); el impacto de los cambios en la resistencia de entrada contribuye a la alta eficiencia en la conducción de las señales pasivas por parte de las dendritas. Tal como se mencionó antes la amplitud de las señales disminuye en su viaje al soma producto de los cambios en la geometría dendrítica, pero dada la relación de la resistencia de entrada con la distancia (Fig. 4.3C), el impacto del decaimiento puede ser compensado por la alta resistencia de entrada para las dendritas más distantes al soma, de forma que los EPSP/IPSP que se produzcan en dendritas distales van a tener mayor amplitud que los que se producen en las dendritas proximales, democratizando las posibilidades de llegar al soma de aquellos EPSP/IPSP generados por entradas sinápticas que arriban a las dendritas más distales de estas neuronas.



**Figura 4.3. Propiedades eléctricas de las dendritas de las neuronas TC.** (A) Imagen de fluorescencia de una neurona TC perteneciente al núcleo geniculado lateral donde se muestran esquemáticamente dos sitios diferentes de registros simultáneos: somático (electrodo azul) y dendrítico (electrodo rojo); donde  $R_N$  representa la resistencia de entrada del soma ( $222\text{M}\Omega$ ) y la de una dendrita distal ( $391\text{M}\Omega$ ). Abajo a la izquierda se muestra un esquema de la neurona TC, junto con la ubicación de los registros duales. (B) Voltaje de transferencia normalizado medido en el estado estacionario (evocado por pulsos cuadrados de inyección de corriente de  $500\text{ms}$ ) en función de la distancia donde se colocó el electrodo de registro dendrítico; para la dirección soma→dendrita (círculos rojos), y para la dirección dendrita→soma (círculos azules); las líneas solidas (roja y azul) representan los ajustes de los datos experimentales. Las líneas grises continuas muestran el voltaje de transferencia para cuatro modelos dendríticos diferentes. (C) Resistencia de entrada en función de la distancia medida desde el soma al sitio donde se colocó el electrodo de registro. Las líneas grises continuas muestran la resistencia de entrada de los modelos usados en (B). Figura modificada de <sup>124</sup>.



#### 4.1.7 Impacto de la distribución espacial de canales iónicos en neuronas TC

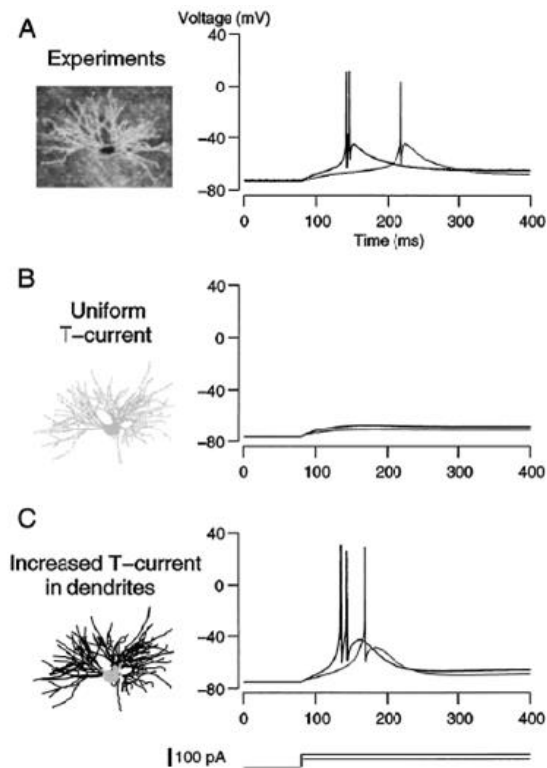
##### *Conductancias intrínsecas*

Registrando la actividad eléctrica en neuronas TC con la técnica *patch-clamp* en modo *whole-cell*, en <sup>119</sup> encuentran que el potencial de acción en estas neuronas se inicia cerca del soma y es propagado al árbol dendrítico, con una atenuación que crece con la distancia desde el punto de registro en las dendritas respecto al sitio de iniciación registrado en simultáneo cerca del soma. Siendo el mayor causante de la atenuación las bifurcaciones dendríticas y no tanto la distancia desde el sitio de origen del potencial de acción. Además, registrando en modo *cell-attached* hallan que esta propagación no es pasiva, sino que es activa y se debe a la presencia en las dendritas de canales de sodio, potasio y calcio, dependientes del voltaje y del tiempo. Específicamente encuentran que los canales de Na<sup>+</sup> tienen una distribución heterogénea que decae con la distancia respecto al soma, a diferencia de los canales de K<sup>+</sup> que poseen una distribución homogénea en el árbol dendrítico; por último, encuentran que la expresión de canales de Ca<sup>++</sup> se da en las dendritas proximales.

La presencia de canales de calcio en dendritas TC fue previamente confirmada <sup>120</sup>; en este estudio se midieron los cambios en la fluorescencia de señales de calcio, que se produjeron debido a la inducción por parte del experimentador del modo de disparo tónico o en ráfagas en las neuronas registradas, las imágenes de calcio muestran la presencia de canales de Ca<sup>++</sup> en dendritas proximales y soma. Además, empleando protocolos estándar de *voltage-clamp* discriminan la presencia de canales de Ca<sup>++</sup> de alto y bajo umbral en dendritas proximales.

Siguiendo los estudios del impacto de la distribución espacial de canales de calcio en dendritas se suman dos estudios teóricos que emplean modelos con una morfología realista de las neuronas TC <sup>121,122</sup>. En Destexhe et al. 1998 primero miden experimentalmente la corriente de calcio I<sub>T</sub> en neuronas disociadas, las cuales sólo poseen el soma y dos ramas de dendritas proximales; empleando este valor experimental en un modelo de la neurona disociada hallan el valor de permeabilidad máxima del canal T (pT<sub>max</sub>) necesario para reproducir la respuesta eléctrica de una neurona real. Este valor de permeabilidad es usado posteriormente para establecer pT<sub>max</sub> en el soma y dendritas proximales del modelo realista;

donde muestran que para reproducir la corriente  $I_T$  registrada en una neurona TC intacta, es necesario aumentar 5 veces el valor de  $pT_{max}$  en las dendritas distales, respecto a su valor en soma y dendritas proximales. En la figura 4.4 se muestra que el aumento en la densidad de canales T en dendritas distales también es necesario para reproducir con el modelo el modo de disparo en ráfagas registrado experimentalmente. Por otra parte, en Zomorodi et al. 2008 analizan el impacto de la distribución espacial de canales de calcio de bajo umbral T en la generación del modo de disparo en ráfagas; hallando que la distribución espacial no homogénea de estos canales es la más eficiente para producir esta respuesta fisiológica. Además, muestran que la ubicación de los canales T en las dendritas proximales es más eficiente para la generación de ráfagas; lo que iría en contra de lo hallado en Destexhe et al. 1998, pero a favor de los resultados experimentales <sup>119</sup>. Sin embargo, en el contexto de estos estudios teóricos el impacto de los canales de calcio en las dendritas podría estar afectado por la presencia de otros canales activos que también podrían ser expresados en el árbol dendrítico de las neuronas TC.



**Figura 4.4. La producción de ráfagas requiere una alta expresión de canales T en dendritas distales.** (A) A la izquierda se muestra una imagen de una neurona TC real (perteneciente al núcleo LGN), y a la derecha se grafica la respuesta del voltaje de membrana respecto al tiempo que se produjo ante la estimulación eléctrica de una neurona TC intacta (los pulsos de inyección de corriente se muestran al pie de la figura); los cuales generan LTSs. (B) La simulación de la misma inyección de corriente que en (A) en un modelo neuronal que contempla la morfología realista de la neurona TC (panel izquierdo) no fue suficiente para reproducir los LTSs (panel derecho) cuando se distribuyó una densidad uniforme del canal T en toda el área del modelo neuronal (representado por el color gris claro). El valor de permeabilidad usado fue equivalente a  $pT_{max}=1.7 \times 10^{-5}$  cm/seg, el cual representa el valor medido experimentalmente en las neuronas TC disociadas. (C) El modelo neuronal (izquierda) presenta una distribución uniforme del canal T en soma y dendritas proximales (área gris claro) de  $pT_{max}=1.7 \times 10^{-5}$  cm/seg, para igualar la densidad y distribución morfológica de las neuronas disociadas; en color negro (dendritas distales) una distribución uniforme de  $pT_{max}=8.5 \times 10^{-5}$  cm/seg fue suficiente para reproducir la respuesta en voltaje (panel derecho) similar a la neurona real; bajo los mismos protocolos de estimulación que en (A y B). Figura modificada de <sup>121</sup>.

Un estudio más reciente confirma la presencia de canales de  $\text{Ca}^{++}$  en todo el árbol dendrítico de neuronas TC <sup>123</sup>; empleando en simultáneo registros de *patch-clamp* e imágenes de calcio encuentran que los potenciales de acción se propagan de forma retrógrada con una eficiencia que decae con la distancia; cuando la neurona dispara uno o varios potenciales de acción, la señal de calcio producto de la propagación retrógrada es espacialmente restringida al área proximal, coincidiendo con los resultados mostrados en <sup>119</sup>. Por el contrario, el disparo de una ráfaga es propagado de forma retrograda a todo el árbol dendrítico como una señal global que invade a toda esta estructura sin decaer en amplitud. Usando un bloqueador específico de los canales de  $\text{Ca}^{++}$  de bajo umbral (TTA P2) muestran que su propagación es activa y dependiente de estos canales, que se expresan en todo el árbol dendrítico. Dado que una ráfaga está constituida por un LTS y uno o varios potenciales de acción de alta frecuencia, en este trabajo muestran que la propagación retrógrada global es debida al LTS, el cual es justamente producido por la corriente T, por lo que es llamado posteriormente spikes global de  $\text{Ca}^{++}$  <sup>124</sup>. La propagación global del LTS provoca que esta señal no pueda ocurrir de forma local en una parte de la neurona, sino que se produce en simultáneo en toda ella <sup>124</sup>.

### ***Conductancias sinápticas***

Las neuronas Talamocorticales de los núcleos primarios del Tálamo dorsal <sup>6</sup> reciben entradas sinápticas excitatorias provenientes de los inputs sensoriales y de inputs de la corteza; junto con entradas sinápticas inhibitorias de las neuronas reticulotalámicas. Además, pueden recibir inputs inhibitorios provenientes de interneuronas del Tálamo; pero dado que nuestros datos experimentales son extraídos de los núcleos VB de ratón, los cuales no poseen interneuronas <sup>125</sup>, no consideramos a estas estructuras en nuestro estudio. Por último, las neuronas TC también reciben entradas modulatorias provenientes del tallo cerebral <sup>6,9</sup>. Para una descripción más detallada ver capítulo 1.

Cada tipo de input sináptico se ubica en una región específica de la neurona TC, las entradas sensoriales se ubican en las dendritas proximales, y activa en la neurona TC receptores ionotrópicos del tipo AMPA y NMDA. La entrada excitatoria de la corteza hace sinapsis sobre las dendritas distales y activa receptores sinápticos del tipo AMPA y NMDA, además de receptores metabotrópicos del tipo mGluR1 <sup>42</sup>. Las entradas sinápticas provenientes de las neuronas nRT se ubican en las dendritas medial-proximal; la liberación

del neurotransmisor GABA por parte de estas neuronas activa receptores ionotrópicos GABA<sub>A</sub> y metabotrópicos GABA<sub>B</sub>.

El presente capítulo está dividido en tres secciones, en la primera parte se estudió el impacto de la distribución espacial de conductancias iónicas sobre el disparo de ráfagas repetitivas sin considerar las entradas sinápticas, explorando el espacio de parámetros de las conductancias intrínsecas capaces de sostener este comportamiento fisiológico. En la segunda parte usamos los parámetros de conductancias intrínsecas default <sup>17</sup> y analizamos el impacto de las sinapsis excitatorias corticales e inhibitorias de las neuronas nRT en el disparo de ráfagas repetitivas. Por último, en la tercera parte se estudió la relación entre las propiedades intrínsecas y las entradas sinápticas, y cómo éstas impactan en la respuesta de la neurona TC.

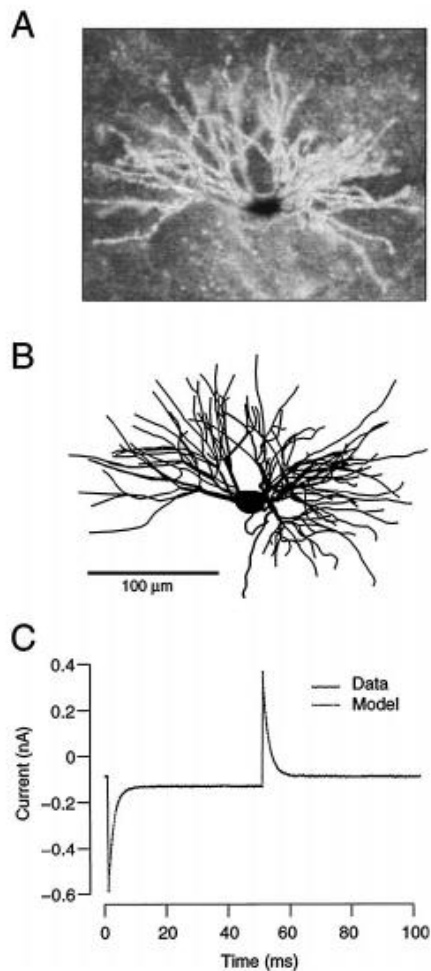
#### **4.2 Primera parte: interacción de las propiedades intrínsecas que favorecen el disparo en ráfagas**

En estudios previos del grupo se utilizaron datos obtenidos mediante registros electrofisiológicos de neuronas TC para construir un modelo monocompartimental en NEURON que incluyó descripciones biofísicas detalladas de cada una de las conductancias sub-umbrales de estas neuronas <sup>17</sup>. Con este modelo se analizó la función de cada una de estas conductancias iónicas en el potencial de reposo, y se determinó cómo interactúan para dar lugar a las oscilaciones sub-umbrales que sostienen el disparo repetitivo en ráfagas (ver Capítulo 1). Para extender este análisis de la dinámica temporal entre conductancias al dominio espacial desarrollamos un modelo de tres compartimientos cuyo proceso se detalla a continuación.

##### **4.2.1 Métodos**

Comenzamos utilizando un modelo multicompartimental que representó la morfología y las propiedades pasivas de una neurona TC (Fig. 4.5), el cual fue desarrollado por Destexhe <sup>121</sup> en la plataforma NEURON. Este modelo posee 206 compartimientos; cada compartimiento en NEURON es un cilindro que tiene especificado su geometría y propiedades pasivas, representando una sección de la neurona real. En este modelo se puede

modificar el valor de cualquier conductancia en cada uno de los 206 compartimientos de forma individual o como un todo, también se puede considerar al modelo neuronal dividido en tres grandes secciones constituidas por el soma, dendritas proximales y dendritas distales, en donde cada división posee un número de compartimientos previamente establecido que representan las características de una neurona real y, de esta forma poder distribuir homogéneamente las conductancias en cada una de estas tres grandes áreas. Para estudiar el impacto de la distribución espacial de las conductancias incorporamos a este modelo las siete conductancias iónicas que modulan las propiedades eléctricas de las neuronas TC a potenciales sub-umbrales <sup>17</sup> junto a las conductancias de sodio y potasio necesarias para producir potenciales de acción <sup>126</sup>. Sin embargo, la implementación del modelo en NEURON limitó la posibilidad de realizar una exploración más amplia y sistemática del espacio de parámetros de conductancias, dado que para cada simulación había que establecer a mano los parámetros, sumado al costo temporal de simulación de un programa complejo.

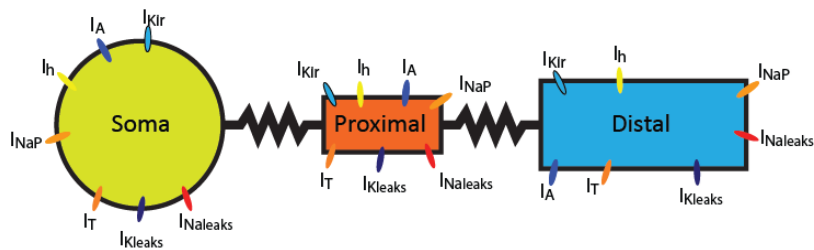


**Figura 4.5. Modelo de neurona TC con morfología realista.** (A) Imagen de una neurona TC real perteneciente a los núcleos ventro-basales. (B) Reconstrucción 3D que recrea la morfología de una neurona TC real, creado a partir de la técnica NeuroLucida empleando las imágenes ópticas de las neuronas TC reales. (C) Corriente versus tiempo de un registro de neurona TC representativo, superpuesto a una simulación del modelo multicompartimental. La respuesta eléctrica del modelo computacional, creado a partir de la reconstrucción morfológica, fue ajustado hasta que sus propiedades pasivas fueron idénticas a las obtenidas en registros experimentales de neuronas TC. Figura extraída de <sup>121</sup>.

Para corregir los inconvenientes con los que nos encontramos empleando el modelo de 206 compartimentos, e inspirados en un estudio que utiliza un modelo teórico simple para explorar el amplio espacio de parámetros intrínsecos que conservan las respuestas fisiológicas de interés <sup>127</sup>; construimos nuestro propio modelo en el lenguaje de programación C. Este lenguaje nos permitió introducir y extraer del modelo datos de manera automática de tal forma de optimizar los tiempos del estudio y poder explorar de forma sistemática un amplio rango de combinaciones de parámetros. Nuestro modelo se basó nuevamente en datos extraídos de Destexhe 1998, esta vez usando la geometría y las propiedades pasivas de un

modelo de 3 compartimientos, que fue reconstruido en este mismo estudio a partir de la geometría y propiedades pasivas del modelo de 206 compartimientos <sup>121</sup>.

En la figura 4.6 se muestra un esquema de nuestro modelo, los compartimientos equivalen al soma, dendrita proximal y dendrita distal, que se conectan entre sí por medio de una conductancia de acoplamiento; los puntos de colores representan cada una de las siete conductancias iónicas, que se ven distribuidas en todos los compartimientos; las corrientes de sodio y potasio necesarias para generar potenciales de acción se ubicaron en el soma y no fueron ilustradas en el esquema. Cada compartimiento tiene su geometría y propiedades pasivas <sup>121</sup>; sin embargo, la resistencia de entrada se vio modificada debido a los cambios en el área por pasar del modelo complejo al modelo equivalente de 3 compartimientos, para poder mantener este valor acorde a los datos experimentales se implementó un factor ( $f_c$ ) que re-escala el área de las conductancias y capacitancia en las dendritas <sup>121,122</sup>. Las ecuaciones que describen al modelo pueden verse a continuación, cada compartimiento posee su propio potencial de membrana y sus conductancias iónicas: la ecuación (4.1) pertenece al soma, la (4.2) a la dendrita proximal y la (4.3) a la dendrita distal.



**Figura 4.6. Esquema del modelo teórico de neurona TC.** El modelo está dividido en tres compartimientos: soma, dendrita proximal y dendrita distal. Con una geometría esférica para el soma; y cilíndrica para ambos compartimientos dendríticos. La conexión entre el soma→dendrita proximal y dendrita proximal→ dendrita distal está dado por una conductancia de acoplamiento. Cada compartimiento posee las siete conductancias iónicas implicadas en el estudio, las cuales están representadas por los diferentes colores.



$$C \frac{dV_{soma}}{dt} = I - g_n(V_{soma} - E_n) - \frac{g_{12}(V_{soma} - V_{prox})}{A_{soma}} \quad (4.1)$$

$$C' \frac{dV_{prox}}{dt} = -g'_n(V_{prox} - E_n) - \frac{g_{12}(V_{prox} - V_{soma})}{A_{prox}} - \frac{g_{23}(V_{prox} - V_{distal})}{A_{prox}} \quad (4.2)$$

$$C' \frac{dV_{distal}}{dt} = -g'_n(V_{distal} - E_n) - \frac{g_{23}(V_{distal} - V_{prox})}{A_{distal}} \quad (4.3)$$

Donde  $C' = f_c C$  y  $g'_n = f_c g_n$  representan la capacitancia y conductancia dendríticas respectivamente, re-escaladas por el factor  $f_c$ ;  $I$  es la inyección de corriente externa que se ubicó en la región del soma;  $g_n$  representa a las siete conductancias junto a sus variables de activación e inactivación, y  $E_n$  a sus respectivos potenciales de reversión;  $g_{12}$  es la conductancia que acopla los compartimientos del soma con la dendrita proximal, y  $g_{23}$  es la conductancia de acople entre la dendrita proximal y la distal; por último la variable  $A$  representa las áreas de cada compartimiento ( $A_{soma}$ ,  $A_{proximal}$  y  $A_{distal}$ ). Para mayor detalle ver apéndice AII, donde se encuentra el algoritmo completo del modelo y los valores de cada parametro.

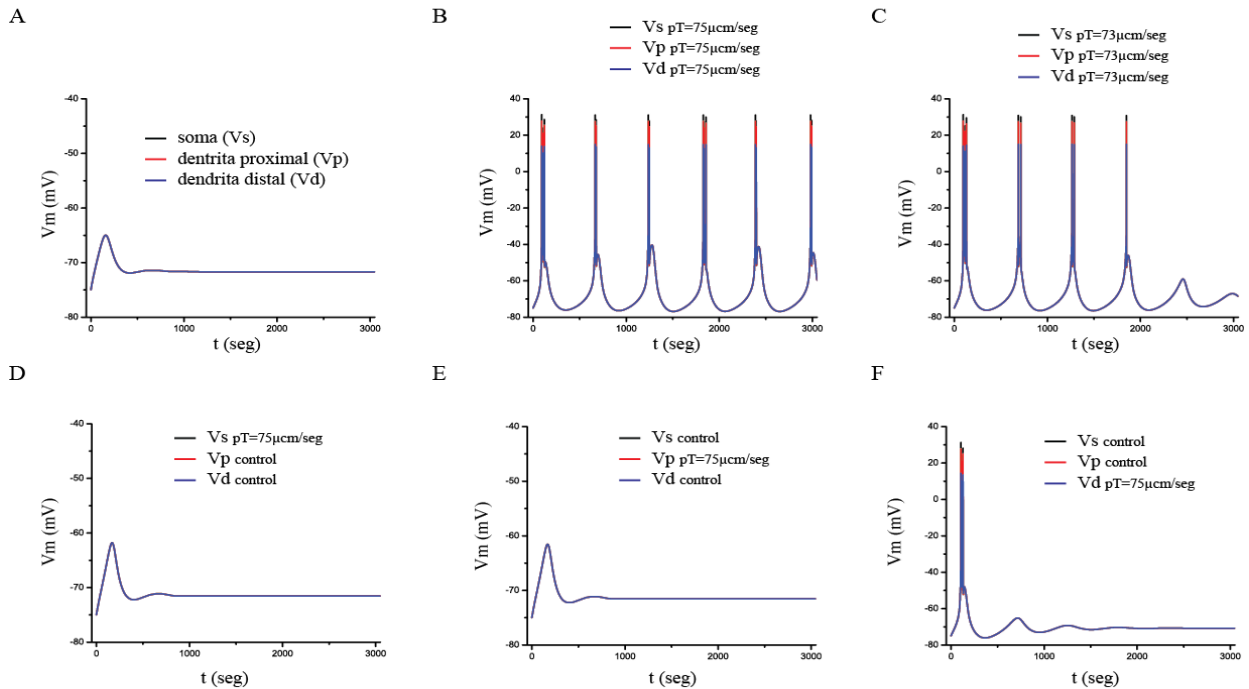
El modelo default posee los valores de conductancias máximas sub-umbrales:  $g_{Kir}=20\mu S/cm^2$ ;  $g_h=22\mu S/cm^2$ ;  $g_{Nap}=5.5\mu S/cm^2$ ;  $g_A=5500\mu S/cm^2$ ;  $pTmax=5 \times 10^{-5} cm/seg$ ;  $g_{Kleak}=12\mu S/cm^2$ ;  $g_{Naleak}=3\mu S/cm^2$ .

Fijamos una temperatura de 34° C para todas las simulaciones del capítulo.

#### 4.2.2 Resultados

Para estudiar el impacto de la distribución espacial de conductancias iónicas en el modo de disparo repetitivo en ráfagas buscamos un modelo que reprodujera este comportamiento fisiológico de forma espontánea sin inyección de corriente, para esto modificamos sólo la permeabilidad de la corriente de calcio de bajo umbral  $I_T$  ( $pTmax$ ) y

dejamos las otras conductancias en sus valores default (ver métodos). En la figura 4.7 se muestran las respuestas en voltaje del modelo para los tres compartimientos ( $V_{\text{soma}}$ ,  $V_{\text{prox}}$  y  $V_{\text{distal}}$ ) primero se analizó el  $V_m$  considerando a todas las conductancias en sus valores default con una distribución uniforme (Fig. 4.7A), bajo esta condición sin inyección de corriente el  $V_m$  se estabilizó alrededor de  $-72\text{mV}$ ; notar que la simulación comenzó en  $-75\text{mV}$ , esto es debido a que el programa necesitó que se establezca un valor de  $V_m$  para inicializar todas las variables (ver algoritmo del programa en apéndice B) y  $-75\text{mV}$  fue el valor elegido para las simulaciones que corresponden a los resultados del modelo parte 1. Aumentando la permeabilidad del canal T de forma homogénea en todos los compartimientos encontramos que para  $pT_{\text{max}}=7.5 \times 10^{-5}\text{cm/seg}$  el modelo dispara ráfagas repetitivas (Fig. 4.7B), si bien el mínimo homogéneo de permeabilidad para generar ráfagas fue de  $7.3 \times 10^{-5}\text{cm/seg}$  (Fig. 4.7C) decidimos emplear el valor de  $7.5 \times 10^{-5}\text{cm/seg}$  dado que con este modelo se obtuvo una respuesta más robusta en la generación de ráfagas repetitivas (comparar Fig. 4.7B y 4.7C). Llamamos entonces a este modelo el modelo control; ver que el modelo sólo fue control considerando la distribución de  $pT_{\text{max}}$  homogénea, dado que este valor distribuido de forma individual en cada compartimento fue incapaz de producir ráfagas repetitivas (ver Fig. 4.7D, 4.7E y 4.7F) Sin embargo, comparando los  $V_m$  para cada condición nos encontramos con que la distribución heterogénea en el compartimento distal fue la única situación donde al menos se produjo una ráfaga, al contrario del soma y de la dendrita proximal donde se produjo una respuesta pasiva, similar a la respuesta obtenida con el modelo default (Fig. 4.7A). Por último, se puede notar que en las condiciones donde se produjeron respuestas pasivas, la amplitud de los distintos  $V_m$  (somático y dendríticos) se mantuvo igual; también ocurrió esto con los LTS para las situaciones donde se produjeron ráfagas; al contrario, los potenciales de acción que van montados en los LTS sí se vieron afectados y decayeron en amplitud con la distancia al soma, el cual corresponde al único compartimento donde se ubicaron los canales iónicos necesarios para generarlos.



**Figura 4.7. Respuesta del modelo ante cambios del valor y de la distribución espacial de  $PT_{max}$ .** Empleando el modelo con los valores de las conductancias fijados en sus valores default (modelo default), con  $I=0pA$  y partiendo de un potencial de membrana inicial de  $-75mV$ , el sistema se estabilizó en un potencial de membrana en reposo de  $-72mV$  (A). Para un aumento homogéneo de  $pT_{max}$  en todos los compartimientos (de  $5 \times 10^{-5}cm/seg$  a  $7.5 \times 10^{-5}cm/seg$ ) el modelo generó la respuesta de ráfagas repetitivas de forma sostenida en el tiempo (B). Un valor homogéneo de  $pT_{max}$  en todos los compartimientos (de  $5 \times 10^{-5}cm/seg$  a  $7.3 \times 10^{-5}cm/seg$ ) generó ráfagas repetitivas que no fueron sostenidas en el tiempo (C). La distribución espacial no homogénea de  $PT_{max}=7.5 \times 10^{-5}cm/seg$ , ya sea sólo: en el soma (D), en la dendrita proximal (E) o en la dendrita distal (F) no produjo la respuesta de ráfagas repetitivas. Esta última simulación se realizó aumentando en cada compartimiento de manera individual  $PT_{max}$ , manteniendo en el resto de los compartimientos su valor default de  $50\mu m/seg$ .

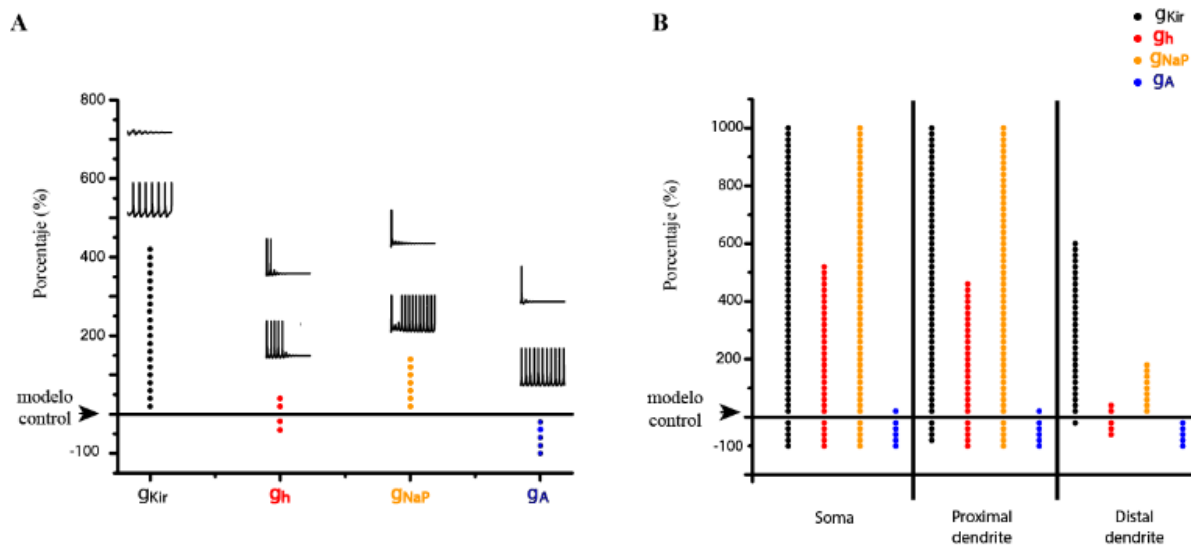
A partir del modelo control de la figura 4.7B y manteniendo fijas en los tres compartimientos las conductancias Leak (de sodio y potasio) y el valor de  $pT_{max}=7.5 \times 10^{-5}cm/seg$  (requisito para producir LTS), variamos el resto de las conductancias sub-umbrales de forma individual. Con estas variaciones generamos un espacio de parámetros de conductancias capaz de sostener la respuesta de ráfagas repetitivas de manera espontánea.

Establecimos dos espacios de parámetros, uno con distribución espacial homogénea considerando al modelo como un todo, y otro con distribución espacial no homogénea variando cada conductancia de forma individual por compartimiento. Por último, la restricción impuesta para que cualquier modelo pudiera pertenecer al espacio de parámetros fue que su respuesta en voltaje presentara un mínimo de cuatro ráfagas ( $n_{burst} \geq 4$ , con  $n_{burst}$  equivale al número de ráfagas).

En la figura 4.8A pueden verse los resultados del estudio para la distribución espacial homogénea, cada punto equivale a un modelo neuronal capaz de reproducir la respuesta de interés, las conductancias están representadas por colores como se indica en la figura; por otro lado los saltos en una misma conductancia equivalen a un 20% de su valor default, el cuál puede ser un incremento o decremento, los puntos por sobre el modelo control indican incrementos y los que se encuentran por debajo de éste indican decremento, es decir que un -100% negativo indica que la conductancia de interés está en cero. Los trazos de voltaje (insertos en Fig. 4.8A) muestran la respuesta de un ejemplo de los modelos para cada variación de conductancia individual que se encuentran en los límites del espacio de parámetros, específicamente se muestra cómo el modelo límite admite ráfagas repetitivas ( $n_{burst} \geq 4$ ) y cómo un cambio en la conductancia de estudio elimina este comportamiento ( $n_{burst} < 4$ ); en este caso para representar el potencial de membrana de cada modelo usamos el  $V_{soma}$ . Como puede verse en la figura 4.8A el espacio de conductancias es limitado, si bien  $g_{Kir}$  pudo aumentarse considerablemente ( $> 400\%$  respecto de su valor default) no pudo disminuirse respecto a su valor en el modelo control; algo similar ocurrió con  $\bar{g}_{NaP}$  aunque su límite superior fue mucho más acotado (aproximadamente 150% de  $\bar{g}_{NaP}$  default); por otra parte  $\bar{g}_h$  admitió un leve aumento y disminución, ambos de un 40% de su valor default. Por último,  $\bar{g}_A$  no fue requisito para producir ráfagas repetitivas en el modelo, pero un leve aumento de un 20% las eliminó.

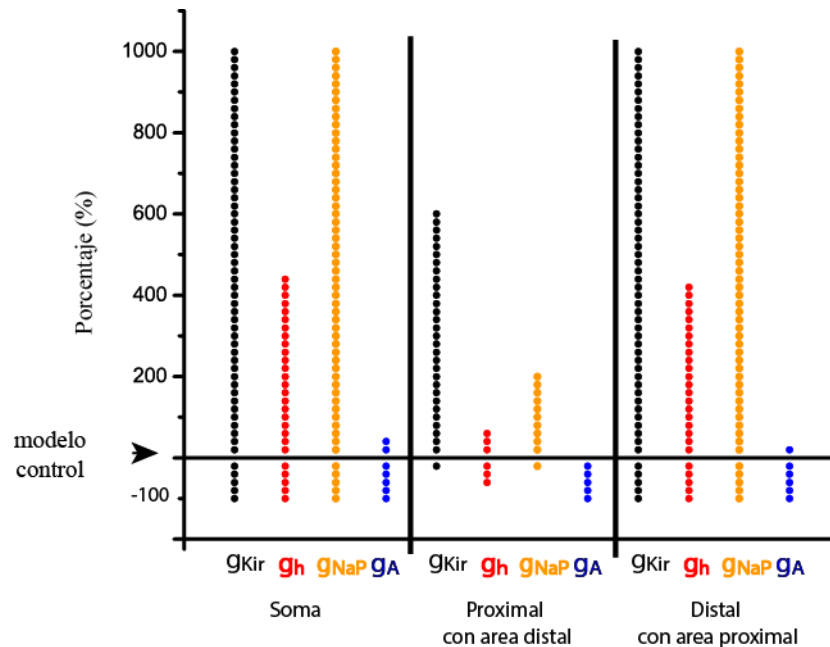
Por otra parte, considerando una distribución espacial no homogénea encontramos un espacio de parámetros más amplio que el anterior (Fig. 4.8B). La corriente que mayor impacto tuvo sobre el disparo en ráfagas fue  $I_A$ ; en soma y dendrita proximal incrementar un 40%  $\bar{g}_A$  eliminó las ráfagas; respecto al compartimiento distal éste no admitió aumentos de

$\bar{g}_A$ , similar a lo que habíamos visto para la distribución homogénea; además la presencia de esta corriente no fue requerimiento para generar las ráfagas repetitivas.  $\bar{g}_{NaP}$  pudo aumentarse hasta el valor de corte (1000%) en soma y dendrita proximal o no estar presente, pero no pudo ser disminuida en dendritas distales respecto a su valor default. Por su parte,  $\bar{g}_{Kir}$  no tuvo fuertes impactos en soma y dendrita proximal, ya que en soma no fue necesaria su presencia y en dendrita proximal sólo fue necesario mantener al menos un 20% de  $\bar{g}_{Kir}$ ; por otro lado, en dendrita distal sólo pudo disminuirse  $\bar{g}_{Kir}$  en un 20%. Algo similar ocurrió con  $\bar{g}_h$ , esta corriente pudo estar ausente en soma y dendrita proximal sin impactar en la respuesta del modelo, pero sólo pudo disminuirse hasta un 40% de  $\bar{g}_h$  en el compartimento distal; por otro lado, los aumentos de  $\bar{g}_h$  tampoco interfirieron en soma y dendrita proximal pero sí en distal, donde solo pudo admitirse un aumento de un 40%.



**Figura 4.8. Espacio de modelos que sostienen una respuesta de ráfagas repetitivas.** Partiendo del modelo control (flecha negra) y bajo la condición de  $I=0$ , se exploró el espacio de parámetros con distribución espacial homogénea (A) y distribución espacial heterogénea (B) capaz de generar ráfagas repetitivas; como se muestra en los trazos de voltaje insertados en (A), donde los trazos inferiores muestran los límites del espacio homogéneo para cada condición y los trazos superiores representan ejemplos de modelos por fuera de este espacio. Cada cambio de parámetros significó aumentar o disminuir en valores de porcentaje (saltos de  $\pm 20\%$ ) un único valor de conductancia máxima respecto del modelo control, donde cada punto de color representa un modelo neuronal del espacio de parámetros, ya sea debido a un aumento o disminución de  $\bar{g}_{Kir}$  (puntos negros),  $\bar{g}_h$  (puntos rojos),  $\bar{g}_{NaP}$  (puntos amarillos) y  $\bar{g}_A$  (puntos azules).

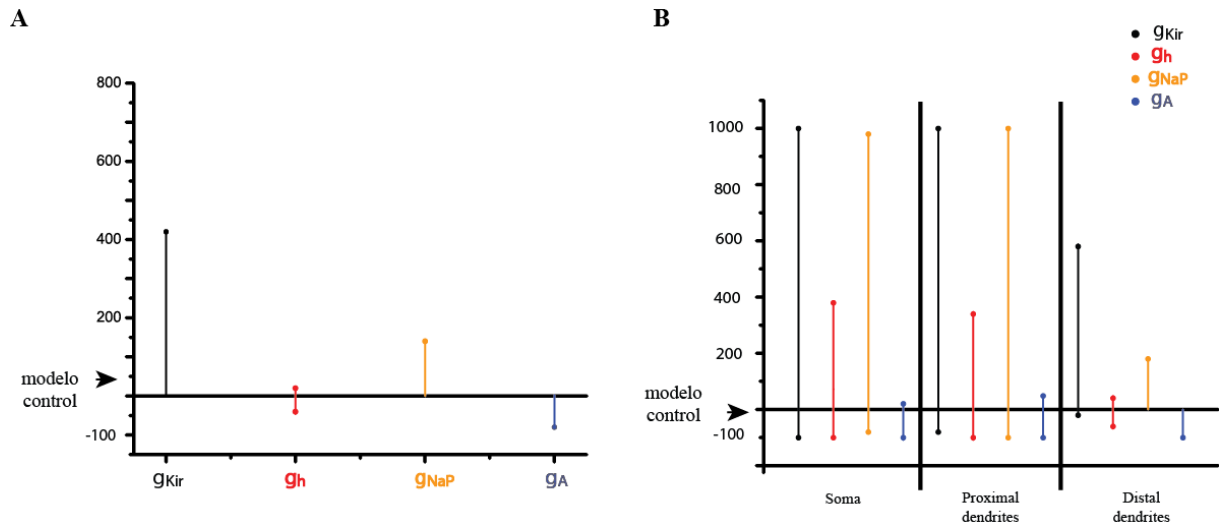
Dado que las modificaciones hechas en el compartimiento distal parecen dominar la respuesta del espacio de parámetros con distribución espacial heterogénea, volvimos a explorar el espacio de parámetros, pero cambiando las áreas de los compartimientos, es decir la dendrita proximal paso a tener el área de la distal y viceversa; de esta forma pudimos analizar si el impacto del compartimiento distal fue un efecto de área o fue debido a la conductancia de acople  $g_{23}$ . La exploración del espacio de parámetros con distribución espacial heterogénea para esta última condición puede verse en la figura 4.9, el comportamiento de este espacio no se vio afectado por las conductancias de acoplamiento  $g_{12}$  y  $g_{23}$ ; sin embargo, el intercambio de áreas ( $A_{distal} \rightarrow A_{prox}$  y  $A_{prox} \rightarrow A_{distal}$ ) entre compartimientos modificó el espacio, de tal forma de que la respuesta en la dendrita distal se trasladó a la dendrita proximal y viceversa (comparar Fig. 4.8B con Fig. 4.9).



**Figura 4.9. Impacto del área dendrítica en el espacio de parámetros.** Exploración del espacio de parámetros de modelos que generan ráfagas repetitivas de manera intrínseca ( $I=0$ ) partiendo de un modelo control con las áreas dendríticas cambiadas; donde  $A_{proximal}$  se reemplazó por el  $A_{distal}$  y viceversa; y manteniendo los valores de las conductancias de acople  $g_{12}$  y  $g_{23}$ .

Por último, simulamos los límites superior e inferior de la distribución espacial de conductancias homogénea y heterogénea en el modelo que preserva una morfología realista de una neurona TC (ver Fig. 4.5) <sup>121</sup>, para esto empleamos el modelo de 206 compartimientos en la plataforma NEURON y usamos una función del programa que permite distribuir de forma homogénea cada conductancia de interés en los compartimientos que definen al soma, dendritas proximales y dendritas distales, que como se explicó antes son las regiones equivalentes del modelo de 3 compartimientos. Partiendo nuevamente del modelo control que genera ráfagas repetitivas exploramos los límites de ambos espacios de parámetros; en la figura 4.10 se muestran los resultados obtenidos con el modelo multicompartmental; los

límites de ambos espacios se preservan en el modelo realista (comparar Fig. 4.8 con Fig. 4.10).



**Figura 4.10. Límites del espacio de parámetros en el modelo multicompartmental.** Exploración de los bordes del espacio de parámetros de modelos que generan ráfagas repetitivas de manera intrínseca ( $I=0$ ) empleando el modelo multicompartmental de 206 compartimientos con la plataforma de simulación NEURON. (A) muestra la distribución espacial homogénea y (B) la distribución heterogénea; donde en esta última se contemplaron tres grandes regiones del modelo: el soma, versus todas las dendritas proximales, versus todas las dendritas distales.



### 4.2.3 Discusión

El modelo de tres compartimientos permitió evaluar el espacio de parámetros de conductancias sub-umbrales, ya sea con distribución espacial homogénea o heterogénea, capaz de sostener el disparo en ráfagas repetitivas; cuya respuesta fue cualitativamente comparable con el modelo que representa la morfología realista de la neurona TC de los núcleos VB (comparar figuras 4.8 con 4.10). Encontramos que una distribución espacial no homogénea en soma y en dendritas proximales no generó impacto en la respuesta de interés; por un lado, ninguna de las cuatro conductancias necesitó estar presente en el soma y dendrita proximal (a excepción de un 20% de  $\bar{g}_{Kir}$ ) para generar ráfagas periódicas; siempre y cuando el resto de los compartimientos mantuviera el valor de las conductancias correspondiente al modelo control. Por otro lado, ambos compartimientos permitieron grandes aumentos de las conductancias sub-umbrales, a excepción de la corriente hiperpolarizante de potasio  $I_A$ ; cuyo leve aumento de  $\bar{g}_A$  (>20%) eliminó las ráfagas. El mayor impacto en la respuesta de voltaje del modelo está dominado por el compartimiento de la dendrita distal; ver gráfica de la distribución no homogénea en este compartimiento (Fig. 4.9B); cuyo impacto no permitió una disminución de  $\bar{g}_{NaP}$  o aumento de  $\bar{g}_A$ , respecto del modelo control. Además,  $\bar{g}_{Kir}$  sólo pudo disminuirse un 20% respecto al control; por su parte  $\bar{g}_h$  admitió una mayor disminución (del 20%) pero un aumento mayor al 40% eliminó las ráfagas.

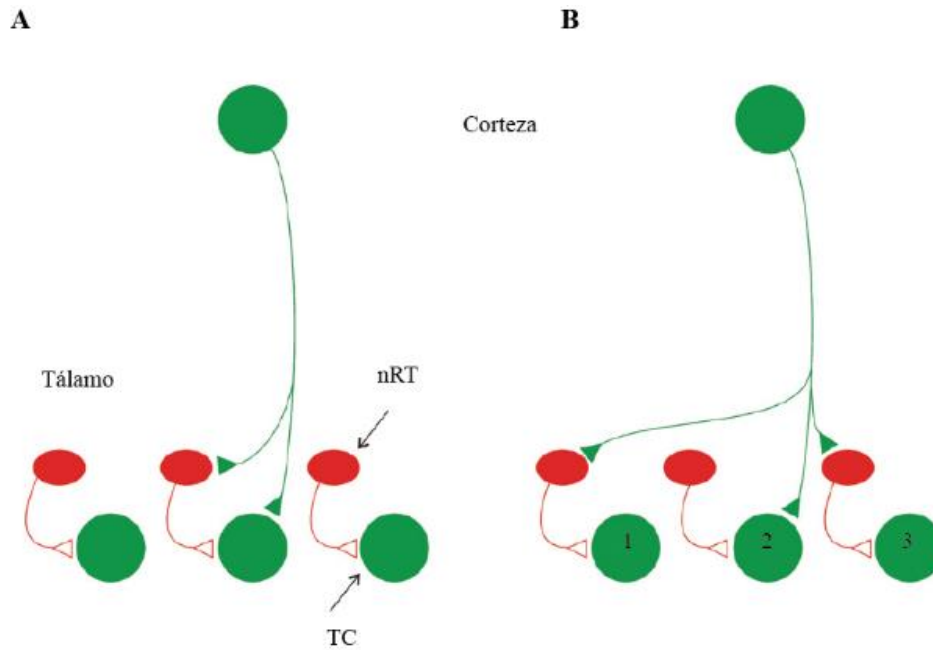
Pensando al modelo como un todo (distribución homogénea de las conductancias) encontramos que este espacio es similar al espacio heterogéneo del compartimiento distal; mostrando que el impacto de este compartimiento no sólo es mayor que el resto; sino que se impone en la respuesta del modelo sobre los otros compartimientos. Este resultado es acorde a los resultados obtenidos en Destexhe 1998 que muestran que un aumento de  $pT_{max}$  en dendritas distales es más eficiente para simular la respuesta de una neurona TC real (Fig. 4.4). Por último, encontramos que el efecto del compartimiento distal se debe únicamente a sus propiedades geométricas (ver Fig. 9.4).

Si bien no se conoce la distribución espacial de todas las conductancias sub-umbrales que las neuronas TC expresan, es sabido que  $I_T$  se expresa en el árbol dendrítico<sup>121,122,124</sup>; acorde a estos resultados nuestro modelo muestra que una distribución espacial de las

conductancias en las dendritas distales sería fisiológicamente y energéticamente más eficiente para la célula; ya que se necesitaría menor expresión de los canales para mantener la respuesta fisiológica de la neurona <sup>127</sup>. Además, esta distribución podría tener una relación con el sitio anatómico donde contactan las sinapsis excitatorias provenientes de la corteza y las inhibitorias provenientes del nRT e impactar en la integración sináptica. Por otro lado, la variación en la densidad de las conductancias individuales, ya sean de corrientes despolarizantes (tales como:  $I_{NaP}$  e  $I_h$ ) o hiperpolarizantes (cómo  $I_{Kir}$  o  $I_A$ ) preservan la respuesta de interés en el modelo, dentro de ciertos límites (Fig. 9.4), ver también <sup>128</sup>; esto es acorde con la idea de que la respuesta fisiológica de las células es robusta y se preserva ante la presencia de diferentes expresiones de los canales involucrados en generarla; cuya diversidad se presenta entre poblaciones de neuronas en un mismo individuo, o entre distintas especies <sup>127</sup>.

### **4.3 Segunda parte: interacción de las conductancias sinápticas en el modo de disparo**

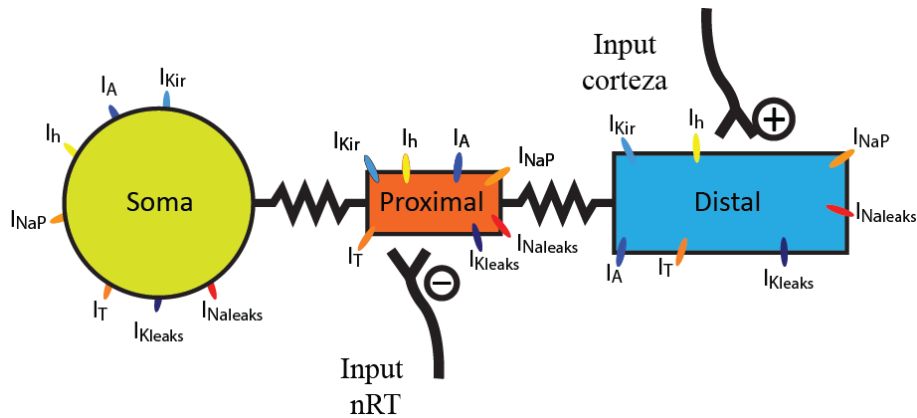
Las neuronas TC presentan conexiones recurrentes excitatorias e inhibitorias del circuito tálamo cortical (ver CTC en capítulo 1). Las características de las conexiones sinápticas dentro del circuito pueden simplificarse como se muestra en el esquema de la figura 4.11; el input proveniente de la corteza puede excitar a una neurona TC y al mismo tiempo estimular la entrada inhibitoria de una neurona del nRT sobre la misma neurona TC, tal como se muestra en la figura 4.11A. Por otra parte, la neurona TC puede recibir inputs de la corteza y de las neuronas del nRT sin que haya una conexión entre estas dos últimas, este tipo de conexiones se muestra en el esquema de la figura 4.11B y se conoce como conexión de lazo abierto <sup>129</sup>. Considerando este último tipo de conexión en el CTC desarrollamos un modelo de neurona TC el cual se detalla a continuación.



**Figura 4.11. Esquema de las posibles conexiones entre la capa VI de la corteza y las neuronas del tálamo.** (A) Un mismo input sináptico de la corteza (verde) puede contactar a una neurona TC (verde) y a su vez, a una neurona del nRT (rojo) que inhibe a la misma neurona TC. (B) Esquema de conexiones donde el input de la corteza produce únicamente una inhibición sobre las neuronas TC (1); o excitación (2) e inhibición (3) sobre diferentes neuronas TC. Figura modificada de <sup>6</sup>.

### 4.3.1 Métodos

Incorporamos al modelo anterior las entradas sinápticas provenientes de las neuronas reticulotálamicas (inhibitorias) y de la corteza (excitatorias) con su correspondiente ubicación anatómica, como se muestra en el esquema de la figura 4.12. Nuestro modelo representó a una neurona TC postsináptica, con conexiones en el CTC como se muestra en el esquema de la figura 4.11B (2), por lo que las sinapsis de la corteza y del nRT influyen en la neurona TC de forma independiente. No consideramos el input sensorial porque pretendimos abordar una condición en particular: las ráfagas repetitivas, que mayormente se asocian a estados comportamentales fisiológicos tales como sueño NREM y patológicos tales como epilepsia de ausencias<sup>33,130</sup>, en donde las neuronas TC se encuentran hiperpolarizadas y no están recibiendo aferencias sensoriales<sup>13</sup>.



**Figura 4.12. Esquema del modelo parte dos.** Al modelo anterior (modelo parte uno, Fig. 4.6) se le agregaron las entradas sinápticas provenientes de las neuronas del nRT en el compartimiento de la dendrita proximal, y las entradas sinápticas provenientes de la corteza sobre el compartimiento de la dendrita distal.

Si bien los inputs sinápticos provenientes de la corteza activan receptores AMPA y NMDA y los provenientes de las neuronas nRT activan receptores del tipo GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>B</sub> sobre las neuronas TC, en esta parte simulamos la activación de los receptores AMPA y GABA<sub>A</sub> únicamente. La activación de este tipo de receptores (ionotrópicos) puede modelarse con un esquema de activación de primer orden (ecuación 4.4), en donde la unión del neurotransmisor [T] con el receptor provoca que éste cambie del estado cerrado al abierto. La ecuación 4.5 describe la cinética de este mecanismo, donde  $r$  representa la fracción de canales en el estado abierto cuya dinámica depende de dos variables  $\alpha$  y  $\beta$ , siendo  $\alpha$  la tasa de apertura del canal y  $\beta$  la tasa con que el canal se cierra; dado que  $\alpha$  depende del valor de [T] tenemos que si [T]=0,  $r$  va a decaer de forma exponencial con el parámetro  $\beta$ . Los parámetros de la ecuación 4.5 para cada receptor sináptico ( $r_{AMPA}$  y  $r_{GABA_A}$ ) fueron extraídos de Destexhe et al. 1996. Simulamos a [T] como un pulso de altura 1 y ancho  $dt$ , siendo  $dt$  el paso de integración que usamos en el programa ( $dt=25\mu\text{seg}$ ). La probabilidad de que haya un evento sináptico se implementó de forma aleatoria siguiendo una distribución de Poisson (ver ecuaciones 4.8 y 4.9); el parámetro [T] ya sea para el receptor AMPA o GABA<sub>A</sub> puede valer uno o cero de manera aleatoria según esta distribución; si [T]=1 va a haber un evento sináptico (EPSP o IPSP) y si [T]=0 no. La probabilidad de que haya un evento en un determinado tiempo está dada por  $(f \times dt)$ ; siendo  $f$  el número promedio de resultados por unidad de tiempo. Dado que cada receptor, ya sea AMPA o GABA<sub>A</sub>, posee su propia probabilidad de ocurrencia, cada uno tiene su propia variable  $f$  ( $f_{AMPA}$  y  $f_{GABA_A}$ ). Por último, los valores de conductancia para ambas sinapsis ( $\bar{g}_{AMPA}$  y  $\bar{g}_{GABA_A}$ ) fueron ajustadas con el modelo, para esto se modificaron los valores de conductancia hasta que la amplitud de los respectivos EPSP y IPSP fueron iguales a los datos experimentales publicados en (Turner and Salt 1998 y 2003). La ecuación 4.6 del receptor AMPA se ubicó en la ecuación 4.3 que describe el  $V_m$  de la dendrita distal y la ecuación 4.7 del receptor GABA<sub>A</sub> se ubicó en la ecuación 4.2 que describe el  $V_m$  de la dendrita proximal.



$$\frac{dr_{1,2}}{dt} = \alpha_{1,2}[T_{1,2}](1 - r_{1,2}) - \beta_{1,2}r_{1,2} \quad (4.5)$$

$$I_{AMPA} = g_{AMPA}r_{AMPA}(V - E_{AMPA}) \quad (4.6)$$

$$I_{gabaA} = g_{gabaA} r_{gabaA} (V - E_{gabaA}) \quad (4.7)$$

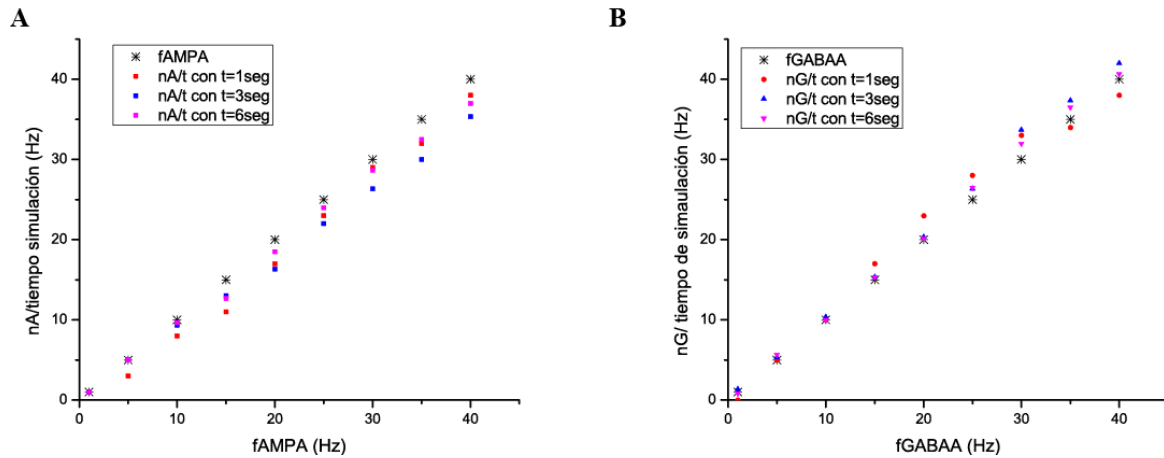
$$(f_{1,2} \times dt) \leq U_{1,2} \Rightarrow [T_{1,2}] = 1 \quad (4.8) \text{ pero sí}$$

$$(f_{1,2} \times dt) > U_{1,2} \Rightarrow [T_{1,2}] = 0 \quad (4.9)$$

El subíndice 1 corresponde al receptor AMPA; con  $\alpha_{AMPA} = 0.94 \text{ 1/ms mM}$ ,  $\beta_{AMPA} = 0.18 \text{ 1/ms}$ ,  $g_{AMPA} = 0.132 \mu\text{S}$  y  $E_{AMPA} = 0 \text{ mV}$ . Por otro lado, el subíndice 2 corresponde al receptor GABA<sub>A</sub>; con  $\alpha_{GABA_A} = 20 \text{ 1/ms mM}$ ,  $\beta_{GABA_A} = 0.160 \text{ 1/ms}$ ,  $g_{GABA_A} = 0.072 \mu\text{S}$  y  $E_{GABA_A} = -81 \text{ mV}$  (Ulrich et al. 1997). La variable U es un número aleatorio entre [0, 1]; cada U ya sea U<sub>AMPA</sub> o U<sub>GABA<sub>A</sub></sub> tiene su propio generador de números aleatorios; cuyas secuencias se mantuvieron constantes a lo largo de las diferentes simulaciones. Para más detalle ver algoritmo del programa en apéndice (AII).

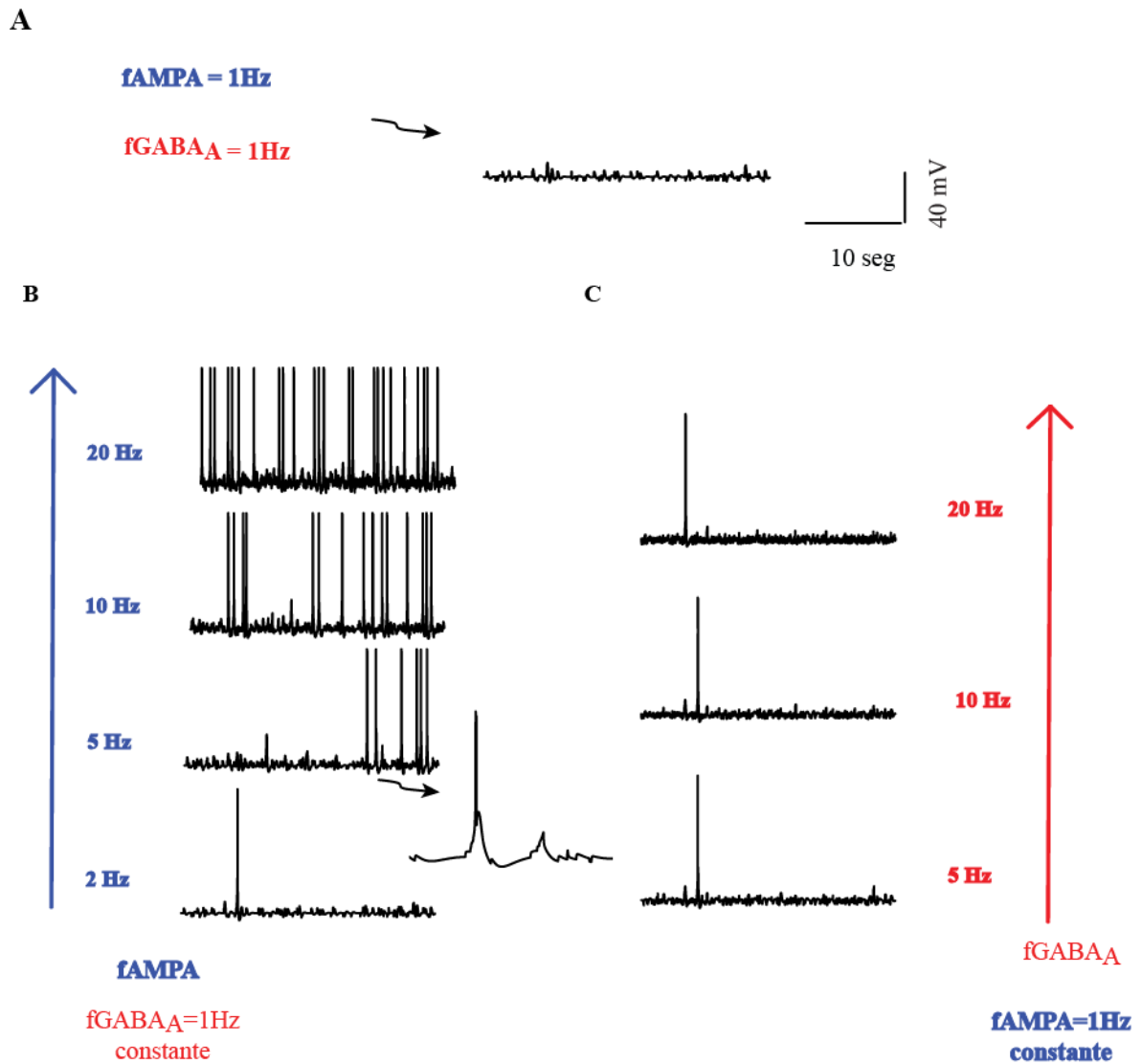
### 4.3.2 Resultados

Para estudiar cómo impactan los eventos sinápticos en la fisiología de la neurona TC simulamos diferentes frecuencias de estimulación AMPA Y GABA<sub>A</sub> en nuestro modelo; para esto usamos el modelo default al cuál fijamos su potencial de membrana en un valor hiperpolarizado de  $-75 \text{ mV}$  inyectando una corriente de  $-0.035 \text{ nA}$ , y luego realizamos simulaciones variando el parámetro f ( $f_{AMPA}$  y  $f_{GABA_A}$ ) de las ecuaciones 4.8 y 4.9. Primero, para corroborar que la frecuencia de eventos sinápticos (EPSP/IPSP) fuera cercana a los correspondientes parámetros  $f_{AMPA}$  y  $f_{GABA_A}$  pusimos dos contadores de eventos sinápticos dentro del modelo, uno para los eventos AMPA (nA) y otro para los eventos GABA<sub>A</sub> (nG); obtuvimos la frecuencia real de eventos sinápticos como el cociente entre nA o nG y el tiempo total de simulación, como es esperado los resultados obtenidos son cercanos a los  $f_{AMPA}$  y  $f_{GABA_A}$  (ver figura 4.13).



**Figura 4.13. Frecuencia de eventos sinápticos.** Simulaciones del modelo default a  $V_m = -75\text{mV}$  con  $I = -0.035\text{nA}$ ; para diferentes tiempos de simulación y de valores de los parámetros  $f$  ( $f_{\text{AMPA}}$  y  $f_{\text{GABA}_A}$ ); para comparar la frecuencia real de eventos sinápticos con el parámetro  $f$ . (A)  $nA/\text{tiempo}$  vs  $f_{\text{AMPA}}$  y (B)  $nG/\text{tiempo}$  vs  $f_{\text{GABA}_A}$ .

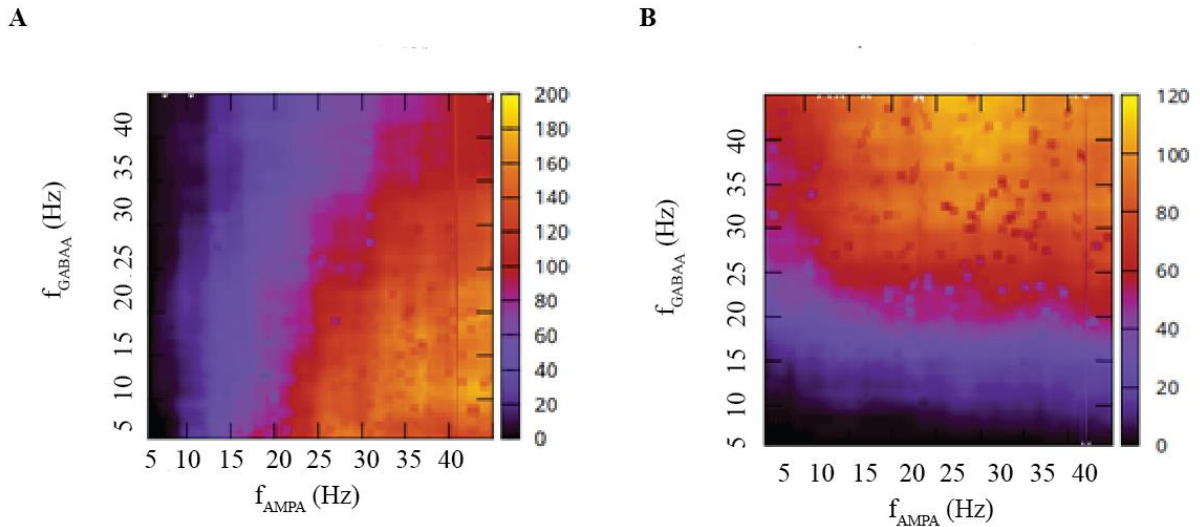
Con base en los resultados obtenidos continuamos el estudio del impacto de la frecuencia de estimulación sináptica usando los parámetros  $f_{\text{AMPA}}$  y  $f_{\text{GABA}_A}$ . Fijando el modelo default (ver métodos parte 1) en un  $V_m$  de  $-75\text{mV}$  podemos ver que una frecuencia promedio de eventos sinápticos correspondiente a  $f_{\text{AMPA}}=1\text{Hz}$  y  $f_{\text{GABA}_A}=1\text{Hz}$  no produjo ráfagas ni potenciales de acción en el modelo (figura 4.14A). Sin embargo, para la condición de  $f_{\text{GABA}_A}=1\text{Hz}$  constante, el aumento de  $f_{\text{AMPA}}$  produjo ráfagas, las cuales aumentaron conforme aumentó  $f_{\text{AMPA}}$  (ver la figura 4.14B). Por el contrario, manteniendo fijo el valor de  $f_{\text{AMPA}}$  en  $1\text{Hz}$  y variando sólo  $f_{\text{GABA}_A}$  no se produjeron ráfagas repetitivas en ninguna condición estudiada; a partir del valor de  $5\text{Hz}$  se generó una ráfaga que se mantuvo hasta la máxima frecuencia simulada de  $20\text{Hz}$ , ver figura 4.14C.



**Figura 4.14. Impacto de los inputs sinápticos en la respuesta del modelo.** Empleando el modelo default con  $V_m = -75\text{mV}$  e  $I = -0.035\text{nA}$ ; se simuló diferentes valores de  $f$ . (A)  $f_{\text{AMPA}} = f_{\text{GABA}_A} = 1\text{Hz}$ ; (B)  $f_{\text{GABA}_A} = 1\text{Hz}$  y  $f_{\text{AMPA}} = 2\text{Hz}$ ,  $5\text{Hz}$ ,  $10\text{Hz}$  y  $20\text{Hz}$ . (C)  $f_{\text{AMPA}} = 1\text{Hz}$  y  $f_{\text{GABA}_A} = 5\text{Hz}$ ,  $10\text{Hz}$  y  $20\text{Hz}$ .



El impacto de las entradas sinápticas no sólo depende de la frecuencia de estimulación sino también del potencial de membrana de reposo en que se halle la neurona, para poder simular ambas cosas realizamos un barrido de frecuencias de eventos sinápticos desde 0.5Hz hasta 40Hz empleando el modelo default para dos diferentes potenciales de membrana; elegimos un  $V_m$  despolarizado de -65mV que es cercano al potencial de reposo de las neuronas TC <sup>17</sup> y el  $V_m$  hiperpolarizado de -75mV. Los resultados obtenidos se muestran en los mapas de colores de la figura 4.15, el eje horizontal representa la variación en fAMPA y el eje vertical la fGABA<sub>A</sub>, y la escala de colores indican el número de potenciales de acción (ns). Para ambas situaciones la respuesta fisiológica del modelo se mantuvo en el modo de disparo de ráfagas y no en modo tónico, el número de potenciales de acción (ns) en la figura representan el total de potenciales montados en los LTSs que se produjeron a lo largo de cada simulación, la cual tuvo una duración de 60 segundos. Fijamos el  $V_m$  nuevamente en -75mV inyectando una corriente de -0.035nA en el compartimiento del soma, y luego variamos fAMPA y fGABA<sub>A</sub> simultáneamente; como puede verse en la figura 4.15A, bajo esta condición donde el  $V_m$  estuvo hiperpolarizado, se necesitó cierto valor de fAMPA para producirse ns; después de superar este umbral se produjeron potenciales de acción independientemente del valor fGABA<sub>A</sub>; sin embargo, bajos valores en el número de IPSP favorecieron el aumento de ns. Para analizar el comportamiento del modelo a un  $V_m$  más despolarizado inyectamos una corriente de 0.0358nA que estabilizó el potencial de membrana en -65mV, bajo esta nueva condición nos encontramos con que las sinapsis impactaron de manera contraria al caso anterior, donde ahora tuvieron relevancia los potenciales postsinápticos inhibitorios sobre los excitatorios (Fig. 4.15B); estímulos fGABA<sub>A</sub> por debajo de ciertos valores no produjeron potenciales de acción para todo el rango de fAMPA; una vez que fGABA<sub>A</sub> fue lo suficiente alto para generar potenciales de acción, nuevamente su presencia fue independiente de todo el rango de frecuencias fAMPA explorado.

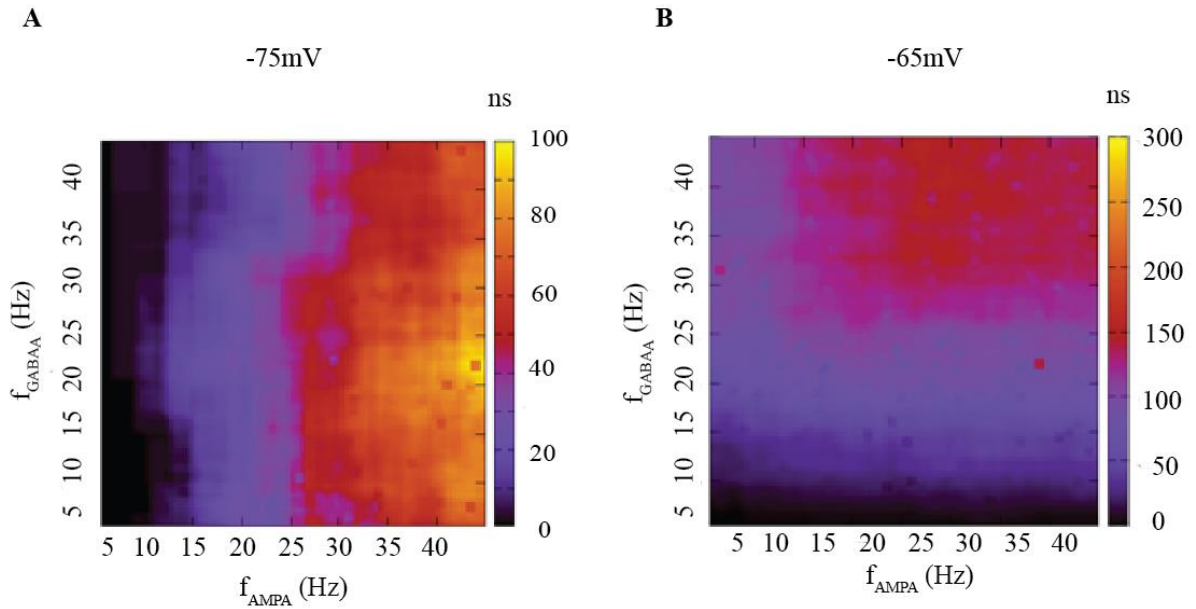


**Figura 4.15. Mapas de estimulación sináptica versus número de potenciales de acción.** Barrido de frecuencias sinápticas AMPA contra GABA<sub>A</sub>; donde los colores representan los números de potenciales de acción (ns) que se dan a lo largo de cada corrida de simulación (t=60seg). (A) para modelo default a -75mV con I=-0.035nA. (B) para modelo default a -65mV con I=0.0358nA.

Para representar un escenario más fisiológico en cuanto a los cambios en el potencial de membrana, modificamos la corriente leak de potasio  $I_{leak}$  en vez de la corriente inyectada. Realizamos el mismo barrido de frecuencias de la figura 4.15 usando el modelo default con inyección de corriente cero. Para llevar el  $V_m$  a -75mV aumentamos  $g_{KLeak}$  de su valor default correspondiente a  $10\mu S/cm^2$  a su nuevo valor de  $15.8\mu S/cm^2$ , por el contrario, para llevar el  $V_m$  a -65mV disminuimos  $g_{KLeak}$  llevándolo a  $6\mu S/cm^2$ . Los mapas de colores que obtuvimos bajo ambas condiciones se muestran en la figura 4.16, como puede verse los resultados obtenidos fueron a grandes rasgos similares a las condiciones con inyección de corriente externa. Para la condición más hiperpolarizada (-75mV) el input excitatorio AMPA dominó la repuesta excitable del modelo neuronal, para esta condición el límite inferior de  $f_{AMPA}$  para que haya ns fue más alto que para la condición anterior (comparar Fig. 4.15A con 4.16A), nuevamente para valores inferiores a este límite no hubo ns para cualquier valor de  $f_{GABA_A}$ , y una vez superado éste se generaron ns sin importar la frecuencia de estimulación

GABA<sub>A</sub>; en cuanto al número de potenciales de acción generados el ns disminuyó considerablemente respecto a los ns correspondientes al mapa de frecuencias con inyección de corriente. Por otro lado, un potencial de membrana más despolarizado (-65mV) necesitó un predominio de input inhibitorios por sobre los excitatorios para generar potenciales de acción, donde, al igual que la condición anterior (-65mV con inyección de corriente, Fig. 4.15B), fue requisito un mínimo de fGABA<sub>A</sub> para producir ns sin dependencia de fAMPA para el cambio de comportamiento (reposo→ potenciales de acción); pero la cantidad de ns se vio aumentada para ciertos valores de fAMPA en combinación con altos valores de fGABA<sub>A</sub>.

Para esta última condición, donde se modificaron los valores de conductancias leak de potasio, se puede notar que el número de potenciales de acción montados sobre los LTS respecto a la variación de los estímulos sinápticos, fue mucho mayor que el obtenido para el mismo potencial de membrana con inyección de corriente cuando  $g_{KLeak}$  fue disminuido (comparar Fig. 4.15B y 4.16B), y lo contrario ocurrió cuando  $g_{KLeak}$  fue aumentado (comparar Fig. 4.15A y 4.16A). Ambos cambios en el comportamiento son razonables si se tiene en cuenta que las modificaciones en los  $g_{KLeak}$  ya sea por un aumento o disminución afectan la resistencia de membrana y por ende la respuesta excitable del modelo.



**Figura 4.16. Mapas de estimulación sináptica versus número de potenciales de acción.** Similar a Fig. 4.15; pero fijando los distintos Vm con cambios en la conductancia leak de potasio. (A) modelo default a -75mV con  $I=0$  y  $g_{KLeak}=15.8\mu S/cm^2$ . (B) para modelo default a -65mV con  $I=0$  y  $g_{KLeak}=6\mu S/cm^2$ .

### 4.3.3 Discusión

En la sección anterior mostramos que era posible obtener modelos que generaran ráfagas periódicas modificando el valor de sus conductancias intrínsecas y su distribución espacial. En esta parte (modelo dos) partimos de un modelo que no presentó oscilaciones de manera espontánea (modelo default), el cual es similar a un modelo que presenta los valores de conductancia que fueron medidos experimentalmente en las neuronas TC de los núcleos VB de ratón <sup>17</sup>. Sin embargo, si a este último modelo le sumamos la presencia de los inputs sinápticos provenientes de la corteza y de las neuronas del nRT es posible generar ráfagas repetitivas sin modificar las conductancias intrínsecas; la ocurrencia de estas ráfagas necesitó de ciertos valores de frecuencia de estimulación. El modelo predice que a potenciales de membrana hiperpolarizados predomina la estimulación excitatoria AMPA sobre la GABA<sub>A</sub> en la generación de ráfagas, con un umbral de aparición para valores de  $f_{AMPA} \geq 5\text{Hz}$  y cuya

frecuencia de disparo aumenta conforme  $f_{AMPA}$  crece (Fig. 4.14B). Por el contrario, aumentar  $f_{GABA_A}$  no generó el comportamiento de interés, al menos para bajos valores de  $f_{AMPA}$ ; ya que un estudio que contempló un mayor rango de frecuencias de eventos sinápticos mostró que la estimulación  $f_{GABA_A}$  admite ráfagas repetitivas siempre y cuando esté presente una alta frecuencia de estimulación AMPA (Fig. 4.15A y 4.16A). Para potenciales de membrana despolarizados ocurre lo contrario, donde hay un predominio del input inhibitorio  $GABA_A$  sobre el excitatorio AMPA. Para bajos valores de  $f_{GABA_A}$  todo el barrido de inputs AMPA (de 0.5 a 40Hz) no fue suficiente para generar ráfagas repetitivas; y una vez superado un cierto umbral de  $f_{GABA_A}$  se generaron ráfagas cuya ocurrencia aumentó conforme este parámetro creció en frecuencia.

La predicción del modelo de que a  $V_m$  hiperpolarizados se necesiten inputs excitatorios para alcanzar un umbral de disparo es intuitivo, ya que la generación de LTS y o de potenciales de acción implican despolarizaciones del  $V_m$ . Una situación contra-intuitiva surge a  $V_m$  despolarizados, donde podría suponerse que el umbral de disparo está más cerca y que bajas  $f_{AMPA}$  serían suficientes para alcanzar el umbral.

El modelo muestra la relevancia de las propiedades intrínsecas de las neuronas al momento de integrar diferentes inputs sinápticos. La dependencia del voltaje de membrana respecto a las entradas sinápticas en la generación de ráfagas está dada, al menos en las neuronas TC, por la corriente de calcio de bajo umbral  $I_T$ ; por un lado, a  $V_m$  hiperpolarizados la inactivación de  $I_T$  se encuentra mayormente removida ( $h_T$  cercano a uno, ver Fig 1.10A. Capítulo 1) y, por sí sola la activación de  $I_T$  no es suficiente para generar un LTS; pero, un input sináptico excitatorio puede llevar a que  $I_T$  alcance su umbral de activación, y por ende genere LTSs; tal como ocurre en nuestro modelo (Fig. 4.15A y 4.16A). Por otro lado, a  $V_m$  más despolarizados  $I_T$  se encuentra mayormente inactivada ( $h_T$  cercano a cero) y los pocos canales que estén activos no alcanzan para desencadenar LTSs, por más que la despolarización causada por los inputs AMPA favorezcan la activación del canal. Para poder desencadenar los LTS a estos potenciales de membrana es necesario remover primero la inactivación del canal; este mecanismo pareciera también estar reproducido en el modelo, donde se necesitó cierto umbral de  $f_{GABA_A}$  para generar ráfagas cuando el  $V_m$  está

despolarizado (Fig. 4.15B y 4.16B). La activación de  $rGABA_A$  produciría la hiperpolarización suficiente para remover la inactivación de  $I_T$  en este caso.

Sin embargo, es relevante aclarar que las conexiones del CTC se pueden dar tal y como se muestra en el esquema de la figura 4.11, y que nuestro modelo reproduce la condición donde el input de la corteza no influye sobre el input inhibitorio de las neuronas nRT hacia las TC; por lo que los resultados del modelo no contemplan que podría estar ocurriendo con la respuesta de las neuronas TC cuando el input cortical no solo produce excitación en estas neuronas, sino también inhibición a través del lazo de conexiones (corteza→nRt→TC).

#### **4.4 Tercera parte: interacción de los inputs sinápticos y las propiedades intrínsecas que favorecen la generación de ráfagas.**

Las oscilaciones del circuito talamocortical han sido relacionadas con la generación y el mantenimiento de ritmos globales que pueden ser visualizados en el EEG y que caracterizan estados funcionales del cerebro como sueño y vigilia<sup>37,54</sup>. La capacidad del CTC para generar estas oscilaciones radica en la combinación de las propiedades intrínsecas de las neuronas que conforman el circuito y de sus conexiones sinápticas recurrentes. Especialmente, se ha demostrado en modelos animales genéticamente modificados que la falta del canal de calcio de bajo umbral T (responsable del modo de disparo en ráfagas en las neuronas TC), prácticamente elimina la componente de ondas delta presentes en el EEG durante sueño N-REM, además de producir alteraciones en los ciclos del sueño<sup>55,56</sup> y su sobreexpresión produce un ratón con fenotipo de epilepsia de ausencia con presencia de complejos espiga-onda, que caracterizan el evento epiléptico en el EEG<sup>68</sup>; revisado con mayor detalle en (Capítulo 1).

Varios modelos computacionales del CTC se han creado para tratar de elucidar los mecanismos involucrados en la generación de las oscilaciones que presenta el circuito y que podrían contribuir o desencadenar los ritmos globales antes mencionados<sup>62,131,132</sup>; especialmente, se ha puesto foco en el input de las neuronas reticulotalámicas sobre las

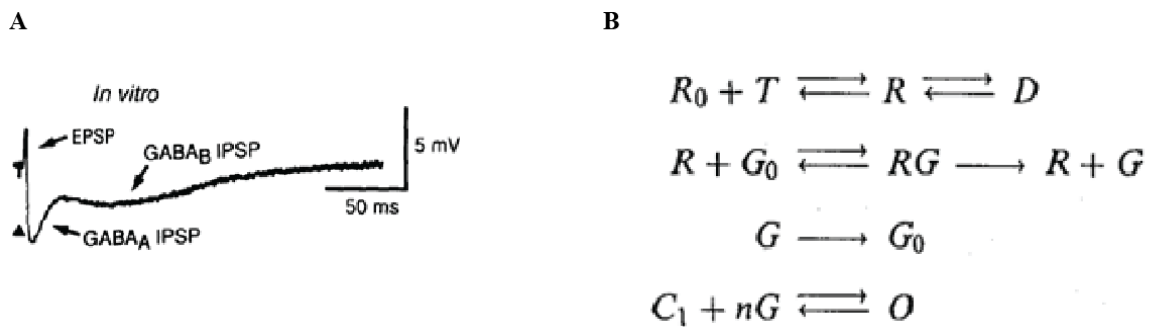
neuronas TC como un posible mecanismo sincronizador de la respuesta de estas neuronas. Sin embargo, en estos modelos no se ha estudiado en detalle cómo podrían impactar en los procesos de sincronización del circuito, la variedad de conductancias sub-umbrales que las neuronas TC expresan <sup>17</sup>. Por otra parte, la interacción del input nRT con el Vm de las neuronas TC ha sido también estudiado en registros *in vitro*; donde se ha demostrado que la sobre-expresión de receptores GABA<sub>B</sub> como consecuencia del bloqueo de rGABA<sub>A</sub> generan en las neuronas TC oscilaciones en su voltaje de membrana con una frecuencia que asemeja a la frecuencia de los SWD <sup>61</sup>. Siguiendo esta línea el objetivo de esta sección fue estudiar cómo impacta la fisiología de las neuronas TC en los procesos de sincronización que se dan en el circuito talamocortical cuando hay una sobre-expresión de rGABA<sub>B</sub>, para esto usamos el modelo de 3 compartimientos con entradas sinápticas realistas que han sido relacionadas con la generación de oscilaciones patológicas <sup>49</sup>. Especialmente estudiamos cómo el empleo de diferentes distribuciones estadísticas (con igual valor medio) que simulan la distribución temporal de las entradas sinápticas de las neuronas nRT hacia las neuronas TC encarrilan la respuesta en voltaje de estas últimas (*entrainment*); y cómo este efecto está modulado por las características fisiológicas de las corrientes iónicas de las neuronas TC.

#### 4.4.1 Métodos

Incluimos en el modelo anterior (Fig. 4.12) la presencia de receptores GABA<sub>B</sub> (rGABA<sub>B</sub>) en el compartimiento proximal, de tal forma que la entrada sináptica proveniente del nRT pudo activar también estos receptores. Los rGABA<sub>B</sub> son del tipo metabotrópico; la unión del neurotransmisor GABA con este receptor genera la activación de una proteína G que a su vez activa un canal Kir<sup>133</sup>; la corriente de potasio que circula por este canal hiperpolariza el Vm generando el característico IPSP, cuya cinética lenta lo diferencia de los IPSP producto de la apertura de los rGABA<sub>A</sub> (Fig. 4.17A).

La activación de los rGABA<sub>B</sub> es más compleja que los receptores simulados anteriormente, un esquema que describe su proceso se puede ver en la figura 4.17B; donde la unión del neurotransmisor [T] activa el receptor GABA<sub>B</sub> llevándolo del estado inactivo Ro al activo R y, al estado desensibilizado D. Además, el receptor activo R puede unirse a una proteína G<sub>0</sub> con n sitios independientes de unión y catalizar su transformación de inactiva a activa (G<sub>0</sub>→ G), la cual posteriormente puede unirse a un canal iónico y cambiar su estado

de cerrado C a abierto O. Un modelo simplificado de este proceso donde no se incluye el estado D, puede verse en las ecuaciones (4.10; 4.11 y 4.12); la variable  $r$  al igual que en la (ecuación 4.5) representa la fracción de receptores activados, donde  $K1= 0.52$  1/ms mM y  $K2= 0.02$  1/mseg son constantes que involucran la interacción del neurotransmisor con el receptor;  $K3= 0.098$  1/ms y  $K4= 0.033$  1/ms son las constantes relacionadas a la producción y decaimiento de G;  $K5=100$   $\mu$ M4 es la constante de disociación de la proteína G y el canal iónico; por último  $n=4$  representa los sitios de unión de G sobre el canal de K; todos los parámetros antes mencionados fueron extraídos de <sup>62</sup>. La corriente  $IGABA_B$  se introdujo en la ecuación correspondiente al voltaje de la dendrita proximal (ecuación 4.2); el valor de conductancia  $\bar{g}GABA_B=1$ nS fue ajustado en el modelo hasta reproducir resultados experimentales publicados en <sup>134</sup>; por último,  $EGABA_B= -100$ mV representa el potencial de reversión del potasio.



**Figura 4.17. Características de la activación de rGABAB.** (A) Potenciales post-sinápticos registrados *in vitro* sobre una neurona TC del núcleo geniculado lateral; con un Vm clampeado a -60mV; donde se muestra la dependencia temporal del IPSP (generado por la lenta activación de rGABA<sub>B</sub>) respecto al EPSP e IPSPs generados por rAMPA y rGABA<sub>A</sub> respectivamente. Figura modificada de <sup>133</sup>. (B) Esquema de activación del rGABA<sub>B</sub>, donde (T) representa el neurotransmisor (en este caso GABA) que se une al receptor (R<sub>0</sub>) y lo lleva a su forma activo (R); el cuál puede entrar a un estado desensibilizado (D) o unirse a una proteína G en su forma inactiva (G<sub>0</sub>) y activarla (G). Por último G activada puede unirse al canal de potasio que se encuentra cerrado (C<sub>1</sub>) y llevarlo a su estado abierto (O). Figura extraída de <sup>62</sup>



$$\frac{dr_{(GABA_B)}}{dt} = K_1[T_{(GABA_B)}](1 - r_{(GABA_B)}) - K_2r_{(GABA_B)} \quad (4.10)$$

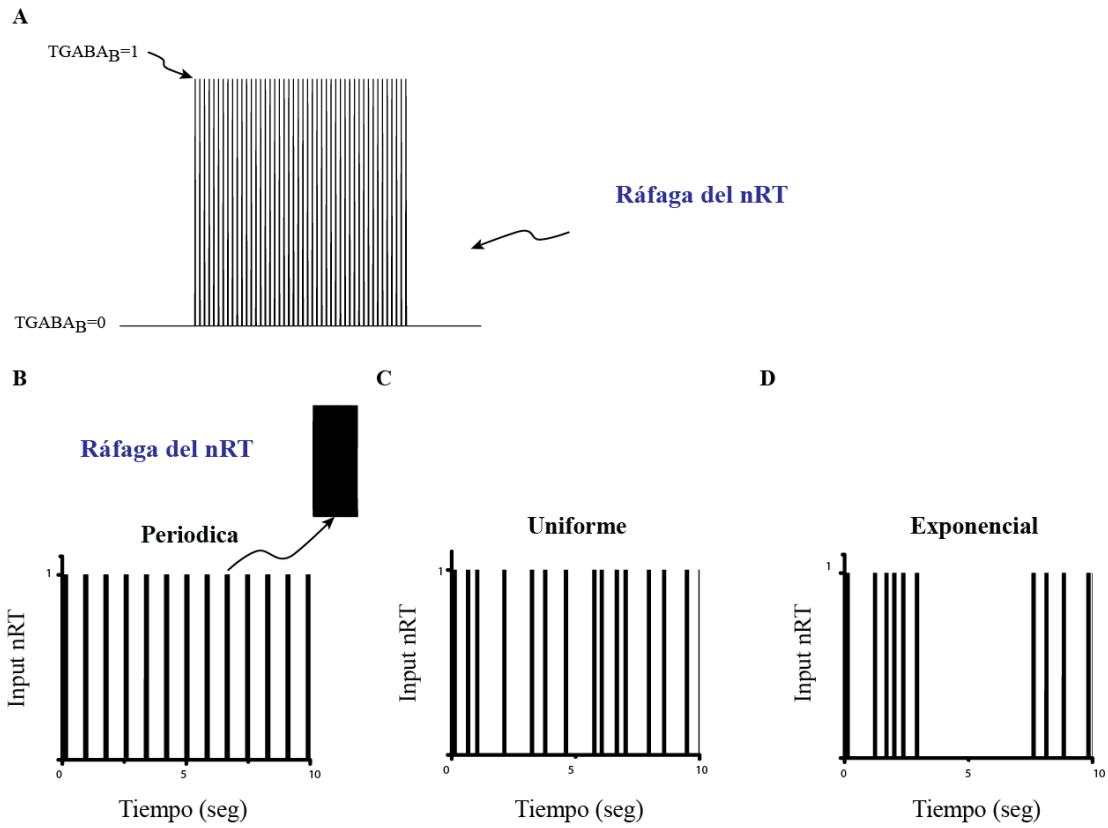
$$\frac{dG}{dt} = K_3r_{(GABA_B)} - K_4G \quad (4.11)$$

$$I_{(GABA_B)} = g_{(GABA_B)} \frac{G^n}{G^n + K_5} (V - E_{(GABA_B)}) \quad (4.12)$$

A diferencia de la activación de los receptores GABA<sub>A</sub>, los rGABA<sub>B</sub> necesitan una alta estimulación pre-sináptica para activarse<sup>62,131,135</sup>. La activación de receptores GABA, y por ende la respuesta generada en las neuronas TC, depende del modo de disparo de las neuronas del nRT, las cuales pueden producir disparos de potenciales de acción de forma tónica o generar ráfagas<sup>136</sup>; ante los modos de disparo tónico o ráfagas con baja frecuencia de potenciales de acción, la entrada sináptica del nRT induce solo la activación de receptores del tipo GABA<sub>A</sub><sup>134</sup>; por otra parte, ráfagas con alta frecuencia de potenciales de acción producen la activación de ambos rGABA<sub>A</sub> y rGABA<sub>B</sub><sup>134</sup>. Para recrear el input de ráfagas repetitivas con alta frecuencia de potenciales de acción proveniente del nRT, simulamos a [T<sub>GABAB</sub>] como pulsos de altura igual a 1 que aparecen en paquetes de altas frecuencias seguidos de silencios en donde [T<sub>GABAB</sub>] vale 0, tal como se muestra en la figura 4.18A. El protocolo de estimulación con una ráfaga de 100ms de duración y una frecuencia de 200Hz, nos permitió activar el rGABA<sub>B</sub> en el modelo y poder ajustar el valor de la conductancia  $\bar{g}_{GABA_B}=1nS$  requerido para reproducir la amplitud del IPSP<sup>134</sup>.

Las neuronas del nRT poseen conexiones sinápticas entre sí mediadas por receptores del tipo GABA<sub>A</sub> (ver Capítulo 1); el bloqueo de estos receptores con bicuculina elimina la inhibición que las neuronas del nRT ejercen sobre si mismas lo que desencadena una respuesta robusta del nRT hacia las neuronas TC<sup>61,134</sup>. Las ráfagas que se generan en ausencia de rGABA<sub>A</sub> en el nRTson temporalmente más anchas y tienen montados un gran número de potenciales de acción a altas frecuencias, respecto a las ráfagas fisiológicas<sup>61,134</sup>.

Para representar este comportamiento con el modelo recreamos esas ráfagas anchas de alta frecuencia fijando el protocolo de estimulación de  $[TGABA_B]$  de la figura 4.18A; con un ancho temporal de la ráfaga (db) a 150ms y la frecuencia de potenciales de acción a 300Hz. La frecuencia de las ráfagas que arriban a las neuronas TC y activan los receptores GABA es desconocida ya que no conocemos cuántas neuronas del nRT conectan a una misma neurona TC; por otra parte, las neuronas TC también conectan al nRT (ver conexiones del CTC en Capítulo 1) reclutando la activación de más neuronas del nRT. Debido a esto creamos tres protocolos diferentes de estimulación para simular el input del nRT, con una separación temporal entre ráfagas que siguió diferentes distribuciones estadísticas, ver figura 4.18B.



**Figura 4.18. Simulación del input del nRT.** Representación de las ráfagas del nRT en el modelo que estimulan los receptores GABA sobre las neuronas TC postsinápticas. (A) el neurotransmisor  $T_{GABAB}$  alterna entre 1 y 0 con una frecuencia de 300Hz durante una ráfaga; cuya duración temporal fue de 150mseg. (B-D) Diferentes distribuciones temporales con igual valor medio (500ms), para fijar la frecuencia de las ráfagas repetitivas: (B) distribución periódica (donde se amplía una ráfaga, similar a la de (A)); (C) distribución uniforme y (D)

Tal como se mencionó antes, la situación experimental que buscamos reproducir tiene en cuenta el bloqueo de rGABA<sub>A</sub>; y ya que estos receptores se expresan tanto en las neuronas del nRT como en las TC; consideramos en el modelo  $\bar{g}_{GABAA}=0$  para todas las simulaciones de esta sección. En esta parte del modelo sólo se contemplaron los inputs sinápticos AMPA y GABA<sub>B</sub>. Los parámetros para simular rAMPA fueron los del modelo parte dos, fijando para todas las simulaciones un  $f_{AMPA}=10\text{Hz}$ ; ya que para este valor la combinación de EPSPs con una alta estimulación de IPSP fue suficiente para producir ráfagas repetitivas de forma robusta en el modelo TC (ver Fig.4.15B). Todas las simulaciones fueron realizadas a un potencial de membrana de  $-65\text{mV}$ ; para esto se inyectó una corriente externa en el soma cuyo valor fue variando dependiendo de las modificaciones en las propiedades intrínsecas del modelo; de tal forma de mantener el  $V_m$  fijo siempre en  $-65\text{mV}$ .

Para evaluar la interacción entre los diferentes inputs del nRT y el voltaje de membrana de las neuronas TC utilizamos la correlación cruzada entre ambas señales; el programa para realizarla se implementó en Matlab.

### ***Propiedades intrínsecas***

Para mayor detalle del modelo, ver apéndice AII donde se muestra el algoritmo completo del modelo. En esta parte sólo mostramos cómo se varió la cinética de activación de  $I_h$  ( $\tau_{mh}$ ); la cual se implementó para simular distintas condiciones en esta sección.

En la plataforma de simulación NEURON se implementó el modelo monocompartimental con las siete conductancias sub-umbrales en sus valores default a un  $V_m$  de  $-65\text{mV}$ . Para modificar la dependencia temporal de la variable de activación ( $\tau_{mh}$ ) se modificó la temperatura de simulación. Es sabido que la cinética de las corrientes iónicas depende de la temperatura de registro o en este caso de simulación; para el caso de la corriente  $I_h$ , ésta fue medida experimentalmente bajo una temperatura de registro de  $34^\circ\text{C}$ ; valor que está contemplado en el modelo y que se utiliza para simular esta corriente<sup>24</sup>; esta temperatura es la *default* para  $I_h$  en el modelo y nos da un  $\tau_{mh}=389.29\text{ms}$  medido en el estado estacionario. Luego para  $50^\circ\text{C}$  obtuvimos un  $\tau_{mh}=42.36\text{ms}$ , para  $45^\circ\text{C}$  un  $\tau_{mh}=84.73\text{ms}$ ; para  $40^\circ\text{C}$  un  $\tau_{mh}=169.45\text{ms}$  y por último para  $38^\circ\text{C}$  un  $\tau_{mh}=223.6\text{ms}$ . Además, con

NEURON evaluamos las curvas  $\tau_{mh}$  versus voltaje (similares a la Fig. 1.2C) para contrastar que las diferentes cinéticas estuvieran dentro de un rango fisiológico; encontramos que estos valores de  $\tau_{mh}$  comprenden rangos acordes a la cinética de activación que presentan las diferentes subfamilias de canales HCN que se conocen (HCN1, HCN2, HCN3 y HCN4)<sup>102</sup>. Los diferentes  $\tau_{mh}$  se implementaron fácilmente en nuestro modelo, modificando sólo la dependencia de temperatura de la corriente  $h$  y dejando el resto de las corrientes a la temperatura default de 34°C.

### *Test estadístico*

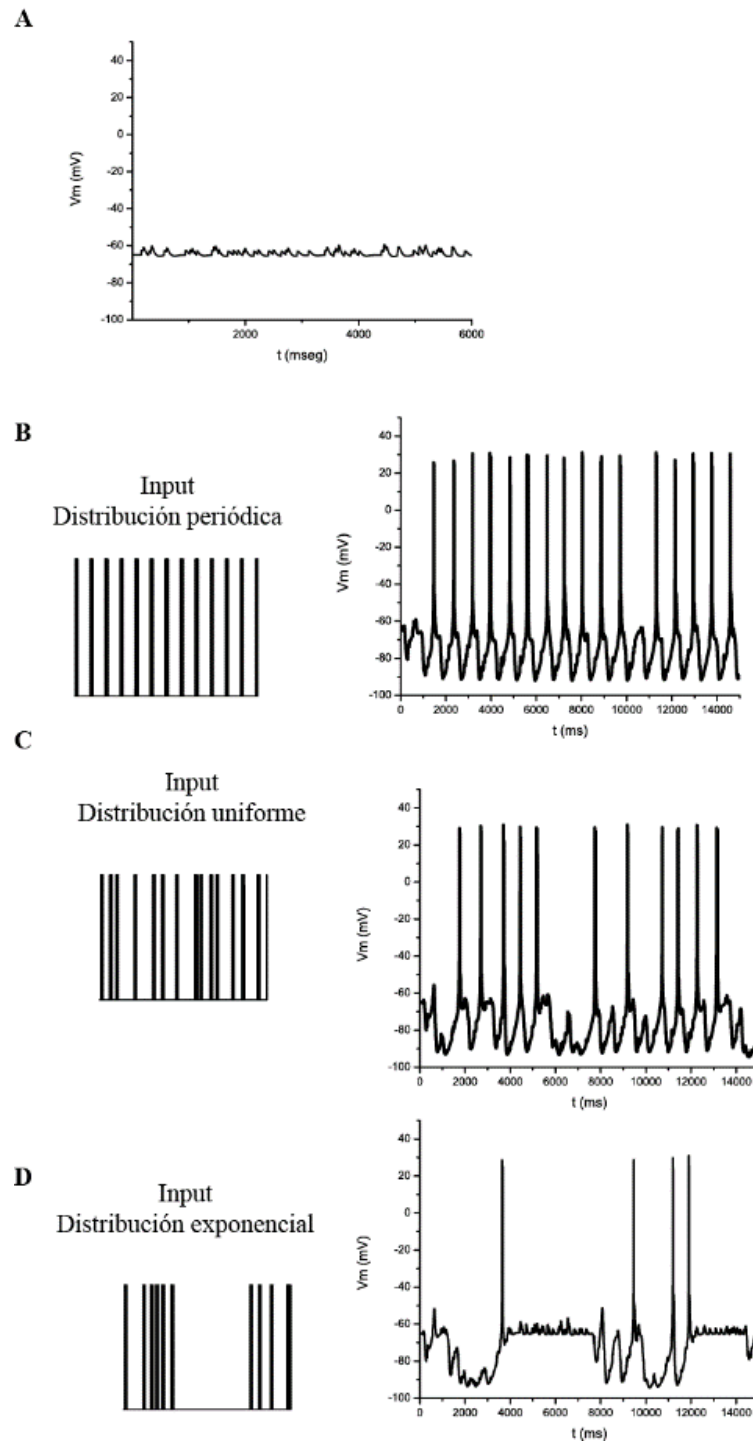
Los resultados promediados se expresan como valor medio  $\pm$  desviación estándar. Para la significancia estadística se utilizó la prueba  $t$  de Student con  $\alpha < 0,05$  como criterio de significancia.

La población de modelos a las que se le aplica el test de significancia estadística, son generados modificando la semilla del generador de números aleatorios que en esta sección está enlazado a la activación del rAMPA.

### **4.4.2 Resultados**

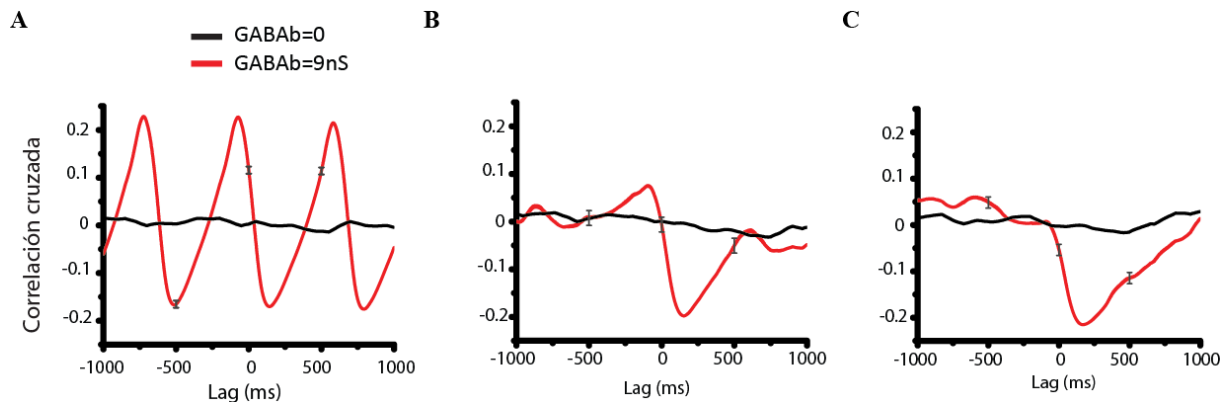
Para estudiar si la activación de los receptores GABA<sub>B</sub>, como consecuencia del input sináptico proveniente del nRT, tiene la habilidad de encarrilar la respuesta en voltaje de las neuronas TC, estimulamos el modelo con los diferentes inputs nRT y medimos su correlación cruzada con la respuesta  $V_m$  del modelo. Recordar que cada uno de estos tres inputs representa una ráfaga de 150 ms con una frecuencia de  $T_{GABAB=1}$  de 300Hz (Fig. 4.18A); pero difiere en los intervalos entre ráfagas (dib), donde la distribución periódica como su nombre lo indica sigue un dib periódico de 500ms, lo que equivale a ráfagas repetitivas con una frecuencia de 1.5Hz (Fig. 4.18B). Al contrario, los inputs de las Fig. 4.18C y 4.18D presentan dib que siguen una distribución uniforme y una distribución exponencial, respectivamente; ambas con un valor medio de 500ms. Para  $\bar{g}_{GABAB}=0$  el modelo se estableció en un  $V_m$  en reposo de -65mV, sin producir ráfagas, pero presentando pequeñas fluctuaciones que se deben al input sináptico AMPA (Fig. 4.19A). Por el contrario, la aplicación de los inputs sinápticos del nRT; cuando  $\bar{g}_{GABAB} \neq 0$  generaron diferentes

comportamientos del  $V_m$ ; la respuesta en voltaje del modelo cambia de acuerdo a la distribución temporal que se use, ya sea periódica (Fig. 4.19B), uniforme (Fig. 4.19C) o exponencial (Fig. 4.19D).



**Figura 4.19.** Respuesta en voltaje del modelo ante diferentes características en la estimulación sináptica. Modelo default con un  $V_m = -65$  mV establecido con una  $I = 0.0358$  nA, con  $f_{\text{AMPA}} = 10$  Hz. Para  $\bar{g}_{\text{GABAB}} = 0$  (A);  $\bar{g}_{\text{GABAB}} = 9$  nS con distribución periódica (B); con distribución uniforme (C) y con distribución exponencial (D).

Tal como se mencionó en la sección métodos, usamos la correlación cruzada (crc) entre el input nRT (Fig.4.19B, C y D panel izquierdo) y la respectiva respuesta en voltaje del modelo (Fig.4.19B, C y D panel derecho), para estudiar si la activación de los receptores GABA<sub>B</sub> producto de las entradas pre-sinápticas proveniente de las neuronas nRT es un mecanismo que “sincroniza” el V<sub>m</sub> del modelo. Primero, calculamos la correlación cruzada para la condición  $\bar{g}_{GABAB}=0$ ; y como era de esperarse no hubo una correlación entre el input nRTy la respuesta del modelo para los tres casos tratados (ver trazos negros en Fig. 4.20A, B y C); por el contrario, cuando  $\bar{g}_{GABAB}$  fue distinto de cero la crc presentó un pico de correlación entre ambas señales para los tres inputs (trazos rojos, Fig. 4.20A, B y C).



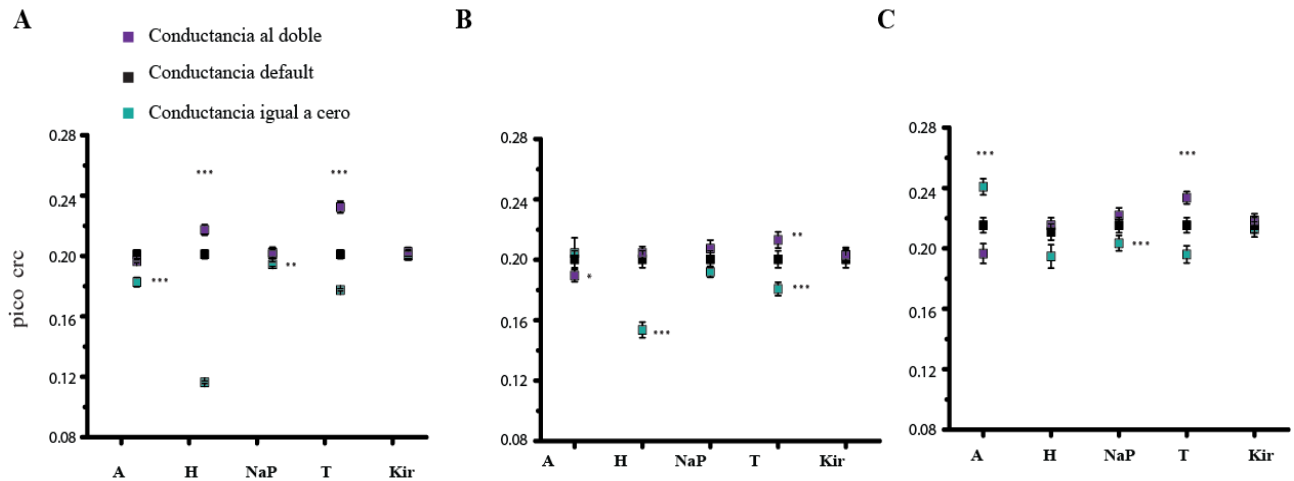
**Figura 4.20. Correlación cruzada inputs nRt versus V<sub>m</sub>.** Partiendo del modelo default (Fig. 4.19B, C y D) se calculó la crc entre el input nRT y la respuesta en V<sub>m</sub> para: distribución periódica con  $\bar{g}_{GABAB}=0$  (negro) y  $\bar{g}_{GABAB}=9$  (rojo) (A); similar para una distribución uniforme (B); y, similar para una distribución exponencial (C). Lag=0 representa el momento donde se comienza a activar el  $r_{GABAB}$  y el pico negativo (el primer pico negativo a la derecha de lag cero en el caso de la distribución periodica) de la crc representa el máximo de la correlación cruzada; cuya dependencia temporal equivale a la dependencia temporal de la activación del  $r_{GABA_B}$ .

El valor de conductancia  $\bar{g}_{GABAB}$  de nuestro modelo que reproduce la respuesta experimental en un contexto fisiológico es de 1nS (ver métodos); y si bien este valor fue



suficiente para generar un pico en la correlación cruzada entre el input sináptico  $nRt$  y la respectiva respuesta en voltaje del modelo; empleamos un mayor valor en la conductancia máxima de  $GABA_B$  (igual a  $9nS$ ). Este valor fue elegido para modelar la situación donde hay una sobre-expresión de la activación de  $rGABA_B$  y fue usado para todas las simulaciones de esta sección.

Una vez que encontramos que los inputs del  $nRt$  tienen una correlación con la respuesta en voltaje del modelo de neurona TC, estudiamos cómo las propiedades intrínsecas de este modelo afectan la correlación; para esto repetimos el experimento de la figura 4.20, pero variando las conductancias sub-umbrales del modelo (aumentándolas al doble de su valor default, dejándolas en su valor default o haciendo su conductancia igual a cero); la figura 4.21 muestra los resultados de estas simulaciones, donde cada punto de la gráfica representa el pico máximo de  $crc$  para cada condición. Para la distribución periódica encontramos que el aumento de  $I_h$  e  $I_T$  incrementa la correlación entre las señales; y su ausencia, al igual que la ausencia de  $I_A$  o  $I_{NaP}$ , disminuyen el pico de  $crc$  (Fig. 4.21A). No obstante, encontramos que la ausencia de  $I_h$  tiene un fuerte impacto en el pico máximo de la  $crc$ , donde no sólo lo disminuye, sino que prácticamente elimina la correlación entre ambas señales (ver efecto  $I_h=0$  en la figura). Para el caso de la distribución uniforme encontramos que el aumento de  $I_T$  produjo un incremento significativo de la  $crc$  y, por otro lado, su eliminación o la eliminación  $I_h$  disminuyeron la  $crc$ , a diferencia de la distribución anterior el aumento de  $I_A$  produjo una disminución en la  $crc$ ; además, al igual que para la distribución anterior el efecto de la ausencia de  $I_h$  fue el más predominante (Fig. 4.21B). Por último, para la distribución exponencial se obtuvo que para la condición de  $I_A$  igual cero o  $I_T$  aumentada al doble, el pico de la  $crc$  se incrementó y, al contrario, la eliminación individual de  $I_T$  o el aumento de  $I_A$ , disminuyeron el pico de la  $crc$ ; esto mismo ocurrió para la condición de  $I_{NaP}=0$ .



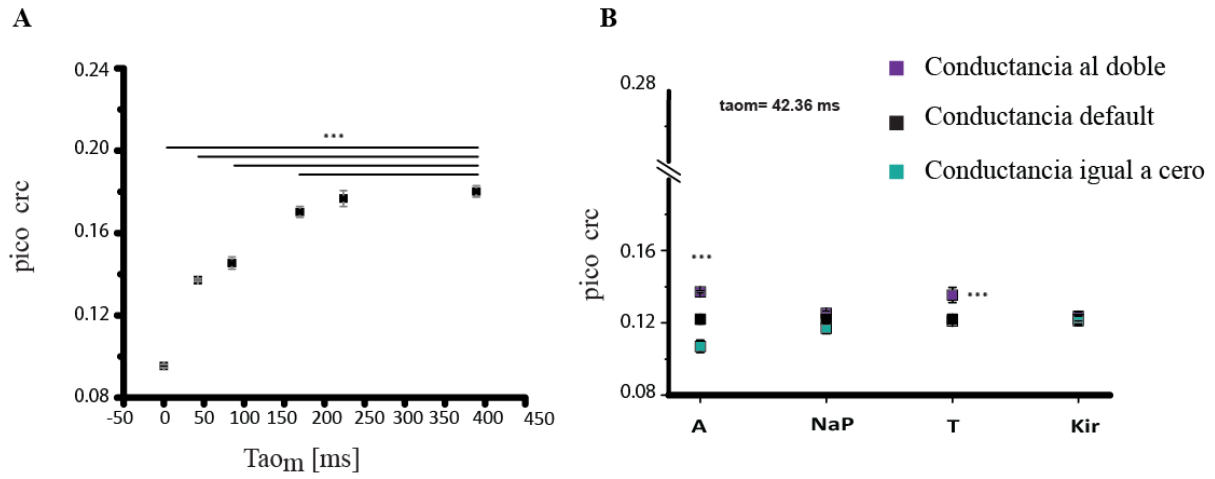
**Figura 4.21. Impacto de las propiedades intrínsecas del modelo sobre el pico de crc.** Picos máximos de crc para el modelo default (cuadrados negros) y para cambios individuales en los valores de conductancias máximas de las corrientes ( $I_A$ ,  $I_h$ ,  $I_{NaP}$ ,  $I_T$  e  $I_{Kir}$ ); ya sean aumentos al doble de su valor default (cuadrados violetas) o condición de conductancia igual cero (cuadrados turquesas). Para: (A) D. periódica; (B) D. uniforme y (C) D. exponencial. Para cada cambio individual en  $\bar{g}$  se reestableció el  $V_m$  de  $-65\text{mV}$  en el modelo, mediante una inyección de corriente positiva o negativa, dependiendo del caso.

A excepción de  $I_{Kir}$ , el resto de las conductancias sub-umbrales tuvo un impacto en la correlación, ya sea con un aumento o una disminución. Además,  $I_h=0$  disminuyó fuertemente la correlación entre el input nRT y el  $V_m$ , sin importar la presencia de las demás conductancias, siendo su efecto dependiente de la distribución temporal del input nRT; con un mayor impacto para la distribución periódica, un efecto intermedio en la distribución uniforme y ninguno en la distribución exponencial (comparar efecto  $I_h=0$  en Fig.4.22 A y B con C).

Dado que la correlación entre el input del nRT (ya sea periódico o uniforme) y el  $V_m$  dependen de la presencia de  $I_h$ , decidimos estudiar si este efecto es debido a la cinética de

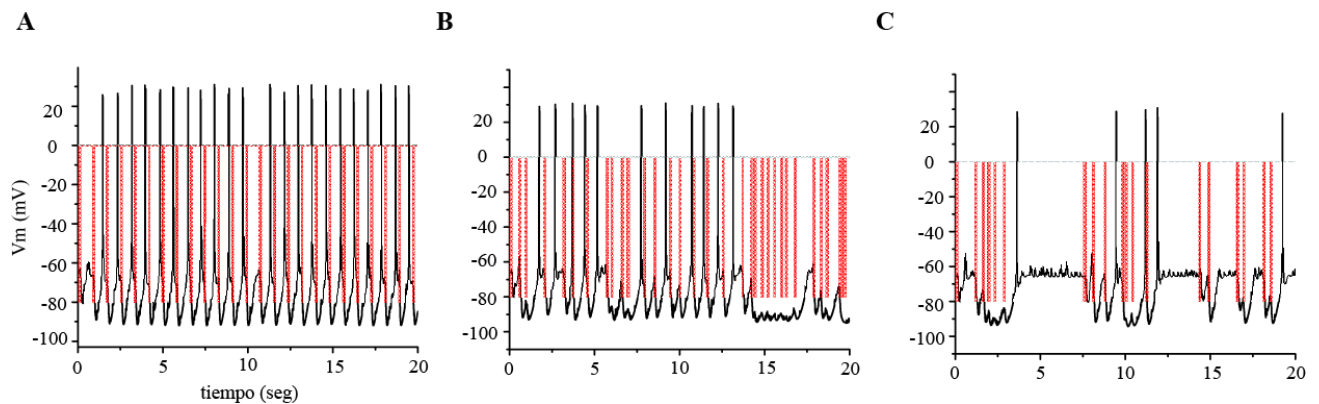
activación de esta corriente. Para esto modificamos la dependencia temporal de su variable de activación, es decir su  $\tau_{mh}$ ; de tal forma de obtener corrientes  $h$  con diferentes cinéticas de activación. En la figura 4.22A se muestran los resultados de este análisis, donde se graficaron los máximos de la correlación cruzada para el input del nRT con distribución periódica (ya que fue la distribución que tuvo el mayor impacto) y la respuesta en voltaje de los diferentes modelos con las conductancias máximas en sus valores default, a excepción de los cambios en la cinética de activación de  $I_h$ ; cada punto en la gráfica equivale a un modelo con un  $\tau_{mh}$  diferente, medido en el estado estacionario (ver métodos). Un  $\tau_{mh}$  de 389.29ms representa el valor fisiológico de la corriente  $h$  en el modelo default, cuyo pico de crc se corresponde al pico de la figura 4.20A. A medida que la activación de  $I_h$  se fue haciendo cada vez más rápida el máximo de la crc fue decayendo y acercándose al valor de crc que se corresponde con la condición de  $I_h=0$ .

Utilizando el valor de  $\tau_{mh}=42.36ms$  para simular la cinética de activación de  $I_h$ , que se corresponde al valor más cercano a la condición  $I_h=0$ , realizamos un nuevo estudio del impacto de las propiedades intrínsecas del modelo sobre la correlación entre el input nRT y el  $V_m$  para la distribución periódica. Los resultados se muestran en la figura 4.22B, donde puede verse que el cambio en la cinética de activación de  $I_h$  influyó de forma sinérgica sobre las demás conductancias; y si bien hay cambios significativos con la modificación de  $I_A$  o de  $I_T$  en los picos de crc; toda la correlación cruzada entre ambas señales decayó (comparar Fig.4.22B con Fig.4.21A).



**Figura 4.22. Impacto de la cinética de activación de  $I_h$  en la crc.** (A) Picos máximos de la crc para el modelo *default* pero con diferentes cinéticas de activación de  $I_h$ ; cada punto en la gráfica representa el pico máximo de la crc para cada modelo *default* con un  $\tau_{mh}$  diferente. (B) Impacto de las conductancias sub-umbrales en la crc de un modelo con las  $\bar{g}$  en sus valores *default* a excepción de la cinética de activación de  $I_h$  que pasó de un valor de  $\tau_{mh}=389.29\text{ms}$  a  $\tau_{mh}=42.36\text{ms}$ .

Por último, analizamos por qué el impacto de  $I_h$  en la crc es dependiente de la distribución temporal con que se simulan las ráfagas del nRT. Para esto primero comparamos la respuesta en voltaje del modelo con su respectivo input nRT, ver figura 4.23 donde se muestran las tres respuestas en voltaje (trazos negros) superpuestas con sus inputs nRT re-escalados e invertido (trazos rojos) para el modelo neuronal default. Como puede verse en la figura para las condiciones de distribución periódica y uniforme las ráfagas del nRT son antecedidas por una ráfaga en el modelo; donde para la distribución periódica siempre se antecedió una ráfaga TC a la ráfaga del nRT (Fig.4.23A); y con menor frecuencia ocurrió para la distribución uniforme (Fig.4.23B). Al contrario, el  $V_m$  estimulado con la distribución exponencial fue mayormente antecedido por periodos de no actividad, ubicados a un  $V_m$  que se corresponde al reposo del modelo (-65mV). Este comportamiento explica la presencia de un pico positivo en la crc que antecede la activación de  $rGABA_B$ , el cuál fue más marcado para la distribución periódica que para la uniforme, y no estuvo presente en la distribución exponencial (ver Fig.4.20).



**Figura 4.23.  $V_m$  versus input nRT.** Curso temporal de la respuesta en voltaje del modelo default (trazos negros, similar a Fig. 4.19) con los diferentes estímulos del nRT superpuestos y re-escalados por un factor de -80mV (trazos rojos). (A) D. periódica; (B) D. uniforme y (C) D. exponencial.

Si la presencia de una ráfaga de rebote previo a la siguiente ráfaga del nRT es el mecanismo que enlaza la activación de  $I_h$  con la correlación presente entre el input nRT y el  $V_m$ , para las distribuciones periódicas e uniforme; este efecto debería desaparecer si se elimina la relación temporal entre la ráfaga de rebote,  $I_h$  y la activación de  $rGABA_B$ . Para lograr esto se aumentó el valor medio de ambas distribuciones temporales. Encontramos que un valor de 800ms fue suficiente para eliminar el efecto de  $I_h$  sobre la crc cuando se usó la distribución uniforme para el estímulo nRT; donde la ausencia de  $I_h$  en el modelo no tuvo un impacto significativo en la correlación cruzada (pico crc =  $0.184 \pm 0.015$  y pico crc =  $0.183 \pm 0.013$ ;  $n = 4$  para control y  $I_h=0$  respectivamente;  $p = 0.59$ ); además de producirse la eliminación del pico positivo que precede la activación del receptor  $GABA_B$ . Por otro lado, aumentar el valor medio de la distribución periódica a 800ms, lo que equivale directamente a disminuir la frecuencia de las ráfagas del nRt a 1.05Hz, produjo que la ausencia de  $I_h$  aún generara una disminución significativa en el pico máximo de la crc, respecto a su valor control (pico crc =  $0.2015 \pm 0.0007$  y pico crc =  $0.1938 \pm 0.002$ ;  $n = 4$  para control y  $I_h=0$  respectivamente;  $p = 0.0037$ ); pero con un efecto mínimo en la crc, cuando se lo compara con el efecto causado cuando el input nRT fue de un valor medio de 500ms. Esto estuvo acompañado de la presencia del hombro positivo en la crc, pero ubicado temporalmente hacia Lag más negativos; lo que podría estar relacionado con el cambio en la interacción de  $I_h$  y la crc.

#### 4.4.3 Discusión

Como se mencionó en el Capítulo 1 y previamente en este mismo capítulo, las oscilaciones fisiológicas del circuito talamocortical han sido asociadas a la generación de ritmos globales, ya sean fisiológicos como las ondas delta y los spindles, o patológicos como los SWD. Estudiando los mecanismos celulares que producen sincronización de las oscilaciones en el tálamo se encontró que el bloqueo de  $rGABA_A$  genera en las neuronas TC grandes hiperpolarizaciones del  $V_m$ , con la presencia de oscilaciones a bajas frecuencias alrededor de 2 a 4Hz, cuya frecuencia asemeja los SWD que aparecen en el EEG durante las crisis epilépticas <sup>61</sup>. Dado que estas oscilaciones de membrana en las neuronas TC son eliminadas con bloqueadores específicos de  $rGABA_B$ ; se ha puesto énfasis en la posible

capacidad sincronizante de estos receptores <sup>61,134</sup>. Además, en un modelo genético de epilepsia de ausencia (ratas GAER, ref) se encontró que la inyección *in vivo* de agonistas de rGABA<sub>B</sub> (ya sea por inyección intra-peritoneal o focalizada al tálamo) inducen oscilaciones similares a los SWD, o un agravamiento de los SWD pre-existentes; y, por otro lado, inyecciones de antagonistas de rGABA<sub>B</sub> disminuyen los SWD <sup>137</sup>.

Dentro del contexto antes mencionado, en nuestro estudio pretendimos abordar cómo las propiedades intrínsecas de las neuronas TC influyen en estas oscilaciones que involucran la sobre-expresión de rGABA<sub>B</sub>; tan relevantes para los procesos de sincronización en el circuito talamocortical. Para esto empleamos el modelo de tres compartimientos con inputs que simularan esta condición experimental; por un lado, planteamos la estimulación sináptica AMPA como un ruido sináptico y por el otro, simulamos el input del nRT como ráfagas repetitivas con características que representan las ráfagas *in vitro* en ausencia de rGABA<sub>A</sub> en la rodaja talámica <sup>134</sup>, con una dependencia temporal entre ráfagas que siguió diferentes distribuciones estadísticas (periódico, uniforme y exponencial). Bajo estas condiciones estudiamos la capacidad de los diferentes inputs del nRT de encarrilar la respuesta en voltaje del modelo TC, en presencia de ruido sináptico AMPA. Encontramos que la activación de rGABA<sub>B</sub>, como consecuencia del input nRT encarrila la respuesta en voltaje del modelo para las tres condiciones de inputs nRT; siendo este efecto similar para las tres condiciones simuladas (ver Fig 4.20).

La correlación entre los diferentes inputs nRT y el voltaje de membrana se da por una dependencia temporal entre estos inputs simulados y la activación del receptor GABA<sub>B</sub>; lo que lleva a que el V<sub>m</sub> del modelo se encarrile con el input sináptico. Además, este *entrainment* está fuertemente ligado a la dependencia temporal de la activación de I<sub>h</sub>; pero sólo para las distribuciones temporales periódica y uniforme con que se simulan los inputs nRT (Fig. 4.20). Estudiando por qué I<sub>h</sub> aumenta la crc en ambas situaciones, encontramos que la presencia de un hombro positivo a valores de Lag negativos, que se corresponden con los tiempos previos a la activación del rGABA<sub>B</sub>, está relacionado con el impacto causado por I<sub>h</sub>; lo que también explicaría por qué este efecto no está presente para la distribución exponencial. Primero analizamos a que se debía la presencia del hombro positivo en la crc

para estas distribuciones temporales, y encontramos que está dado por una ráfaga de rebote en el modelo TC que antecede temporalmente a las ráfagas que simulan el input proveniente del nRT (Fig. 4.23). Para modificar esta dependencia temporal entre la ráfaga de rebote y el input nRT simulamos las distribuciones periódicas y uniforme con un valor medio mayor (800ms). Para esta nueva condición de simulación encontramos que efectivamente el efecto de  $I_h$  desaparece en la distribución uniforme, además de desaparecer el hombro positivo. Una situación menos directa ocurrió para la distribución periódica, ya que para este tipo de estimulación la presencia de ráfagas en el  $V_m$  del modelo es mucho más marcada (Fig. 4.23A); por tal motivo, no ocurrió la desaparición del hombro positivo, pero si hubo un corrimiento de este a valores de Lag más negativos. Acompañando este corrimiento temporal, la ausencia de  $I_h$  en el modelo no tuvo un fuerte impacto en el pico de la crc, como había ocurrido para la condición de 500ms. Nosotros especulamos que  $I_h$  tiene un fuerte impacto cuando está presente el hombro positivo porque la activación subsecuente del rGABA<sub>B</sub> coincide con valores muy despolarizados del  $V_m$ , donde  $I_h$  está totalmente desactivada, por lo que la hiperpolarización causada por los IPSPs logra activar un mayor porcentaje de canales h. Al contrario, cómo ocurre para la distribución exponencial donde no hay efecto de  $I_h$ , la activación de rGABA<sub>B</sub> se produce en un  $V_m$  menos despolarizado (-65mV, ver Fig. 4.23C); a estos  $V_m$  hay canales h abiertos de forma tónica<sup>17,104</sup>, por lo que la hiperpolarización inducida por la activación de rGABA<sub>B</sub> que subsecuentemente induce la activación de  $I_h$ , se da en un  $V_m$  donde hay una fracción de canales h ya activos; esto podría provocar un menor reclutamiento de la corriente  $I_h$  y podría ser el efecto que se produce para las condiciones donde no está presente el hombro positivo.

Por último, cabe aclarar por qué hablamos directamente de *entrainment*, y no de sincronización entre el input nRT y la respuesta en voltaje del modelo; esto es porque ambas estructuras presentan conexiones recurrentes entre sí (ver Fig. 4.11) que no están contempladas en nuestro modelo, por lo que no sabemos cómo la respuesta del  $V_m$  del modelo TC podría estar afectando el input sináptico proveniente del nRT e interfiriendo en la sincronización de ambas estructuras.



## Capítulo 5

### Farmacodinamia de agentes anticonvulsivantes en neuronas talamocorticales

#### 5.1 Introducción

La etosuximida (ETX) es el fármaco anti-convulsivante más utilizado en el tratamiento de la epilepsia de ausencia (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544244/>). También, la ETX elimina o disminuye considerablemente las crisis epilépticas en los modelos animales de epilepsia de ausencia<sup>70,137,138</sup>. Dada la coincidencia terapéutica de la ETX en humanos y los modelos animales, a estos últimos se ha estudiado el efecto de esta droga a nivel celular; sin embargo, aún en día hay controversias respecto a la acción de la ETX a este nivel. Por un lado, se ha encontrado que la ETX, a concentraciones dentro del rango terapéutico (250 $\mu$ M-750 $\mu$ M), reduce la amplitud de la corriente de calcio de bajo umbral  $I_T$  en neuronas TC de los núcleos VB de rata y guinea pig en *whole-cell* registros; cuya reducción es dependiente de la concentración de ETX y del voltaje de membrana; pero independiente de la cinética y de las variables de *gating* del canal<sup>139</sup>. Además, se ha encontrado que la ETX tiene el mismo efecto sobre la  $I_T$  de las neuronas del nRT<sup>135</sup>; y al igual que en las neuronas TC este efecto es reversible. En este mismo estudio encuentran que la ETX no tiene un impacto significativo sobre la generación de ráfagas en ambas neuronas; al contrario, la reducción de  $I_T$  modifica el umbral de generación de LTSs, y produce un desfase temporal en la iniciación del modo de disparo en ráfagas respecto a la condición control en las neuronas del nRT. Por otro lado, registros electrosifiológicos en otros tipos de neuronas no mostraron reducción en la amplitud de  $I_T$  en presencia de concentraciones de ETX dentro del rango terapéutico<sup>140</sup>. Aunque en estos últimos estudios podría diferir el tipo de canal T que cada neurona expresa, se suma a la controversia el hecho de que los resultados mostrados en Coulter et al. 1989 y Huguenard et al. 1994 no pudieron ser reproducidos<sup>141</sup>. En este último estudio muestran que la ETX no tiene efecto sobre  $I_T$ ; pero reduce significativamente la corriente persistente de sodio  $I_{NaP}$  y la corriente de potasio activada por calcio  $I_K(Ca^{++})$  en neuronas TC registradas *in vitro* y además encuentran que las ráfagas en presencia de ETX presentaron menos potenciales de acción montados sobre los LTSs,

acompañados de una reducción en su frecuencia; presumiblemente debidos a la disminución de  $I_{NaP}$  <sup>141</sup>.

En resumen, ambos grupos hallan resultados controversiales respecto a las corrientes iónicas que se ven alteradas por la presencia de ETX en neuronas TC; pero si acuerdan que la reducción en la probabilidad de generar LTSs debido a esta droga, podría ser un mecanismo que disminuye la sincronización del circuito talámico que se presenta durante las crisis epilépticas <sup>141</sup>.

Además, se ha encontrado que la ETX inhibe la corriente Kir que fluye por los canales Kir2.1; expresados en oocitos <sup>142</sup>; pero a diferencia de los estudios mencionados previamente, la inhibición de los canales Kir2.1 es debido a un bloqueo intracelular del canal con ETX. Sin embargo, dado que las neuronas TC expresan canales de la subfamilia Kir2.X (mayoritariamente Kir2.2 <sup>17</sup>) se abre un interrogante respecto a si ETX puede o no tener un efecto sobre estos canales.

Dada la falta de consenso respecto al efecto de ETX en las neuronas TC, y sumado a que las evidencias de trabajos previos <sup>17,52,53</sup> indican que pequeños cambios en las conductancias sub-umbrales impactan en el comportamiento oscilatorio de estas neuronas; pretendimos abordar los estudios previos de <sup>135</sup> realizando una prueba piloto para estudiar si la presencia de ETX tiene un impacto sobre las neuronas TC de ratón; y de tenerlo, luego como segundo objetivo pretendimos utilizar la ventaja del empleo de bloqueadores específicos de los canales T, Kir y h para estudiar si alguna de estas conductancias sub-umbrales tan relevantes para el disparo en ráfagas, podía verse afectada por ETX, además de poder discernir la controversia alrededor de la corriente T.

## 5.2 Métodos

La preparación de las rodajas y la técnica de electrofisiología pueden verse en los métodos del capítulo 2. Para realizar el experimento con etosuximida, fármaco adquirido en Sigma Aldrich (San Luis, MO), directamente se diluyó esta droga a su concentración final dentro del fluido ACSF, que perfunde a la cámara de registro. Las concentraciones de ETX

estuvieron dentro del rango terapéutico (250 $\mu$ M-750 $\mu$ M). El protocolo de registros en modo *current clamp* fue un protocolo de pulsos cuadrados similar al expuesto en los métodos del capítulo 2. Para los registros en modo *voltage-clamp* se implementó un protocolo de rampa similar al usado en Amarillo et al 2014; el cual consistió en una rampa lenta de voltaje de 8mV/seg desde -100mV hasta -50mV.

Todos los registros fueron realizados a una temperatura de 28°C.

### ***Análisis de los datos***

Para la reconstrucción de las curvas voltaje versus corriente se utilizaron los resultados obtenidos en modo *current clamp* de los protocolos de pulsos cuadrados; donde cada salto establecido en el protocolo de inyección de corriente se graficó con la correspondiente respuesta en voltaje de la neurona a un tiempo de 100ms posteriores al comienzo del protocolo.

Para las curvas corriente versus voltaje se utilizaron los resultados obtenidos en modo *voltage clamp* del protocolo de rampa. La sustracción en las curvas, al igual que todo el análisis de datos en este capítulo, se realizaron con el mismo software p-clamp. Donde la sustracción consistió en la resta de la curva i/v control respecto a la curva i/v con ETX; esta misma metodología fue implementada en <sup>17</sup>.

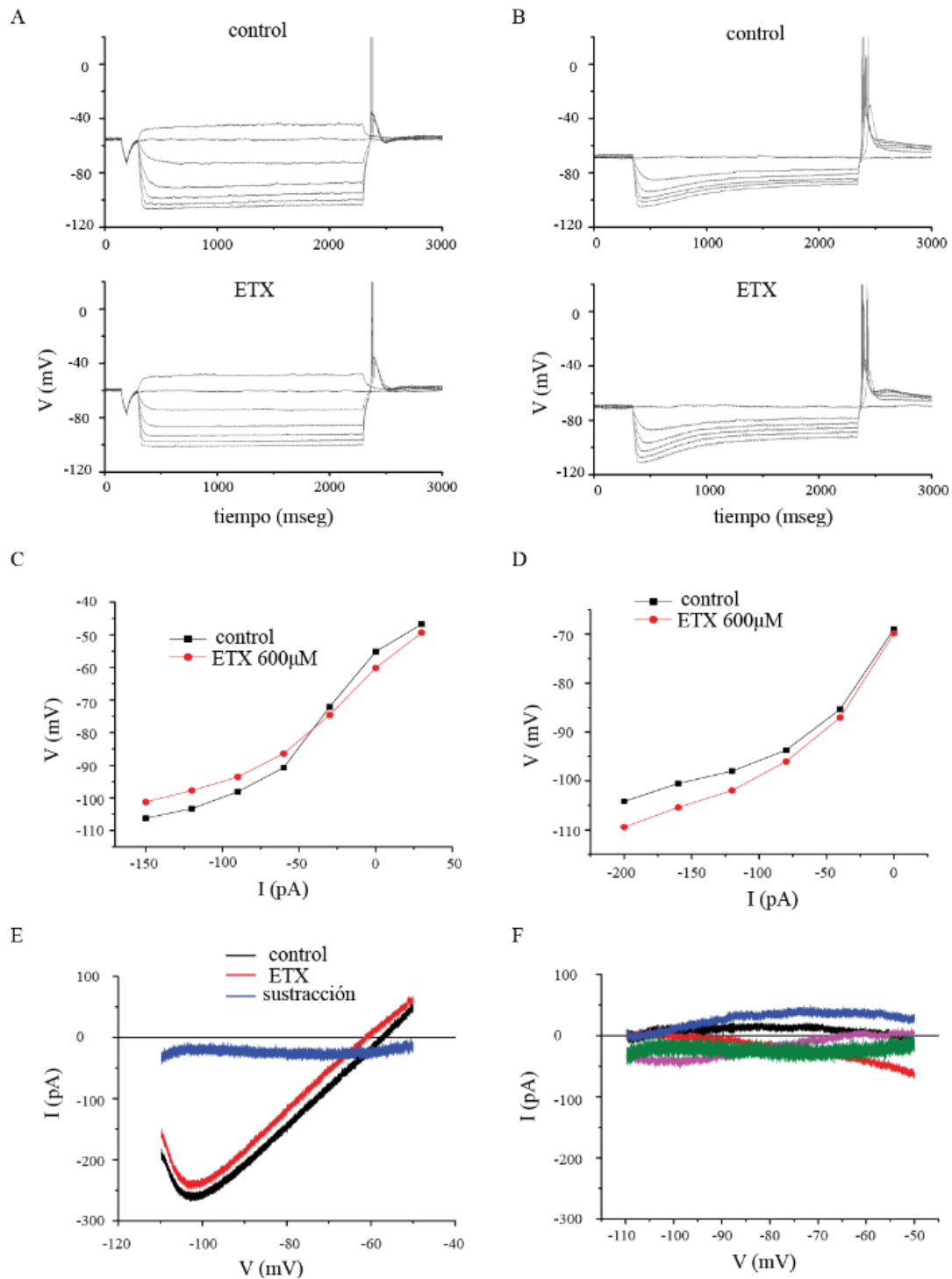
## **5.3 Resultados**

En total se registraron 9 neuronas con ETX; de las cuales obtuvimos resultados contradictorios que nos impidieron llegar a una conclusión acerca del efecto de ETX en las neuronas TC de ratón. A modo de resumir, en la figura 5.1 se muestran los resultados que obtuvimos con las diferentes técnicas que empleamos para la prueba piloto.

En la figura.5.1 A y B, puede verse la respuesta en voltaje de dos neuronas que fueron estimuladas bajo el protocolo de pulsos cuadrados, para la condición control (paneles superiores) y condición ETX (paneles inferiores); para este protocolo experimental no se inyectó corriente externa para mantener un Vm de interés; cada condición inicial de Vm se correspondió con el potencial de membrana en reposo de la neurona registrada. Las curvas

voltaje versus corriente de ambas neuronas pueden verse en la figura 5.1 C y D. La respuesta de la neurona (Fig. 5.1A) presentó una relación  $v/i$  donde la presencia de ETX produjo un desplazamiento despolarizante de la curva en la región correspondiente a los pulsos de corriente negativos (ver Fig. 5.1C, control (negro) respecto a ETX (rojo)). Al contrario, la respuesta de la neurona (Fig. 5.1B) mostró una relación  $v/i$  donde la presencia de ETX produjo un desplazamiento hiperpolarizante de la relación  $v/i$  respecto a la condición control (ver Fig. 5.1D, condición control (negro) y ETX (rojo)), también a valores de corriente negativos del protocolo de pulsos cuadrados.

Emplear el protocolo de rampa en modo *voltaje clamp* nos permitió medir las corrientes iónicas que fluyen por la membrana celular ante los diferentes valores impuestos del  $V_m$  por el protocolo; de esta forma recreamos la curva corriente versus voltaje para cada neurona registrada. En la figura 5.1E puede verse la relación  $i/v$  de una neurona representativa, donde el trazo negro representa la condición control, el trazo rojo la condición ETX y el trazo azul la sustracción entre ambas curvas; la respuesta lineal de la curva sustraída muestra que la componente ETX-sensible no tiene una dependencia en voltaje. La sustracción para 5 neuronas puede verse en la figura 5.1F; estos resultados nuevamente apuntan a que la componente ETX-sensible obtenida de cada una de las cinco neuronas registradas no tuvieron dependencia con el voltaje de membrana.



**Figura 5.1. Respuesta eléctrica ante la presencia de ETX.** (A) y (B). Registros de *current clamp* usando el protocolo de pulsos cuadrados antes (control panel superior) y después de la droga (ETX 600 μM panel inferior). (C) y (D). Relación voltaje versus corriente para las mismas neuronas de ((A) y (B)) con condición control (antes de la droga, negro) y condición después de la droga (ETX 600 μM, rojo). (E) Relación corriente versus voltaje obtenida de registros en *voltage clamp* usando el protocolo de rampa para antes de la droga (control, negro) y después de la droga (ETX 600 μM, rojo). La ETX-componente sensible (trazo azul) se obtiene de la sustracción del trazo negro control respecto al trazo rojo ETX. (F) ETX-componente sensible para seis neuronas TC registradas.

## 5.4 Discusión

En la figura 5.1 resumimos los resultados de la prueba piloto, como puede verse en los ejemplos de los paneles C y D, encontramos neuronas que presentaban un efecto voltaje dependiente a ETX muy variable; por un lado, este efecto generaba una despolarización indicando el bloqueo o disminución de una corriente hiperpolarizante, lo que podría ir acorde con la disminución de  $I_K(Ca^{++})$  debida a ETX<sup>141</sup> y por el otro, generaba una hiperpolarización indicando más bien el bloqueo o disminución de una corriente despolarizante, tales como los efectos vistos por el bloqueo de  $I_{NaP}$ <sup>141</sup> o  $I_T$ <sup>135,139</sup>. Sumando mayor controversia a los resultados, encontramos un grupo de neuronas TC que no presentaron un efecto dependiente del voltaje ante la presencia de ETX (Fig5.1F).

La variabilidad en nuestros resultados nos impide realizar alguna conclusión respecto al efecto de ETX en estas neuronas; dado que el control del experimento no es suficiente para obtener resultados significativos decidimos no continuar con la prueba piloto. Sin embargo, estos resultados siguen sumando a la controversia respecto al efecto de la Etosuximida en las neuronas talamocorticales; en este sentido nos aventuramos a proponer que esto puede ser debidos a que ETX no tiene efecto sobre las neuronas TC y la controversia que surge entre los diferentes estudios podría deberse a la variabilidad del experimento.

## Capítulo 6

### 6. Conclusiones

El objetivo de esta tesis fue estudiar la función de las conductancias sub-umbrales que expresan las neuronas talamocorticales en el control de su comportamiento oscilatorio. Dado que las oscilaciones periódicas sub-umbrales pueden manifestarse como disparo de ráfagas repetitivas y que este modo de disparo se relaciona fuertemente con los procesos de sincronización del circuito tálamo-cortical, ya sea bajo condiciones fisiológicas o patológicas, decidimos estudiar diferentes mecanismos biofísicos que potencialmente modulan el disparo repetitivo de ráfagas en neuronas TC de ratón. Para ello utilizamos modelos computacionales basados en conductancias iónicas, herramientas de sistemas dinámicos y registros electrofisiológicos intracelulares *in vitro*.

Las herramientas de sistemas dinámicos nos permitieron evaluar de forma teórica qué combinaciones de corrientes iónicas son capaces de sostener un comportamiento oscilatorio periódico (modelos mínimos). Usando la conductancia leak de potasio como parámetro de bifurcación en el sistema  $I_h$ - $I_{Kir}$ -Leak encontramos que éste presenta un tipo de bifurcación que le permite generar y sostener oscilaciones a frecuencias relevantes con las oscilaciones del ritmo de ondas lentas. Además, mostramos que  $I_{Kir}$  tiene la habilidad de amplificar las oscilaciones periódicas y de generar este comportamiento de forma espontánea, sin la necesidad de empujar al sistema a oscilar con una inyección de corriente externa. Este comportamiento observado inicialmente en el modelo computacional, fue posteriormente demostrado de manera experimental mediante la inducción del disparo repetitivo de ráfagas en neuronas TC de ratón registradas *in vitro*, después de aumentar de manera artificial la corriente Kir basal haciendo uso de la técnica de *dynamic clamp*. Asimismo, mostramos que el efecto amplificador de las oscilaciones mediado por  $I_{Kir}$  se debe a las propiedades electrofisiológicas de esta corriente; específicamente, la presencia de una región de la relación corriente/voltaje con pendiente negativa, la cual es una conocida característica de los canales iónicos que son el substrato molecular de esta corriente: los canales Kir2.2.

Estudiando el comportamiento resonante de las neuronas TC de los núcleos VB de ratón, encontramos que la mayoría resuenan a una frecuencia compatible con las oscilaciones delta. Este comportamiento es debido a las propiedades biofísicas de la corriente T la cual, en combinación con las propiedades pasivas de estas neuronas, puede comportarse simultáneamente como una corriente resonadora y amplificadora. Además, encontramos que en las neuronas TC la corriente  $I_h$  no induce este comportamiento, en contraposición con el efecto inductor de resonancia que se ha reportado para  $I_h$  en otros tipos neuronales. Por el contrario, en nuestro estudio,  $I_h$  tiene un efecto estabilizador de la resonancia de las neuronas TC debido a que contribuye a disminuir la resistencia de membrana. Por otra parte, la corriente  $I_{Kir}$  juega un papel relevante en la amplificación de la resonancia en neuronas TC en concordancia con el rol amplificador de las oscilaciones del potencial de membrana demostrado previamente en nuestro grupo. Mediante la manipulación de  $I_{Kir}$  con la técnica de *dynamic clamp*, mostramos que el aumento de esta conductancia resulta en la amplificación de la resonancia; resaltando nuevamente que  $I_{Kir}$  es una corriente amplificadora con la capacidad de inducir oscilaciones espontáneas que promueven la generación de ráfagas repetitivas. Esta habilidad amplificadora resulta más sobresaliente si se tiene en cuenta que  $I_{Kir}$  es una corriente hiperpolarizante clásicamente considerada como estabilizadora del potencial de membrana.

En la última parte de esta tesis estudiamos la interacción entre los inputs sinápticos que arriban a las neuronas TC y las propiedades de membrana intrínsecas de estas neuronas. Empleando un modelo teórico de la neurona TC hallamos otro fenómeno de resonancia entre el input inhibitorio del núcleo reticular del tálamo y la corriente  $I_h$  bajo el bombardeo sináptico excitatorio proveniente de la corteza. Con este modelo simulamos un escenario experimental no fisiológico en el que se inducen oscilaciones semejantes a los patológicos SWDs. En el experimento, originalmente hecho en rodajas talamocorticales, el bloqueo farmacológico de receptores  $GABA_A$  lleva al aumento de la actividad oscilatoria del nRT por desinhibición y a la consecuente sobreactivación de receptores  $GABA_B$  en las neuronas TC; lo cual produce la hipsincronización del sistema TC-nRT que se manifiesta como SWDs. En nuestra simulación aumentamos la conductancia del  $rGABA_B$  y simulamos ráfagas robustas provenientes del nRT para activar los  $rGABA_B$  y así reproducir el experimento. Esta



condición de simulación generó un aumento en la correlación entre el input del nRT y el Vm de las neuronas TC. Además, el bombardeo presináptico (con una distribución periódica o uniforme con valor medio de 500mseg) sobre el modelo de neurona TC estimuló la generación de ráfagas repetitivas, con una frecuencia capaz de enlazar la cinética de activación de  $I_h$  con la correlación entre el input nRT y el Vm, potenciando la relación entre ambas señales. Consecuentemente, la ausencia de  $I_h$  produjo una brusca caída en la correlación entre el input nRT y el Vm con un efecto sinérgico sobre el impacto en la correlación cruzada dado por las demás conductancias sub-umbrales.

## Apendice

### AI. Modelo de conductancias iónicas

La ecuación del voltaje de membrana tiene la forma:

$$dV/dt = (I_{inj} - \Sigma I_i) / C \quad (1)$$

Donde  $I_{inj}$  representa la magnitud de la corriente inyectada,  $C$  la capacitancia de membrana ( $\mu F$ ) e  $\Sigma I_i$  es la suma de todas las corrientes iónicas  $\Sigma I_i = I_{Kir} + I_h + I_T + I_A + I_{NaP} + I_{Na} + I_K + I_L + I_{AHP} + I_{KCa} + I_{CAN} + I_{Kleak} + I_{Naleak}$ .

La ecuación de corriente para todas las corrientes iónicas, a excepción de  $I_T$  e  $I_L$ , tiene la siguiente forma:

$$I_i = \bar{g}_i m_i^p(V, t) h_i^q(V, t) (V - E_i) \quad (2)$$

Donde  $I_i$  es alguna de las corrientes individuales antes mencionadas;  $\bar{g}_i$  es la conductancia máxima para la corriente  $i$ ;  $m_i$  e  $h_i$  son las variables de activación e inactivación dependientes del voltaje y del tiempo, respectivamente; y  $p$  y  $q$  son sus exponentes.  $V$  representa el voltaje de membrana y  $E_i$  es el potencial de reversión para la corriente  $i$ .

La activación de las corrientes  $I_{Kir}$ ,  $I_{NaP}$ ,  $I_{AHP}$  e  $I_{KCa}$  fue asumida como instantánea, por lo tanto, para estas corrientes la variable  $m_i(t, V)$  fue reemplada en la ecuación (2), por la variable que representa la activación medida en el estado estacionario  $m_{i\infty}(V)$ .

Las ecuaciones para las variables de activación e inactivación tienen la siguiente forma:

$$dm_i/dt = (m_{i\infty}(V) - m_i) / \tau_{mi}(V) \quad (3)$$

$$dh_i/dt = (h_{i\infty}(V) - h_i) / \tau_{hi}(V) \quad (4)$$

Donde  $m_{\infty}(V)$ ,  $h_{\infty}(V)$  son las variables medidas en el estado estacionario para la activación e inactivación, respectivamente, y  $\tau_{mi}(V)$ ,  $\tau_{hi}(V)$  son las constantes temporales de las variables de activación e inactivación, respectivamente.

La ecuación para las corrientes de calcio es:

$$I_i = p_i m_i^p h_i^q G(V, Ca_o, Ca_i) \quad (5)$$

Donde  $p_i$  es la permeabilidad máxima;  $m_i$  y  $h_i$  las variables de activación e inactivación, respectivamente; y  $G(V, Ca_o, Ca_i)$  es una función de Goldman-Hodgkin-Katz que depende del voltaje de membrana y de las concentraciones de calcio intra ( $Ca_i$ ) y extra-celulares ( $Ca_o$ ).

$$G(V, Ca_o, Ca_i) = z^2 F^2 V / RT (Ca_i - Ca_o \exp[-zFV/RT]) / (1 - \exp[-zFV/RT]) \quad (6)$$

Donde  $z$ ,  $F$ ,  $R$  y  $T$  son: la valencia, la constante de Faraday, la constante de los gases y la temperatura absoluta, respectivamente.

Por último, hay corrientes que dependen de la concentración de calcio intracelular, estas son:  $I_{AHP}$ ,  $I_{KCa}$  e  $I_{CAN}$ . La dinámica intracelular de calcio que se enlaza con la calcio-dependencia de estas corrientes fue modelada usando un modelo de difusión simple de una capa de 100 nm de profundidad justo por debajo de la membrana plasmática con las dimensiones de la célula modelo (área=22700  $\mu\text{m}^2$ ). La ecuación que describe esta difusión de muestra a continuación:

$$dCa_i/dt = -(I_T \text{ or } I_L)/\text{prof}/F/2 (0.0000001) + (Ca_i0 - Ca_i)/\beta \quad (7)$$

Donde  $\text{prof}$  representa el espesor de la capa,  $F$  la constante de Faraday,  $Ca_i0$  la concentración inicial de calcio (50nM) y  $\beta$  es la tasa de difusión (1mseg).

Esta ecuación se usa para las dos corrientes de calcio simuladas ( $I_T$  e  $I_L$ ).  $I_{CAN}$  esta enlazada a la ecuación (7) a través de  $I_T$ , e  $I_{AHP}$ ,  $I_{KCa}$  se enlazan a la ecuación (7) por medio de  $I_L$ .

A continuación, se describen las ecuaciones detalladas para cada corriente individual, junto a sus parámetros y valor de conductancia/permeabilidad máxima *default*.

**-I<sub>Kir</sub>**

$$m_{Kir\infty}(V) = 1/(1 + \exp[(V + 97.9)/9.7])$$

$$I_{Kir}(V) = \bar{g}_{Kir} m_{Kir}(V) (V - E_K)$$

con  $E_i = -100$  y  $\bar{g}_i = 10 \mu\text{S}/\text{cm}^2$ .

**-I<sub>T</sub>**

$$I_T = p_T m_T^2 h_T G(V, Ca_o, Ca_i)$$

$$dm_T/dt = (m_{T\infty}(V) - m_T)/\tau_{mT}(V)$$

$$dh_T/dt = (h_{T\infty}(V) - h_T)/\tau_{hT}(V)$$

$$m_{T\infty}(V) = 1/(1 + \exp[-(V + 53)/6.2])$$

$$h_{T\infty}(V) = 1/(1 + \exp[(V + 75)/4])$$

$$\tau_{mT}(V) = 0.612 + 1/(\exp[-(V + 128)/16.7] + \exp[(V + 12.8)/18.2])$$

$$\tau_{hT}(V) = \exp[(V + 461)/66.6] \quad \text{for } V < -75 \text{ mV}$$

$$\tau_{hT}(V) = 28 + \exp[-(V + 16)/10.5] \quad \text{for } V > -75 \text{ mV}$$

Con  $Q_{10} = 2.5$  y  $p_T = 2 \times 10^{-5} \text{ cm/s}$ .

**-I<sub>h</sub>**

$$I_h = \bar{g}_h m_h (V - E_h)$$

$$dm_h/dt = (m_{h\infty}(V) - m_h)/\tau_{mh}(V)$$

$$m_{h\infty}(V) = 1/(1 + \exp[(V + 82)/5.49])$$

$$\tau_{mh}(V) = 1/([0.0008 + 0.0000035 \exp(-0.05787 V)] + \exp(-1.87 + 0.0701 V))$$

Con  $Q_{10} = 4$ ,  $\bar{g}_h = 20 \mu\text{S}/\text{cm}^2$  y  $E_h = 43 \text{ mV}$ .

**-I<sub>leak</sub>**

$$I_{KLeak} = \bar{g}_{KLeak} (V - E_K)$$

$$I_{NaLeak} = \bar{g}_{NaLeak} (V - E_{Na})$$

Con  $\bar{g}_{KLeak} = 10 \mu\text{S}/\text{cm}^2$  y  $E_K = -100\text{mV}$  para la corriente de fuga de potasio, y  $\bar{g}_{NaLeak} = 3 \mu\text{S}/\text{cm}^2$  y  $E_{Na} = 0\text{mV}$  para la corriente de fuga de sodio.

**-I<sub>L</sub>**

$$I_L = p_L m_L^2 G(V, Ca_o, Ca_i)$$

$$dm_L/dt = (m_{L\infty}(V) - m_L)/\tau_{mL}(V)$$

$$m_{L\infty} = 1/(1 + \exp[(V+10)/-10])$$

$$\tau_{mL}(V) = (1/(\alpha m + \beta m))/1.32$$

$$\alpha m = 1.6/(1 + \exp[-0.072(V-5)])$$

$$\beta m = 0.02(V-1.31)/(\exp[(V-1.31)/5.36]-1)$$

Con  $Q_{10} = 3$  y  $p_L = 1 \times 10^{-4} \text{cm/s}$ .

**-I<sub>NaP</sub>**

$$I_{NaP} = \bar{g}_{NaP} m_{NaP\infty}(V) h_{NaP} (V - E_{NaP})$$

$$dh_{NaP}/dt = (h_{NaP\infty}(V) - h_{NaP})/\tau_{hNaP}(V)$$

$$m_{NaP\infty} = 1/(1 + \exp[-(V+57.9)/6.4])$$

$$h_{NaP} = 1/(1 + \exp[(V+58.7)/14.2])$$

$$\tau_{hNaP}(V) = (1000 + (10000/(1 + \exp[(V+60)/10]))) / 1.73$$

Con  $Q_{10} = 3$ ,  $\bar{g}_{NaP} = 5.5 \mu\text{S}/\text{cm}^2$  y  $E_{NaP} = 45\text{mV}$ .

**-I<sub>A</sub>**

$$I_A = \bar{g}_A (0.6 h_{A1} m_{A1}^4 + 0.4 h_{A2} m_{A2}^4) (V - E_K)$$

$$dm_{A1}/dt = (m_{A1\infty}(V) - m_{A1})/\tau_{mA}(V)$$

$$dm_{A2}/dt = (m_{A2\infty}(V) - m_{A2})/\tau_{mA}(V)$$

$$dh_{A1}/dt = (h_{A1\infty}(V) - h_{A1})/\tau_{hA1}(V)$$

$$dh_{A2}/dt = (h_{A2\infty}(V) - h_{A2})/\tau_{hA2}(V)$$

$$m_{A1\infty} = 1/(1 + \exp[-(V+60)/8.5])$$

$$m_{A2\infty} = 1/(1 + \exp[-(V+36)/20])$$

$$\tau_{mA} = (0.37 + 1/(\exp[(V+35.8)/19.7] + \exp[-(V+79.7)/12.7])) / 1.67$$

$$h_{A\infty} = 1/(1 + \exp[(V+78)/6])$$

$$\begin{aligned} \tau_{hA1} &= (1/(\exp[(V+46)/5] + \exp[(-V+238)/37.5]))/1.67 \text{ for } V < -63 \\ \tau_{hA1} &= 0.735 \text{ for } V > -63 \\ \tau_{hA2} &= (1/(\exp[(V+46)/5] + \exp[(-V+238)/37.5]))/1.67 \text{ for } V < -73 \\ \tau_{hA2} &= 44.12 \text{ for } V > -73 \end{aligned}$$

Con  $Q_{10} = 2.8$ ,  $\bar{g}_A = 5500 \mu\text{S}/\text{cm}^2$  y  $E_k = -100\text{mV}$ .

#### **-I<sub>AHP</sub>**

$$I_{AHP} = \bar{g}_{AHP} m_{AHP\infty}(V) (V - E_k)$$

$$\begin{aligned} m_{AHP\infty} &= \alpha m / (\alpha m + \beta m) \\ \alpha m &= CaiL / 10000 \text{ para } CaiL < 0.0001 \\ \alpha m &= 0.01 \text{ para } CaiL > 0.0001 \\ \beta m &= 0.01 \end{aligned}$$

Con  $Q_{10} = 2.8$ ,  $\bar{g}_{AHP} = 15 \mu\text{S}/\text{cm}^2$ .

#### **-I<sub>KCa</sub>**

$$\begin{aligned} I_{KCa} &= 0.004 \bar{g}_{KCa} m_{KCa\infty} CaiL (V - E_{KCa}) \text{ para } 0.004 \times \bar{g}_{KCa} < 0.0000001 \text{ sino} \\ I_{KCa} &= \bar{g}_{KCa} m_{KCa\infty}(V) (V - E_k) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} m_{KCa\infty} &= \alpha m / (\alpha m + \beta m) \\ \alpha m &= 2/37.95(\exp[(V+50)/11] - \exp[(V+53.5)/27]) \text{ para } V < -10 \\ \alpha m &= 2\exp[(-V-53.5)/27] \text{ para } V > -10 \\ \beta m &= 2\exp[(-V-53.5)/27] - \alpha m \text{ para } V < -10 \\ \beta m &= 0 \text{ para } V > -10 \end{aligned}$$

$$\bar{g}_{KCa} = 1 \times 10^{-4} \text{ S}/\text{cm}^2$$

#### **-I<sub>CAN</sub>**

$$I_{CAN} = \bar{g}_{CAN} m_{CAN}^2 (V - E_{CAN})$$

$$dm_{CAN}/dt = (m_{CAN\infty}(V) - m_{CAN})/\tau_{mCAN}(V)$$

$$\begin{aligned} m_{CAN\infty} &= \alpha m / (\alpha m + \beta m) \\ \alpha m &= 0.0004(CaiT/0.0001)^8 \\ \beta m &= 0.0004 \\ \tau_{mCAN} &= (1/(\alpha m + \beta m))/1.93 \text{ para } \tau_{mCAN} \geq 0.1 \\ \alpha m &= 0.0004(CaiT/0.0001)^8 \\ \beta m &= 0.0004 \end{aligned}$$

Con  $Q_{10}=3$ ,  $\bar{g}_{CAN}=1 \times 10^{-5} \text{ mho/cm}^2$  y  $E_{CAN}=-15\text{mV}$ .

**Canales para generar potenciales de acción:**

-  $I_{Na}$

$$I_{Na} = \bar{g}_{Na} m^3_{Na} h_{Na} (V - E_{Na})$$

$$dm_{Na}/dt = (m_{Na\infty}(V) - m_{Na})/\tau_{mNa}(V)$$

$$dh_{Na}/dt = (h_{Na\infty}(V) - h_{Na})/\tau_{hNa}(V)$$

$$m_{Na\infty} = \alpha m / (\alpha m + \beta m)$$

$$\alpha m = 0.32(-V-37)/(\exp[(-V-37)/4]-1)$$

$$\beta m = 0.28(V+10)/(\exp[(V+10)/5]-1)$$

$$\tau_{mNa} = (1/(\alpha m + \beta m))/0.41$$

$$\alpha m = 0.32(-V-37)/(\exp[(-V-37)/4]-1)$$

$$\beta m = 0.28(V+10)/(\exp[(V+10)/5]-1)$$

$$h_{Na\infty} = \alpha h / (\alpha h + \beta h)$$

$$\alpha h = 0.128 \exp[(-V-33)/18]$$

$$\beta h = 4/(1 + \exp[(-V-10)/5])$$

$$\tau_{hNa} = (1/(\alpha h + \beta h))/0.41$$

$$\alpha h = 0.128 \exp[(-V-33)/18]$$

$$\beta h = 4/(1 + \exp[(-V-10)/5])$$

Con  $\bar{g}_{Na} = 1.0 \times 10^{-2} \text{ S/cm}^2$  y  $E_{Na} = 45\text{mV}$ .

-  $I_K$

$$I_K = \bar{g}_K m^4_K (V - E_K)$$

$$dm_K/dt = (m_{K\infty}(V) - m_K)/\tau_{mK}(V)$$

$$m_{K\infty} = \alpha m / (\alpha m + \beta m)$$

$$\alpha m = 0.032(-V-35)/(\exp[(-V-35)/5]-1)$$

$$\beta m = 0.5 \exp[(-V-40)/40]$$

$$\tau_{mK} = (1/(\alpha m + \beta m))/0.41$$

$$\alpha m = 0.032(-V-35)/(\exp[(-V-35)/5]-1)$$

$$\beta m = 0.5 \exp[(-V-40)/40]$$

Con  $\bar{g}_K = 2.0 \times 10^{-3} \text{ S/cm}^2$ .

## AII. Modelo C

A modo de simplificar los tres modelos que se usaron en el capítulo 4 a continuación se muestra el modelo correspondiente al (modelo parte 3). Este modelo incluye a los otros dos modelos. En el modelo parte 1, todas las conductancias sinápticas fueron establecidas a cero y las conductancias intrínsecas TC fueron leídas desde un archivo externo con la variación de estos parámetros según se indica en métodos y resultados. En el modelo parte 2, las conductancias intrínsecas estuvieron fijas (tal cómo se indica en resultados) y sólo se activaron las conductancias sinápticas que activan a los receptores post-sinápticos AMPA y GABA<sub>A</sub>. Por último, en el modelo parte 3 sólo estuvieron activas las conductancias sinápticas que activan a los receptores post-sinápticos AMPA y GABA<sub>B</sub>, y las conductancias intrínsecas de modificaron cómo se indica en resultados.

```
// PROGRAMA Neurona TC post-sináptica DE 3-COMPARTIMIENTOS
#include <stdlib.h>
#include <stdio.h>
#include <math.h>
#include <stdlib.h> // libreria para el uso de rand() y srand()
//definiendo las funciones hh y rk2, con void le digo que no me regrese nada y la ran1 (generador de #
aleatorios)
void hh(float x[], float t, float dxdt[]);
void rk2(float x[], int neq,float t,float dt, float xout[]);
float ran1(long *seed);
// crear archivos para lectura/escritura
FILE *fp1;
FILE *fp2;
FILE *fp3;
FILE *fp4;
//VARIABLES GLOBALES
int neq=37;           // numero de ecuaciones a integrar
float cor=0.0358;    // corriente externa nA
float dt=0.0025;    // mseg 0.0025   paso de integracion
float celsius=34;    //temperatura
```



```

float R=8.3145; // Cte gases
float F=96485.332; //Cte faraday

// parámetros para pegar compartimientos
float c=878.0; // capacitancia soma en nF/cm2
float ca=0.0008780; // capacitancia para acoplar soma-prox en m F/cm2
float cm=0.006980; // capacitancia dada en m F/cm2 (solo para acoplar areas dendritas)
float g12=5.19; // conductancia acople  $\mu$ S
float areas=31.3576; // area soma cm2
float areap=4.04275; // area proximal cm2
float aread=22.6064; // area distal E-6 cm2
float fc=7.950; // factor dendritas DESTEXHE 1998
float g23=0.7; // conductancia acople  $\mu$ S
// synapsis AMPA
float gampa=0.132; //  $\mu$ S Este valor da un dV de 1.4mV similar a Turner et. al. 1998
float vampa=0; // potencial de reversión
float alfaa=0.94; // 1/ms*mM extraído de Destexhe 1998
float betaa=0.18; // 1/mseg extraído de Destexhe 1998
// Neurotransmisor TA
int TA; // para este modelo T es 0 o 1 M
float fA=0.01; // kHz
// synapsis GABA-A
float ggabaa=0.072; //  $\mu$ S este valor da un dV de 8 mV similar a Turner et. al. 2003/Huguenar
et. al. 1994
float vgabaa=-81; // extraído de Ulrich et. al. 1997
float alfaga=20; // 1/ms*mM extraído de Destexhe 1998
float betaga=0.160; // 1/ms extraído de Destexhe 1998 beta=160 1/seg
// Neurotransmisor TG generador de rafagas repetitivas tren periódico
int TG; // para este modelo T es 0 o 1 M
// Neurotransmisor TGB generador de UNA rafagas
int TGB; // para este modelo T es 0 o 1 M
float fGB=0;
// synapsis NMDA NO IMPLEMENTADO
float gnmda=0; //

```

```

float vnmda=0;
float alfan=0.072;           // 1/ms*mM
float betan=0.0066;         // 1/ms
int mg=1;                    //[Mg++] externa nM

// synapsis GABA-B (metabotrópico)
float ggabab=0.009;         //conductancia μS
float vgabab=-100;          // potencial de reversión
float k1=0.52;               // 1/ms*mM
float k2=0.0013;            // 1/ms
float k3=0.98;               //1/ms
float k4=0.033;             // 1/ms
float k5=100;                // uM4 cte de disociacion
// soma conductancias [μS/cm2]
float gnal=3;
float gkl=10;
float gkir=20;
float gh=22;
float gnap=5.5;
float pTmax=50;
float gna=100000;
float gk=50000;
float ga=5500;
// potenciales de equilibrio, vt vtraub, ci/co [Ca++]
float vnap=50;
float vna=0;
float vk=-100;
float vh=-43;
float ci=0.00005, co=2;
float vt=-48;
//dendrita proximal [μS/cm2]
float gnalp=3;
float gklp=10;

```

```

float gkirp=20;
float ghp=22;
float gnapp=5.5;
float pTmaxp=50;
float gap=5500;
//dendrita distal [ $\mu$ S/cm2]
float gnald=3;
float gkld=10;
float gkird=20;
float ghd=22;
float gnapd=5.5;
float pTmaxd=50;
float gad=5500;
int main()
{
float x[neq],dxdt[neq],xout[neq];
float tn,t,ttot=30000,tp;           // tiempo total de simulación mseg
int i,itotal,j;
float told=0,delt,ib,sp=0;
int ns=0;
int burst=1;
int a,db,dib;
float uA;                          // u variable aleatoria entre 0 y 1
long seed=-11;                      // semilla del generador ran1, fija para la liberación de TA y TG
int nA=0,nG=0,nGB=0;               // contador para ver la distribucion de numeros aleatorios de AMPA y
GABAa y GABAb
float
minfho,hinfnapo,minfto,hinftho,amo,bmo,aho,bho,minfnao,hinfnao,ninfko,ano,bno,minflao,minf2ao,hinfao;
float vo=-65.00;                   // FIJO EL VOLTAJE INICIAL
float fe, ne;
/* rescaleo conductancias con dt */
gampa=gampa*0.0025/dt;
ggabaa=ggabaa*0.0025/dt;
ggabab=ggabab*0.0025/dt;

```

```

fp1=fopen("nuevo.dat","w+");           // archivo de salida con todos los datos
fp2=fopen("nuevo2.dat","w+");         // archivo de solo lectura, de salida para graficar el espacio de
parametros
fp3=fopen("voltaje.dat","w+");        // archivo de salida para ver el voltaje en los 3 compartimientos
fp4=fopen("sinapsiS.dat","w+");       // archivo de salida para ver las corrientes sinapticas
itotal=ttot/dt;
// formulas de iniciacion de variables en cualquier valor de voltaje inicial
minfho=1.0/(1+exp((vo+82.0)/5.49));
hinfnapo=1/(1+exp((vo+58.7)/14.2));
minfto=1/(1+exp(-(vo+53)/6.2));
hinfto=1/(1+exp((vo+75)/4.0));
amo=0.32*(13-(vo-vt))/(exp((13-(vo-vt))/4.0)-1);
bmo=0.28*((vo-vt)-40)/(exp(((vo-vt)-40)/5.0)-1);
aho=0.128*exp((17-(vo-vt))/18);
bho= 4.0/(1+exp((40-(vo-vt))/5.0));
minfnao=amo/(amo+bmo);
hinfnao=aho/(aho+bho);
ano=0.032*(15-(vo-vt))/(exp((15-(vo-vt))/5.0)-1);
bno=0.5*(exp((10-(vo-vt))/40.0));
ninfko=ano/(ano+bno);
minf1ao=1.0/(1+exp(-(vo+60)/8.5));
minf2ao=1.0/(1+exp(-(vo+36)/20.0));
hinfao=1.0/(1+exp((vo+78)/6.0));
x[1]=vo;
x[2]=minfho;
x[3]=hinfnapo;
x[4]=minfto;
x[5]=hinfto;
x[6]=vo;
x[7]=minfho;
x[8]=hinfnapo;
x[9]=minfto;
x[10]=hinfto;
x[11]=vo;

```

```

x[12]=minfho;
x[13]=hinfnapo;
x[14]=minfto;
x[15]=hinfto;
x[16]=minfnao;
x[17]=hinfnao;
x[18]=ninfko;
x[19]=minflao;
x[20]=minf2ao;
x[21]=hinfao;
x[22]=hinfao;
x[23]=minflao;
x[24]=minf2ao;
x[25]=hinfao;
x[26]=hinfao;
x[27]=minflao;
x[28]=minf2ao;
x[29]=hinfao;
x[30]=hinfao;
x[31]=0;
x[32]=0;
x[33]=0;
x[34]=0;
x[35]=0;
a=50;
for (i=0;i<itotal;i++) // bucle de pasos temporales dt hasta completar el t total
{
t=i*dt;
//----- TAMPA se libera con una distribución de Poisson
// tren para TA
uA=ran1(&seed);
if ((fA*dt)>uA) {TA=1; nA++;} // T AMPA
else TA=0;

```

//----- DIFERENTES PROTOCOLO para rafagas repetitivas con spikes periódicos a=CI db representa el ancho del burst y dib representa distancia temporal entre el siguiente burst (frecuencia) para estimular gabaB

```
dib=500; //500;          // distribución PERIODICA

//dib=1000*ran1(&seed);      //distribucion UNIFORME
//dib=-500*log(ran1(&seed));  // distribucion EXPONENCIAL
db=150;

    if (a<=t && t<=(a+db))
        {
            if(i%1300==0) {TGB=1; nGB++;}
            else TGB=0;
        }

    if (t>(a+db) && t<=(a+db+dib)) { a=db+dib+a; TGB=0;}

//-----
rk2(x, neq, t, dt, xout);

//-----para imprimir el tren de spikes de amplitud sp=1 y ancho 1mseg

if(x[1]<0 && xout[1]<0)
{
    sp=0;
    //if(i%100==0) fprintf(fp4,"%f %f\n",t,sp);
}

if(x[1]<0 && xout[1]>=0)          (((x[1]<0 && xout[1]>=0) || (x[1]>0 && xout[1]<=0))
{
    sp=1;
    //if(i%100==0) fprintf(fp4,"%f %f\n",t,sp);
}

if(x[1]>0 && xout[1]<=0)
{
    sp=1;
    //if(i%100==0) fprintf(fp4,"%f %f\n",t,sp);
}

if(x[1]>0 && xout[1]>0)
{
```



```

//      {
//
//      fprintf(fp2,"%f %f %f %f %f %f %f %f %f %f %f %f %f %f %f %f %f %f %f %f %f %f\n",gnal,gkl,gki
r,gh,gnap,pTmax,ga,gnap,gklp,gkirp,ghp,gnapp,pTmaxp,gap,gnald,gkld,gkird,ghd,gnapd,pTmaxd,gad);
//
//      }
}

// defino la funcion hh, que tiene todas las ecuaciones diferenciales para las 7 corrientes ionicas y las synapsis
void hh(float x[],float t,float dxdt[])
{
//variables locales a la funcion hh
float v,mh,hnap,m1a,m2a,h1a,h2a,ht,mt;

float bir,minfh,taumh,minfnap,hinfnap,taunap,minf1a,minf2a,hinfa,tauma,taudef,tauh1a,tauh2a;

float minft,hinft,taumt,tauht;

float cai,cao,eco,eci,efun,z,ghk;

float vp,mhp,hnapp,mtp,htp,m1ap,m2ap,h1ap,h2ap;

float
birp,minfhp,taumhp,minfnapp,hinfnapp,taunapp,minftp,hinftp,taumtp,tauhtp,minf1ap,minf2ap,hinfap,taumap,
taudefp,tauh1ap,tauh2ap;

float ecop,ecip,efunp,zp,ghkp;

float y1,y2,y3,y4,y3h;

float ctnap,cta,ctt,ctth,cth;

float vd,mhd,hnapd,mtd,htd,m1ad,m2ad,h1ad,h2ad;

float
bird,minfhd,taumhd,minfnapd,hinfnapd,taunapd,minftd,hinftd,taumtd,tauhtd,minf1ad,minf2ad,hinfad,taumad,
taudefd,tauh1ad,tauh2ad;

float ecod,ecid,efund,zd,ghkd;

float mna,hna,nk,minfna,hinfna,ninfk,y5,ctk,am,ah,an,bn,taumna,tauhna,taunk,v2,bm,bh;

float rampa,iampa;

float rnmda,inmda,B;

float rgabaa,igabaa;

float rgabab,igabab,rg,rn;

v=x[1];
mh=x[2];
hnap=x[3];
mt=x[4];

```



```

ht=x[5];
vp=x[6];
mhp=x[7];
hnapp=x[8];
mtp=x[9];
htp=x[10];
vd=x[11];
mhd=x[12];
hnapd=x[13];
mtd=x[14];
htd=x[15];
mna=x[16];
hna=x[17];
    nk=x[18];
    m1a=x[19];
    m2a=x[20];
    h1a=x[21];
    h2a=x[22];
    m1ap=x[23];
    m2ap=x[24];
    h1ap=x[25];
    h2ap=x[26];
    m1ad=x[27];
    m2ad=x[28];
    h1ad=x[29];
    h2ad=x[30];

```

```
// SYNOPSIS-----
```

```

//AMPA
rampa=x[31];
dxdt[31]=(alfaa*TA*(1-rampa)-betaa*rampa);
iampa=gampa*rampa*(vd-vampa);
// NMDA

```

```

rnmda=x[32];
dxdt[32]=(alfan*TA*(1-rnmda)-betan*rnmda);
B= 1.0/(1.0+mg/3.57*exp(-1*vd/16.13));
inmda=gnmda*rnmda*B*(vd-vnmda);
// GABA-A
rgabaa=x[33];
dxdt[33]=(alfaga*TG*(1-rgabaa)-betaga*rgabaa);
igabaa=ggabaa*rgabaa*(vp-vgabaa);
// GABA-B
rgabab=x[34];
rg=x[35];
dxdt[34]=(k1*TGB*(1-rgabab)-k2*rgabab);
dxdt[35]=(k3*rgabab)-(k4*rg);
rn=rg*rg*rg*rg;
igabab=ggabab*(rn/(rn+k5))*(vp-vgabab);
//      fprintf(fp4,"%f%f%f%f%f\n",t,iampa,inmda,igabaa,igabab);
//-----
//SOMA
//kir
bir=1.0/(1+exp((v+97.9)/9.7));
//Ih
y1=((celsius-34.0)/10.0);
cth=pow(4,y1);
minfh=1.0/(1+exp((v+82.0)/5.49));
taumh=(1.0/((0.0008+0.000035*exp(-0.05787*(v)))+exp(-1.87+0.0701*(v)))/cth);
//Inap
y2=((celsius-23.0)/10.0);
ctnap=pow(3,y2);
minfnap= 1/(1+exp(-(v+57.9)/6.4));
hinfnap=1/(1+exp((v+58.7)/14.2));
taunap=((1000.0)+(10000.0/(1+exp((v+60.0)/10.0))))/ctnap;
//IT
y3=((celsius-24.0)/10.0);

```

```

ctt=pow(2.5,y3);
y3h=((celsius-24.0)/10.0); // agregue esta línea para que los tau de activ e inact tuvieran su control de
temperatura independientemente
ctth=pow(2.5,y3h);
minft=1/(1+exp(-(v+53)/6.2));
  hinft=1/(1+exp((v+75)/4.0));
  taumt=((0.612+(1/(exp(-(v+128)/16.7)+exp((v+12.8)/18.2)))))/ctt;
  if(v<-75) tauht=(exp((v+461)/66.6))/ctth;
  else tauht=((28+exp(-(v+16)/10.5))/ctth;
  z =2*F*v/(R*(celsius+273.15)*1000.0); // defino dinamica del ca++ GHK
  if (fabs(z)< 1e-4) efun=1-(z/2.0);
  else efun=z/(exp(z)-1);
  eco = co*efun;
  if (fabs(z)< 1e-4) efun=1-((-1)*z/2.0);
  else efun = (-1)*z/(exp((-1)*z)-1);
  eci=ci*efun;
  ghk=(0.001)*2*F*(eci-eco);
  // HH
  v2=(v-vt);
  y5=((celsius-36.0)/10.0);
  ctk=pow(3,y5);
  am=0.32*(13-v2)/(exp((13-v2)/4.0)-1);
  bm=0.28*(v2-40)/(exp((v2-40)/5.0)-1);
  ah=0.128*exp((17-v2)/18);
  bh = 4.0/(1+exp((40-v2)/5.0));
  minfna=am/(am+bm);
  hinfna=ah/(ah+bh);
  taumna=1/(am+bm)/ctk;
  tauhna=1/(ah+bh)/ctk;
  an=0.032*(15-v2)/(exp((15-v2)/5.0)-1);
  bn=0.5*(exp((10-v2)/40.0));
  ninfk=an/(an+bn);
  taunk=(1.0/(an+bn))/ctk;
  //IA

```

```

y4=((celsius-23.0)/10.0);
cta=pow(2.8,y4);
minf1a=1.0/(1+exp(-(v+60)/8.5));
minf2a=1.0/(1+exp(-(v+36)/20.0));
hinfa=1.0/(1+exp((v+78)/6.0));
tauma=(0.37+(1.0/(exp((v+35.8)/19.7)+exp(-(v+79.7)/12.7))))/cta;
taudef=(1.0/(exp((v+46.0)/5.0)+exp(-(v+238.0)/37.5)))/cta;
if (v<(-63)) tauh1a=taudef;
else tauh1a=(19.0/cta);
if (v<(-73)) tauh2a=taudef;
else tauh2a=(60.0/cta);
//PROXIMAL
//kir
birp=1.0/(1+exp((vp+97.9)/9.7));
//lh
minflhp=1.0/(1+exp((vp+82.0)/5.49));
taumhp=(1.0/((0.0008+0.000035*exp(-0.05787*(vp)))+exp(-1.87+0.0701*(vp)))/cth);
//Inap
minfnapp= 1/(1+exp(-(vp+57.9)/6.4));
hinfnapp=1/(1+exp((vp+58.7)/14.2));
taunapp=((1000.0)+(10000.0/(1+exp((vp+60.0)/10.0)))/ctnap);
//IT
minftp=1/(1+exp(-(vp+53)/6.2));
hinftp=1/(1+exp((vp+75)/4.0));
taumtp=((0.612+(1/(exp(-(vp+128)/16.7)+exp((vp+12.8)/18.2)))))/ctt;
if(vp<-75) tauhtp=(exp((vp+461)/66.6))/ctth;
else tauhtp=((28+exp(-(vp+16)/10.5))/ctth);
zp=2*F*vp/(R*(celsius+273.15)*1000.0); // defino dinamica del ca++ GHK
if (fabs(zp)< 1e-4) efunp=1-(zp/2.0);
else efunp=zp/(exp(zp)-1);
ecop= co*efunp;
if (fabs(zp)< 1e-4) efunp=1-((-1)*zp/2.0);
else efunp= (-1)*zp/(exp((-1)*zp)-1);

```

```

ecip=ci*efunp;
ghkp=(0.001)*2*F*(ecip-ecop);
//IA
minflap=1.0/(1+exp(-(vp+60)/8.5));
minf2ap=1.0/(1+exp(-(vp+36)/20.0));
hinflap=1.0/(1+exp((vp+78)/6.0));
taumap=(0.37+(1.0/(exp((vp+35.8)/19.7)+exp(-(vp+79.7)/12.7))))/cta;
taudefp=(1.0/(exp((vp+46.0)/5.0)+exp(-(vp+238.0)/37.5)))/cta;
if (vp<(-63)) tauh1ap=taudefp;
else tauh1ap=(19.0/cta);
if (vp<(-73)) tauh2ap=taudefp;
else tauh2ap=(60.0/cta);
//DISTAL
//kir
bird=1.0/(1+exp((vd+97.9)/9.7));
//Ih
minfhhd=1.0/(1+exp((vd+82.0)/5.49));
taumhd=(1.0/((0.0008+0.0000035*exp(-0.05787*(vd)))+exp(-1.87+0.0701*(vd))))/cth;
//Inap
minfnapd=1/(1+exp(-(vd+57.9)/6.4));
hinfnapd=1/(1+exp((vd+58.7)/14.2));
taunapd=((1000.0)+(10000.0/(1+exp((vd+60.0)/10.0))))/ctnap;
//IT
minftd=1/(1+exp(-(vd+53)/6.2));
hinftd=1/(1+exp((vd+75)/4.0));
taumtd=((0.612+(1/(exp(-(vd+128)/16.7)+exp((vd+12.8)/18.2)))))/ctt;
if(vd<-75) tauhtd=(exp((vd+461)/66.6))/ctth;
else tauhtd=((28+exp(-(vd+16)/10.5))/ctth);
zd=2*F*vd/(R*(celsius+273.15)*1000.0); // defino dinamica del ca++ GHK
if (fabs(zd)< 1e-4) efund=1-(zd/2.0);
else efund=zd/(exp(zd)-1);
ecod= co*efund;
if (fabs(zd)< 1e-4) efund=1-((-1)*zd/2.0);

```

```

else efund= (-1)*zd/(exp((-1)*zd)-1);
ecid=ci*efund;
ghkd=(0.001)*2*F*(ecid-ecod);
//IA
minf1ad=1.0/(1+exp(-(vd+60)/8.5));
minf2ad=1.0/(1+exp(-(vd+36)/20.0));
hinfad=1.0/(1+exp((vd+78)/6.0));
taumad=(0.37+(1.0/(exp((vd+35.8)/19.7)+exp(-(vd+79.7)/12.7))))/cta;
taudefd=(1.0/(exp((vd+46.0)/5.0)+exp(-(vd+238.0)/37.5)))/cta;
if (vd<(-63)) tauh1ad=taudefd;
else tauh1ad=(19.0/cta);
if (vd<(-73)) tauh2ad=taudefd;
else tauh2ad=(60.0/cta);

// ecuaciones diferenciales

// SOMA
dxdt[1]=(cor/(0.00003135*c))-(gnap/c*minfnap*hnapp*(v-vnap))-(pTmax*mt*mt*ht*ghk/c)-(gkir*bir*(v-
vk)/c)-(gh*mh*(v-vh)/c)-(gkl*(v-vk)/c)-(gnal*(v-vna)/c)-(gna*mna*mna*hna*(v-vnap)/c)-
(gk*nk*nk*nk*nk*(v-vk)/c)-(ga/c*(v-
vk)*((0.6*h1a*m1a*m1a*m1a*m1a)+(0.4*h2a*m2a*m2a*m2a*m2a)))-((g12*(v-vp))/(areas*ca));

dxdt[2]=(minfh-mh)/taumh;
dxdt[3]=(hinfnap-hnap)/taunap;
dxdt[4]=(minft-mt)/taumt;
dxdt[5]=(hinft-ht)/tauht;
dxdt[16]=(minfna-mna)/taumna;
dxdt[17]=(hinfna-hna)/tauhna;
dxdt[18]=(ninfk-nk)/taunk;
dxdt[19]=(minf1a-m1a)/tauma;
dxdt[20]=(minf2a-m2a)/tauma;
dxdt[21]=(hinf1a-h1a)/tauh1a;
dxdt[22]=(hinf2a-h2a)/tauh2a;

// DENDRITA PROXIMAL
dxdt[6]=-(igabaa/(0.0000404275*c))-(igabab/(0.0000404275*c))-(gnapp/c*minfnapp*hnapp*(vp-vnap))-
(pTmaxp*mtp*mtp*htp*ghkp/c)-(gkirp*birp*(vp-vk)/c)-(ghp*mhp*(vp-vh)/c)-(gklp*(vp-vk)/c)-(gnalp*(vp-
vna)/c)-(gap/c*(vp-vk)*((0.6*h1ap*m1ap*m1ap*m1ap*m1ap)+(0.4*h2ap*m2ap*m2ap*m2ap*m2ap)))-
((g12*(vp-v))/(areap*cm))-((g23*(vp-vd))/(areap*cm));

```

```

dxdt[7]=(minfhp-mhp)/taumhp;
dxdt[8]=(hinfnapp-hnapp)/taunapp;
dxdt[9]=(minftp-mtp)/taumtp;
dxdt[10]=(hinftp-htp)/tauhtp;

dxdt[23]=(minf1ap-m1ap)/taumap;
dxdt[24]=(minf2ap-m2ap)/taumap;
dxdt[25]=(hinfap-h1ap)/tauh1ap;
dxdt[26]=(hinfap-h2ap)/tauh2ap;
// DENDRITA DISTAL
dxdt[11]= -(inmda/(0.0000226054*c))-(iampa/(0.0000226054*c))-(gnapd/c*minfnapd*hnapd*(vd-
vnapp))-(pTmaxd*mtd*mtd*htd*ghkd/c)-(gkird*bird*(vd-vk)/c)-(ghd*mhd*(vd-vh)/c)-(gkld*(vd-vk)/c)-
(gnald*(vd-vna)/c)-(gad/c*(vd-
vk)*((0.6*h1ad*m1ad*m1ad*m1ad*m1ad)+(0.4*h2ad*m2ad*m2ad*m2ad*m2ad)))-((g23*(vd-
vp))/(aread*cm));

dxdt[12]=(minfhhd-mhd)/taumhd;
dxdt[13]=(hinfnapd-hnapd)/taunapd;
dxdt[14]=(minftd-mtd)/taumtd;
dxdt[15]=(hinftd-htd)/tauhtd;
dxdt[27]=(minf1ad-m1ad)/taumad;
dxdt[28]=(minf2ad-m2ad)/taumad;
dxdt[29]=(hinfad-h1ad)/tauh1ad;
dxdt[30]=(hinfad-h2ad)/tauh2ad;

}
//defino la funcion rk2 que es metodo de integraci3n numerica
void rk2(float x[],int neq,float t,float dt,float xout[])
{
float dxdt[neq],xt[neq],tn;
int j;
hh(x,t,dxdt);
for(j=0;j<neq;j++) xt[j]=x[j]+dxdt[j]*dt/2;
tn=t+dt/2;

```

```

hh(xt,tn,dxdt);
for(j=0;j<neq;j++) xout[j]=x[j]+dxdt[j]*dt;
}
// para ran1 y obtener la secuencia de numeros aleatoria entre 0 y 1.
#define IA 16807
#define IM 2147483647
#define AM (1.0/IM)
#define IQ 127773
#define IR 2836
#define NTAB 32
#define NDIV (1+(IM-1)/NTAB)
#define EPS 1.2e-7
#define RNMX (1.0-EPS)
float ran1(long *idum)
{
    int j;
    long k;
    static long iy=0;
    static long iv[NTAB];
    float temp;
    if (*idum <= 0 || !iy) {
        if (-(*idum) < 1) *idum=1;
        else *idum = -(*idum);
        for (j=NTAB+7;j>=0;j--) {
            k=(*idum)/IQ;
            *idum=IA*( *idum-k*IQ)-IR*k;
            if (*idum < 0) *idum += IM;
            if (j < NTAB) iv[j] = *idum;
        }
        iy=iv[0];
    }
    k=(*idum)/IQ;
    *idum=IA*( *idum-k*IQ)-IR*k;

```



```

    if (*idum < 0) *idum += IM;
    j=iy/NDIV;
    iy=iv[j];
    iv[j] = *idum;
    if ((temp=AM*iy) > RNMX) return RNMX;
    else return temp;
}
#undef IA
#undef IM
#undef AM
#undef IQ
#undef IR
#undef NTAB
#undef NDIV
#undef EPS
#undef RNMX
/* (C) Copr. 1986-92 Numerical Recipes Software 7MZ9%"W5:!(+). */

```

## Bibliografía

- 1 Hille, B., Armstrong, C. M. & MacKinnon, R. Ion channels: from idea to reality. *Nature medicine* **5**, 1105-1109, doi:10.1038/13415 (1999).
- 2 Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. & Sigworth, F. J. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* **391**, 85-100, doi:10.1007/BF00656997 (1981).
- 3 Izhikevich, E. *Dynamical Systems in Neuroscience: The Geometry of Excitability and Bursting*. (MIT Press, 2005).
- 4 Dayan, P. A., L F. *Theoretical Neuroscience*. (MIT Press, 2001).
- 5 Hodgkin, A. L. & Huxley, A. F. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol* **117**, 500-544, doi:10.1113/jphysiol.1952.sp004764 (1952).
- 6 Sherman, S. M. Functioning of Circuits Connecting Thalamus and Cortex. *Comprehensive Physiology* **7**, 713-739, doi:10.1002/cphy.c160032 (2017).
- 7 Butler, A. Evolution of the thalamus: a morphological and functional review. *Thalamus & Related Systems* pp. 35 - 58, doi:DOI: <https://doi.org/10.1017/S1472928808000356> (2008).
- 8 Amarillo, M. S. N. a. Y. El tálamo en el centro de la atención. *Ciencia Hoy* (2018).
- 9 Varela, C. Thalamic neuromodulation and its implications for executive networks. *Frontiers in neural circuits* **8**, 69, doi:10.3389/fncir.2014.00069 (2014).
- 10 Pita-Almenar, J. D., Yu, D., Lu, H. C. & Beierlein, M. Mechanisms underlying desynchronization of cholinergic-evoked thalamic network activity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **34**, 14463-14474, doi:10.1523/JNEUROSCI.2321-14.2014 (2014).
- 11 Sherman, S. M. Interneurons and triadic circuitry of the thalamus. *Trends Neurosci* **27**, 670-675, doi:10.1016/j.tins.2004.08.003 (2004).
- 12 Andersen, P., Andersson, S. A. & Lomo, T. Thalamo-cortical relations during spontaneous barbiturate spindles. *Electroencephalography and clinical neurophysiology* **24**, 90 (1968).
- 13 Llinas, R. R. & Steriade, M. Bursting of thalamic neurons and states of vigilance. *Journal of neurophysiology* **95**, 3297-3308 (2006).
- 14 McCormick, D. A. & Bal, T. Sleep and arousal: thalamocortical mechanisms. *Annu Rev Neurosci* **20**, 185-215 (1997).
- 15 McCormick, D. A. & Prince, D. A. Actions of acetylcholine in the guinea-pig and cat medial and lateral geniculate nuclei, in vitro. *J Physiol* **392**, 147-165 (1987).
- 16 McCormick, D. A. & Prince, D. A. Noradrenergic modulation of firing pattern in guinea pig and cat thalamic neurons, in vitro. *Journal of neurophysiology* **59**, 978-996 (1988).
- 17 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**, 393-410, doi:10.1152/jn.00647.2013 (2014).

- 18 Jahnsen H , L. R. Electrophysiological properties of guinea-pig thalamic neurones: an in vitro study. *J Physiol*, doi: <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1984.sp015153> (1984b).
- 19 Trimmer, J. S. & Rhodes, K. J. Localization of voltage-gated ion channels in mammalian brain. *Annual review of physiology* **66**, 477-519, doi:10.1146/annurev.physiol.66.032102.113328 (2004).
- 20 Hernandez-Cruz, A. & Pape, H. C. Identification of two calcium currents in acutely dissociated neurons from the rat lateral geniculate nucleus. *Journal of neurophysiology* **61**, 1270-1283, doi:10.1152/jn.1989.61.6.1270 (1989).
- 21 McCormick, D. A. & Huguenard, J. R. A model of the electrophysiological properties of thalamocortical relay neurons. *Journal of neurophysiology* **68**, 1384-1400 (1992).
- 22 Rhodes, P. A. & Llinas, R. A model of thalamocortical relay cells. *J Physiol* **565**, 765-781 (2005).
- 23 Jahnsen, H. & Llinas, R. Ionic basis for the electro-responsiveness and oscillatory properties of guinea-pig thalamic neurones in vitro. *J Physiol* **349**, 227-247, doi:10.1113/jphysiol.1984.sp015154 (1984).
- 24 Santoro, B. *et al.* Molecular and functional heterogeneity of hyperpolarization-activated pacemaker channels in the mouse CNS. *The Journal of neuroscience* **20**, 5264-5275 (2000).
- 25 Parri, H. R. & Crunelli, V. Sodium current in rat and cat thalamocortical neurons: role of a non-inactivating component in tonic and burst firing. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **18**, 854-867 (1998).
- 26 Huguenard, J. R., Coulter, D. A. & Prince, D. A. A fast transient potassium current in thalamic relay neurons: kinetics of activation and inactivation. *Journal of neurophysiology* **66**, 1304-1315 (1991).
- 27 Huguenard, J. R. & McCormick, D. A. Simulation of the currents involved in rhythmic oscillations in thalamic relay neurons. *Journal of neurophysiology* **68**, 1373-1383 (1992).
- 28 Buzsaki, G. *Rhythms of the Brain*. (Oxford University Press, Inc, 2006).
- 29 McCormick, D. A. & Feuser, H. R. Functional implications of burst firing and single spike activity in lateral geniculate relay neurons. *Neuroscience* **39**, 103-113, doi:10.1016/0306-4522(90)90225-s (1990).
- 30 Steriade, M. & Contreras, D. Relations between cortical and thalamic cellular events during transition from sleep patterns to paroxysmal activity. *The Journal of neuroscience* **15**, 623-642 (1995).
- 31 Gorji, A., Mittag, C., Shahabi, P., Seidenbecher, T. & Pape, H. C. Seizure-related activity of intralaminar thalamic neurons in a genetic model of absence epilepsy. *Neurobiology of disease* **43**, 266-274, doi:10.1016/j.nbd.2011.03.019 (2011).
- 32 Blumenfeld, H. Cellular and network mechanisms of spike-wave seizures. *Epilepsia* **46 Suppl 9**, 21-33, doi:10.1111/j.1528-1167.2005.00311.x (2005).
- 33 Sorokin, J. M. *et al.* Bidirectional Control of Generalized Epilepsy Networks via Rapid Real-Time Switching of Firing Mode. *Neuron* **93**, 194-210, doi:10.1016/j.neuron.2016.11.026 (2017).
- 34 McAlonan, K. & Brown, V. J. The thalamic reticular nucleus: more than a sensory nucleus? *Neuroscientist* **8**, 302-305 (2002).

- 35 Llinas, R. R. & Pare, D. Of dreaming and wakefulness. *Neuroscience* **44**, 521-535 (1991).
- 36 Ortuno, T., Grieve, K. L., Cao, R., Cudeiro, J. & Rivadulla, C. Bursting thalamic responses in awake monkey contribute to visual detection and are modulated by corticofugal feedback. *Frontiers in behavioral neuroscience* **8**, 198, doi:10.3389/fnbeh.2014.00198 (2014).
- 37 Timofeev, I., Bazhenov, M., Sejneur, J. & Sejnowski, T. in *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies* (eds th *et al.*) (2012).
- 38 Crunelli, V. & Hughes, S. W. The slow (<1 Hz) rhythm of non-REM sleep: a dialogue between three cardinal oscillators. *Nature neuroscience* **13**, 9-17, doi:10.1038/nn.2445 (2010).
- 39 Steriade, M., Nunez, A. & Amzica, F. Intracellular analysis of relations between the slow (< 1 Hz) neocortical oscillation and other sleep rhythms of the electroencephalogram. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **13**, 3266-3283 (1993).
- 40 Sanchez-Vives, M. V. & McCormick, D. A. Cellular and network mechanisms of rhythmic recurrent activity in neocortex. *Nature neuroscience* **3**, 1027-1034, doi:10.1038/79848 (2000).
- 41 Timofeev, I. & Steriade, M. Low-frequency rhythms in the thalamus of intact-cortex and decorticated cats. *Journal of neurophysiology* **76**, 4152-4168, doi:10.1152/jn.1996.76.6.4152 (1996).
- 42 Hughes, S. W., Cope, D. W., Blethyn, K. L. & Crunelli, V. Cellular mechanisms of the slow (<1 Hz) oscillation in thalamocortical neurons in vitro. *Neuron* **33**, 947-958 (2002).
- 43 Crunelli, V., Errington, A. C., Hughes, S. W. & Toth, T. I. The thalamic low-threshold Ca(2)(+) potential: a key determinant of the local and global dynamics of the slow (<1 Hz) sleep oscillation in thalamocortical networks. *Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences* **369**, 3820-3839, doi:10.1098/rsta.2011.0126 (2011).
- 44 Crunelli, V., Toth, T. I., Cope, D. W., Blethyn, K. & Hughes, S. W. The 'window' T-type calcium current in brain dynamics of different behavioural states. *J Physiol* **562**, 121-129, doi:10.1113/jphysiol.2004.076273 (2005).
- 45 Blethyn, K. L., Hughes, S. W., Toth, T. I., Cope, D. W. & Crunelli, V. Neuronal basis of the slow (<1 Hz) oscillation in neurons of the nucleus reticularis thalami in vitro. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **26**, 2474-2486, doi:10.1523/JNEUROSCI.3607-05.2006 (2006).
- 46 Bazhenov, M., Timofeev, I., Steriade, M. & Sejnowski, T. Spiking-bursting activity in the thalamic reticular nucleus initiates sequences of spindle oscillations in thalamic networks. *Journal of neurophysiology* **84**, 1076-1087, doi:10.1152/jn.2000.84.2.1076 (2000).
- 47 Astori, S. *et al.* The Ca(V)3.3 calcium channel is the major sleep spindle pacemaker in thalamus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 13823-13828, doi:10.1073/pnas.1105115108 (2011).
- 48 Luthi, A. Sleep Spindles: Where They Come From, What They Do. *Neuroscientist* **20**, 243-256, doi:10.1177/1073858413500854 (2014).

- 49 Beenhakker, M. P. & Huguenard, J. R. Neurons that fire together also conspire together: is normal sleep circuitry hijacked to generate epilepsy? *Neuron* **62**, 612-632, doi:10.1016/j.neuron.2009.05.015 (2009).
- 50 Bal, T. & McCormick, D. A. What stops synchronized thalamocortical oscillations? *Neuron* **17**, 297-308, doi:10.1016/s0896-6273(00)80161-0 (1996).
- 51 CURRO DOSSI, R., ANGEL NUNEZ AND MIRCEA STERIADE. ELECTROPHYSIOLOGY OF A SLOW (0.5-4 Hz) INTRINSIC OSCILLATION OF CAT THALAMOCORTICAL NEURONES IN VIVO. *Journal of Physiology* (1991).
- 52 Amarillo, Y., Mato, G. & Nadal, M. S. Analysis of the role of the low threshold currents  $I_T$  and  $I_h$  in intrinsic delta oscillations of thalamocortical neurons. *Frontiers in computational neuroscience* **9**, 52, doi:10.3389/fncom.2015.00052 (2015).
- 53 Amarillo, Y., Tisone, A. I., Mato, G. & Nadal, M. S. Inward rectifier potassium current  $I_{Kir}$  promotes intrinsic pacemaker activity of thalamocortical neurons. *Journal of neurophysiology* **119**, 2358-2372, doi:10.1152/jn.00867.2017 (2018).
- 54 Crunelli, V. *et al.* Dual function of thalamic low-vigilance state oscillations: rhythm-regulation and plasticity. *Nature reviews. Neuroscience* **19**, 107-118, doi:10.1038/nrn.2017.151 (2018).
- 55 Lee, J., Kim, D. & Shin, H. S. Lack of delta waves and sleep disturbances during non-rapid eye movement sleep in mice lacking alpha1G-subunit of T-type calcium channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 18195-18199, doi:10.1073/pnas.0408089101 (2004).
- 56 Kim, D. *et al.* Lack of the burst firing of thalamocortical relay neurons and resistance to absence seizures in mice lacking alpha(1G) T-type  $Ca^{2+}$  channels. *Neuron* **31**, 35-45 (2001).
- 57 DENIS, W. A STUDY OF THALAMIC AND CORTICAL RHYTHMS IN PETIT MAL. (1953).
- 58 Avoli, M. A brief history on the oscillating roles of thalamus and cortex in absence seizures. *Epilepsia* **53**, 779-789, doi:10.1111/j.1528-1167.2012.03421.x (2012).
- 59 Huguenard, J. Current Controversy: Spikes, Bursts, and Synchrony in Generalized Absence Epilepsy: Unresolved Questions Regarding Thalamocortical Synchrony in Absence Epilepsy. *Epilepsy currents / American Epilepsy Society* **19**, 105-111, doi:10.1177/1535759719835355 (2019).
- 60 Kellaway, P. Sleep and epilepsy. *Epilepsia* **26 Suppl 1**, S15-30, doi:10.1111/j.1528-1157.1985.tb05720.x (1985).
- 61 von Krosigk, M., Bal, T. & McCormick, D. A. Cellular mechanisms of a synchronized oscillation in the thalamus. *Science* **261**, 361-364 (1993).
- 62 Destexhe, A., Bal, T., McCormick, D. A. & Sejnowski, T. J. Ionic mechanisms underlying synchronized oscillations and propagating waves in a model of ferret thalamic slices. *Journal of neurophysiology* **76**, 2049-2070, doi:10.1152/jn.1996.76.3.2049 (1996).
- 63 DeLorey, T. M. *et al.* Mice lacking the beta3 subunit of the GABAA receptor have the epilepsy phenotype and many of the behavioral characteristics of Angelman syndrome. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **18**, 8505-8514 (1998).

- 64 Gareri, P. *et al.* Antiabsence effects of carbenoxolone in two genetic animal models of absence epilepsy (WAG/Rij rats and lh/lh mice). *Neuropharmacology* **49**, 551-563, doi:10.1016/j.neuropharm.2005.04.012 (2005).
- 65 Leresche, N., Lambert, R. C., Errington, A. C. & Crunelli, V. From sleep spindles of natural sleep to spike and wave discharges of typical absence seizures: is the hypothesis still valid? *Pflugers Archiv : European journal of physiology* **463**, 201-212, doi:10.1007/s00424-011-1009-3 (2012).
- 66 Lee, J. *et al.* Sleep spindles are generated in the absence of T-type calcium channel-mediated low-threshold burst firing of thalamocortical neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 20266-20271, doi:10.1073/pnas.1320572110 (2013).
- 67 Lee, S. E. *et al.* Rebound burst firing in the reticular thalamus is not essential for pharmacological absence seizures in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, 11828-11833, doi:10.1073/pnas.1408609111 (2014).
- 68 Ernst, W. L., Zhang, Y., Yoo, J. W., Ernst, S. J. & Noebels, J. L. Genetic enhancement of thalamocortical network activity by elevating alpha 1g-mediated low-voltage-activated calcium current induces pure absence epilepsy. *The Journal of neuroscience* **29**, 1615-1625, doi:10.1523/JNEUROSCI.2081-08.2009 (2009).
- 69 Noebels, J. L. in *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies* (eds J. L. Noebels *et al.*) (2012).
- 70 Ludwig, A. *et al.* Absence epilepsy and sinus dysrhythmia in mice lacking the pacemaker channel HCN2. *The EMBO journal* **22**, 216-224, doi:10.1093/emboj/cdg032 (2003).
- 71 McCafferty, C. *et al.* Cortical drive and thalamic feed-forward inhibition control thalamic output synchrony during absence seizures. *Nature neuroscience* **21**, 744-756, doi:10.1038/s41593-018-0130-4 (2018).
- 72 H., S. S. *NONLINEAR DYNAMICS AND CHAOS*. (CRC Press, 2018).
- 73 Hodgkin, A. L. The local electric changes associated with repetitive action in a non-medullated axon. *J Physiol* **107**, 165-181, doi:10.1113/jphysiol.1948.sp004260 (1948).
- 74 Prescott, S. A., De Koninck, Y. & Sejnowski, T. J. Biophysical basis for three distinct dynamical mechanisms of action potential initiation. *PLoS computational biology* **4**, e1000198, doi:10.1371/journal.pcbi.1000198 (2008).
- 75 Mato, G. & Samengo, I. Type I and Type II Neuron Models Are Selectively Driven by Differential Stimulus Features. *Neural Comput* **20**, 2418-2440 (2008).
- 76 Izhikevich, E. M. Resonate-and-fire neurons. *Neural networks : the official journal of the International Neural Network Society* **14**, 883-894, doi:10.1016/s0893-6080(01)00078-8 (2001).
- 77 Matsumoto-Makidono, Y. *et al.* Ionic Basis for Membrane Potential Resonance in Neurons of the Inferior Olive. *Cell reports* **16**, 994-1004, doi:10.1016/j.celrep.2016.06.053 (2016).
- 78 Nolan, M. F., Dudman, J. T., Dodson, P. D. & Santoro, B. HCN1 channels control resting and active integrative properties of stellate cells from layer II of the entorhinal cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **27**, 12440-12451, doi:10.1523/JNEUROSCI.2358-07.2007 (2007).

- 79 Vera, J., Pezzoli, M., Pereira, U., Bacigalupo, J. & Sanhueza, M. Electrical resonance in the theta frequency range in olfactory amygdala neurons. *PloS one* **9**, e85826, doi:10.1371/journal.pone.0085826 (2014).
- 80 Uhlhaas, P. J. & Singer, W. Neural synchrony in brain disorders: relevance for cognitive dysfunctions and pathophysiology. *Neuron* **52**, 155-168, doi:10.1016/j.neuron.2006.09.020 (2006).
- 81 Ermentrout, B. *Simulating, Analyzing, and Animating Dynamical Systems: A Guide to Xppaut for Researchers and Students.*, (SIAM, 2002).
- 82 Hines, M. L. & Carnevale, N. T. The NEURON simulation environment. *Neural Comput* **9**, 1179-1209 (1997).
- 83 Moguilner, S. *Desarrollo y puesta a punto de un sistema de Dynamic-Clamp para el estudio de excitabilidad neuronal y comunicación inter-neuronal* Magister thesis, Instituto Balseiro, (2014).
- 84 Kemenes, I. *et al.* Dynamic clamp with StdpC software. *Nature protocols* **6**, 405-417, doi:10.1038/nprot.2010.200 (2011).
- 85 Portillo, J. *Análisis del efecto de la modulación de conductancias subumbrales sobre la excitabilidad de neuronas talamocorticales mediante el uso de dynamic clamp* Magister thesis, Instituto Balseiro, (2016).
- 86 Portillo, J., Dellavale, D., Nadal, M. S. & Amarillo, Y. CIRCUITO ELECTRÓNICO PARA SUMAR VOLTAJES, UTILIZADO EN EXPERIMENTOS DE REGISTRO DE LA ACTIVIDAD ELÉCTRICA DE NEURONAS CON TÉCNICAS COMBINADAS DE PATCH CLAMP Y DYNAMIC CLAMP. Argentina patent (2016).
- 87 Hibino, H. *et al.* Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiological reviews* **90**, 291-366, doi:10.1152/physrev.00021.2009 (2010).
- 88 Dhamoon, A. S. *et al.* Unique Kir2.x properties determine regional and species differences in the cardiac inward rectifier K<sup>+</sup> current. *Circulation research* **94**, 1332-1339, doi:10.1161/01.RES.0000128408.66946.67 (2004).
- 89 Wilson, C. J. The mechanism of intrinsic amplification of hyperpolarizations and spontaneous bursting in striatal cholinergic interneurons. *Neuron* **45**, 575-585 (2005).
- 90 McCormick, D. A. & Pape, H. C. Properties of a hyperpolarization-activated cation current and its role in rhythmic oscillation in thalamic relay neurons. *J Physiol* **431**, 291-318 (1990).
- 91 Zhu, J. J., Uhrich, D. J. & Lytton, W. W. Burst firing in identified rat geniculate interneurons. *Neuroscience* **91**, 1445-1460, doi:10.1016/s0306-4522(98)00665-4 (1999).
- 92 Hughes, S. W., Cope, D. W., Toth, T. I., Williams, S. R. & Crunelli, V. All thalamocortical neurons possess a T-type Ca<sup>2+</sup> 'window' current that enables the expression of bistability-mediated activities. *J Physiol* **517** ( Pt 3), 805-815 (1999).
- 93 Paz, R. M. *et al.* Levodopa Causes Striatal Cholinergic Interneuron Burst-Pause Activity in Parkinsonian Mice. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, doi:10.1002/mds.28516 (2021).
- 94 Hutcheon, B. & Yarom, Y. Resonance, oscillation and the intrinsic frequency preferences of neurons. *Trends Neurosci* **23**, 216-222 (2000).
- 95 Llinas, R. R. The intrinsic electrophysiological properties of mammalian neurons: insights into central nervous system function. *Science* **242**, 1654-1664 (1988).

- 96 Puil, E., Gimbarzevsky, B. & Miura, R. M. Quantification of membrane properties of trigeminal root ganglion neurons in guinea pigs. *Journal of neurophysiology* **55**, 995-1016, doi:10.1152/jn.1986.55.5.995 (1986).
- 97 Hu, H., Vervaeke, K. & Storm, J. F. Two forms of electrical resonance at theta frequencies, generated by M-current, h-current and persistent Na<sup>+</sup> current in rat hippocampal pyramidal cells. *J Physiol* **545**, 783-805 (2002).
- 98 Hutcheon, B., Miura, R. M., Yarom, Y. & Puil, E. Low-threshold calcium current and resonance in thalamic neurons: a model of frequency preference. *Journal of neurophysiology* **71**, 583-594 (1994).
- 99 Puil, E., Meiri, H. & Yarom, Y. Resonant behavior and frequency preferences of thalamic neurons. *Journal of neurophysiology* **71**, 575-582 (1994).
- 100 Erchova, I., Kreck, G., Heinemann, U. & Herz, A. V. Dynamics of rat entorhinal cortex layer II and III cells: characteristics of membrane potential resonance at rest predict oscillation properties near threshold. *J Physiol* **560**, 89-110, doi:10.1113/jphysiol.2004.069930 (2004).
- 101 Dreyfus, F. M. *et al.* Selective T-type calcium channel block in thalamic neurons reveals channel redundancy and physiological impact of I(T)window. *The Journal of neuroscience* **30**, 99-109, doi:10.1523/JNEUROSCI.4305-09.2010 (2010).
- 102 Santoro, B. & Shah, M. M. Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide-Gated Channels as Drug Targets for Neurological Disorders. *Annual review of pharmacology and toxicology* **60**, 109-131, doi:10.1146/annurev-pharmtox-010919-023356 (2020).
- 103 BoSmith, R. E., Briggs, I. & Sturgess, N. C. Inhibitory actions of ZENECA ZD7288 on whole-cell hyperpolarization activated inward current (I<sub>h</sub>) in guinea-pig dissociated sinoatrial node cells. *British journal of pharmacology* **110**, 343-349, doi:10.1111/j.1476-5381.1993.tb13815.x (1993).
- 104 Meuth, S. G. *et al.* Membrane resting potential of thalamocortical relay neurons is shaped by the interaction among TASK3 and HCN2 channels. *Journal of neurophysiology* **96**, 1517-1529 (2006).
- 105 Leresche, N., Hering, J. & Lambert, R. C. Paradoxical potentiation of neuronal T-type Ca<sup>2+</sup> current by ATP at resting membrane potential. *The Journal of neuroscience* **24**, 5592-5602, doi:10.1523/JNEUROSCI.1038-04.2004 (2004).
- 106 Narayanan, R. & Johnston, D. The h channel mediates location dependence and plasticity of intrinsic phase response in rat hippocampal neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **28**, 5846-5860, doi:10.1523/JNEUROSCI.0835-08.2008 (2008).
- 107 Johnston, D., Magee, J. C., Colbert, C. M. & Cristie, B. R. Active properties of neuronal dendrites. *Annu Rev Neurosci* **19**, 165-186, doi:10.1146/annurev.ne.19.030196.001121 (1996).
- 108 I, K. K. a. S. *Methods in Neuronal Modeling: From Ions to Networks*. second edition edn, (Bradford Book, 1999).
- 109 Gullledge, A. T., Kampa, B. M. & Stuart, G. J. Synaptic integration in dendritic trees. *Journal of neurobiology* **64**, 75-90, doi:10.1002/neu.20144 (2005).
- 110 Stuart, G. J. & Spruston, N. Dendritic integration: 60 years of progress. *Nature neuroscience* **18**, 1713-1721, doi:10.1038/nn.4157 (2015).
- 111 Magee, J. C. Dendritic integration of excitatory synaptic input. *Nature reviews. Neuroscience* **1**, 181-190, doi:10.1038/35044552 (2000).



- 112 Vaidya, S. P. & Johnston, D. Temporal synchrony and gamma-to-theta power  
conversion in the dendrites of CA1 pyramidal neurons. *Nature neuroscience* **16**,  
1812-1820, doi:10.1038/nn.3562 (2013).
- 113 Llinas, R. & Hess, R. Tetrodotoxin-resistant dendritic spikes in avian Purkinje cells.  
*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **73**,  
2520-2523, doi:10.1073/pnas.73.7.2520 (1976).
- 114 Llinás R, S. M. *Progress in Brain Research*. Vol. 51 (1979).
- 115 Stuart, G., Spruston, N., Sakmann, B. & Häusser, M. Action potential initiation and  
backpropagation in neurons of the mammalian CNS. *Trends Neurosci* **20**, 125-131,  
doi:10.1016/s0166-2236(96)10075-8 (1997).
- 116 Vetter P, R. A., Häusser M. Propagation of Action Potentials in Dendrites Depends  
on Dendritic Morphology. *J. Physiology* (2000).
- 117 Johnston, D., Hoffman, D. A., Colbert, C. M. & Magee, J. C. Regulation of back-  
propagating action potentials in hippocampal neurons. *Current opinion in  
neurobiology* **9**, 288-292, doi:10.1016/s0959-4388(99)80042-7 (1999).
- 118 Connelly W, C. V., Errington A. Passive Synaptic Normalization and Input Synchrony  
Dependent Amplification of Cortical Feedback in Thalamocortical Neuron Dendrites.  
*The Journal of Neuroscience* (2016).
- 119 Williams, S. R. & Stuart, G. J. Action potential backpropagation and somato-  
dendritic distribution of ion channels in thalamocortical neurons. *The Journal of  
neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **20**, 1307-1317  
(2000).
- 120 Zhou, Q., Godwin, D. W., O'Malley, D. M. & Adams, P. R. Visualization of calcium  
influx through channels that shape the burst and tonic firing modes of thalamic relay  
cells. *Journal of neurophysiology* **77**, 2816-2825, doi:10.1152/jn.1997.77.5.2816  
(1997).
- 121 Destexhe, A., Neubig, M., Ulrich, D. & Huguenard, J. Dendritic low-threshold  
calcium currents in thalamic relay cells. *The Journal of neuroscience* **18**, 3574-3588  
(1998).
- 122 Zomorodi, R., Kroger, H. & Timofeev, I. Modeling thalamocortical cell: impact of  
ca channel distribution and cell geometry on firing pattern. *Frontiers in  
computational neuroscience* **2**, 5, doi:10.3389/neuro.10.005.2008 (2008).
- 123 Errington, A. C., Renger, J. J., Uebele, V. N. & Crunelli, V. State-dependent firing  
determines intrinsic dendritic Ca<sup>2+</sup> signaling in thalamocortical neurons. *The Journal  
of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **30**, 14843-  
14853, doi:10.1523/JNEUROSCI.2968-10.2010 (2010).
- 124 Connelly W, C. V., Errington A. The Global Spike: Conserved Dendritic Properties  
Enable Unique Ca<sup>2+</sup> Spike Generation in Low-Threshold Spiking Neurons. *Journal of  
Neuroscience* (2015).
- 125 Turner, J. P. & Salt, T. E. Group II and III metabotropic glutamate receptors and the  
control of the nucleus reticularis thalami input to rat thalamocortical neurones in vitro.  
*Neuroscience* **122**, 459-469, doi:10.1016/j.neuroscience.2003.08.014 (2003).
- 126 Tisone, A. I., Portillo, J., Mato, G., Nadal, M. S. & Amarillo, Y. in *Latin American  
Conference on Mathematical Modeling of Biological Systems. Centro  
Latinoamericano de Formación Interdisciplinaria*.

- 127 Marder, E. & Taylor, A. L. Multiple models to capture the variability in biological neurons and networks. *Nature neuroscience* **14**, 133-138, doi:10.1038/nn.2735 (2011).
- 128 Alonso, L. M. & Marder, E. Visualization of currents in neural models with similar behavior and different conductance densities. *eLife* **8**, doi:10.7554/eLife.42722 (2019).
- 129 Willis, A. M., Slater, B. J., Gribkova, E. D. & Llano, D. A. Open-loop organization of thalamic reticular nucleus and dorsal thalamus: a computational model. *Journal of neurophysiology* **114**, 2353-2367, doi:10.1152/jn.00926.2014 (2015).
- 130 Bal, T., von Krosigk, M. & McCormick, D. A. Synaptic and membrane mechanisms underlying synchronized oscillations in the ferret lateral geniculate nucleus in vitro. *J Physiol* **483** ( Pt 3), 641-663 (1995).
- 131 Destexhe, A. Spike-and-wave oscillations based on the properties of GABAB receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **18**, 9099-9111 (1998).
- 132 Knox, A. T., Glauser, T., Tenney, J., Lytton, W. W. & Holland, K. Modeling pathogenesis and treatment response in childhood absence epilepsy. *Epilepsia* **59**, 135-145, doi:10.1111/epi.13962 (2018).
- 133 Crunelli, V. & Leresche, N. A role for GABAB receptors in excitation and inhibition of thalamocortical cells. *Trends Neurosci* **14**, 16-21, doi:10.1016/0166-2236(91)90178-w (1991).
- 134 Kim, U., Sanchez-Vives, M. V. & McCormick, D. A. Functional dynamics of GABAergic inhibition in the thalamus. *Science* **278**, 130-134, doi:10.1126/science.278.5335.130 (1997).
- 135 Huguenard, J. R. & Prince, D. A. Intrathalamic rhythmicity studied in vitro: nominal T-current modulation causes robust antioscillatory effects. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **14**, 5485-5502 (1994).
- 136 Pinault, D. The thalamic reticular nucleus: structure, function and concept. *Brain research. Brain research reviews* **46**, 1-31, doi:10.1016/j.brainresrev.2004.04.008 (2004).
- 137 Danober L, D. A., Depaulis M, Vergnes M, Marescaux C. PATHOPHYSIOLOGICAL MECHANISMS OF GENETIC ABSENCE EPILEPSY IN THE RAT. *Elsevier Scienc* (1997).
- 138 Song, I. *et al.* Role of the alpha1G T-type calcium channel in spontaneous absence seizures in mutant mice. *The Journal of neuroscience* **24**, 5249-5257, doi:10.1523/JNEUROSCI.5546-03.2004 (2004).
- 139 Coulter, D. A., Huguenard, J. R. & Prince, D. A. Characterization of ethosuximide reduction of low-threshold calcium current in thalamic neurons. *Annals of neurology* **25**, 582-593, doi:10.1002/ana.410250610 (1989).
- 140 Crunelli, V. & Leresche, N. Block of Thalamic T-Type Ca(2+) Channels by Ethosuximide Is Not the Whole Story. *Epilepsy currents / American Epilepsy Society* **2**, 53-56, doi:10.1046/j.1535-7597.2002.00024.x (2002).
- 141 Leresche, N. *et al.* On the action of the anti-absence drug ethosuximide in the rat and cat thalamus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **18**, 4842-4853 (1998).

- 142 Huang, C. W. & Kuo, C. C. Flow- and voltage-dependent blocking effect of ethosuximide on the inward rectifier K (Kir2.1) channel. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, doi:10.1007/s00424-014-1611-2 (2014).

## Publicaciones asociadas

1. **Tissone AI**; Vidal V; Nadal M; Mato G; Amarillo Y; Diferencial contribution of the subthreshold operating currents  $I_T$ ,  $I_h$  and  $I_{K_{ir}}$  to the resonance of thalamocortical neurons. J. Neurophysiol. DOI: 10.1152/jn.00147.2021. Año: 2021.
2. Amarillo Y, **Tissone AI**, Mato G and Nadal MS. The inward rectifier potassium current  $I_{K_{ir}}$  promotes the intrinsic pacemaker activity of thalamocortical neurons. J. Neurophysiol. 2018 Jun 1. 119(6):2358- 2372. DOI: doi.org/10.1152/jn.00867. Año: 2017.
3. XXXV Congreso Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencias. Modalidad Virtual, 7 al 9 de octubre 2020. E-poster: Intrinsic membrane properties modulate the GABA<sub>B</sub> mediated synchronization entrainment of thalamocortical neurons. **A. Tissone**, German Mato and Y Amarillo.
4. XXXIII Congreso Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencias. Córdoba. Octubre 2018. Póster: Effect of inhomogeneous sub celular distribution of ion conductances on the oscillatory activity of thalamocortical neurons. **A. Tissone**, G. Mato, M. Nadal and Y. Amarillo.
5. XXXII Congreso Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencias. Mar del Plata. Septiembre 2017. Póster: The role of the inward rectifier potassium current  $I_{K_{ir}}$  in the intrinsic pacemaker activity of thalamocortical neurons. **A. Tissone**, G. Mato, M. Nadal and Y. Amarillo.
6. 2nd FALAN Congress 2016. Buenos Aires. Octubre 2016. Organizado por la Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencias (SAN). Póster: The inward rectifier potassium current  $I_{K_{ir}}$  induces rhythmic burst firing in thalamocortical neurons. **A. Tissone**, G. Mato, J. Portillo, M. Nadal and Y. Amarillo.
7. XIV Congreso Regional de Física Estadística y Aplicaciones a la Materia Condensada (XIV TREFEMAC). Centro Atómico Bariloche, Instituto Balseiro. Mayo 2016. Póster: Comprobación experimental en neuronas talamocorticales de ratón del efecto ritmogénico de la corriente  $K_{ir}$  en el disparo repetitivo en ráfagas en la banda delta. **A. Tissone**, G. Mato, J. Portillo, M. Nadal, Y. Amarillo.

## Agradecimientos

Cuando estaba finalizando esta tesis, apurada como de costumbre, me llamo por teléfono mi papá. Le conté lo que estaba haciendo y me dijo – que orgullo hijita, para vos, para mí- ahí caí, y me dio un no sé qué.

Así decidí empezar los agradecimientos, primero a mis viejos. Gracias mamá por luchar por nosotros, por permitirnos ir a estudiar y por siempre creer en mí. A vos, cuyos ojos se cerraron al igual que tantos otros en esta pandemia –como dice el tango- mientras el mundo siguió andando, te dedicó mi tesis. También a vos papá un laborador humilde e incansable.

Gracias a mis hermanos Nicolás, Gisela y Gabriel, por acompañarme a cada paso en mis estudios, cada uno a su manera colaboró para que yo llegue hasta acá, pienso en rezongos porque estudié más por parte de Nicolás, consejos sabios de Gisela y, a Gabriel lo veo sentado al lado mío cebándome mates y haciéndome compañía durante las largas horas de estudio.

Tuve la suerte de conocer en el ingreso a mi carrera un grupete hermoso de amigas (la grupa cómo se les gusta llamarla); a todas ustedes gracias amiguitas, cómo la luchamos. A she y a ye, gracias mis amigas del alma, sin su compañía constante en este año tan triste no hubiese podido terminar.

No tuve la suerte de tener compañeros durante el doctorado, pero a cambio tuve la enorme fortuna de tener a Yimy como director. GRACIAS Yimy, gracias, gracias. Por entenderme, por ayudarme a resolver mis inseguridades en el laburo del día a día, por darme confianza en que podía y, por la enorme paciencia para enseñar y escuchar.

Gracias Germán por la paciencia y la dedicación para enseñarle a esta cabeza dura, por las tardes luchando para que el programa funcione. También, gracias Marcela por ser mi codirectora y por el aporte valioso a nuestros escritos.

Por último, gracias a mi familia de acá. Me acompañas desde largo tiempo, viviste cada uno de mis pasos desde que éramos jóvenes estudiantes en la universidad hasta recibirnos, y luego el doctorado. Me apoyaste siempre, gracias mi compañero. ¡A mis tres gorditas hermosas, gracias! Y no me voy a olvidar de mi suegra, genia, siempre dando una mano, me acompañaste a cursos y congresos incontables, cuando sí o sí tenía que viajar con alguna de mis niñas, al igual que mi mamá, sin ustedes, sin su ayuda y acompañamiento, anda a saber cómo hubiesen resultados las cosas.

Gracias.

## **Artículo de respaldo**

## **The inward rectifier potassium current $I_{Kir}$ promotes the intrinsic pacemaker activity of thalamocortical neurons**

Yimy Amarillo<sup>1,3,\*</sup>, Angela I. Tissone<sup>1,3,4</sup>, Germán Mato<sup>2,3</sup> & and Marcela S. Nadal<sup>1,3,4,\*</sup>

1. Departamento de Física Médica. Centro Atómico Bariloche and Instituto Balseiro. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Av. E. Bustillo 9500. (8400) S. C. Bariloche (Río Negro) Argentina.

2. Departamento de Física Médica. Centro Atómico Bariloche and Instituto Balseiro. Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA). Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Av. E. Bustillo 9500. (8400) S. C. Bariloche (Río Negro) Argentina.

3. Gerencia de Área Investigación y Aplicaciones no Nucleares. Gerencia de Física. Departamento Sistemas Complejos y Altas energías. División Física Estadística e Interdisciplinaria. Centro Atómico Bariloche, S. C. Bariloche (Río Negro) Argentina.

4. Universidad Nacional del Comahue. Centro Regional Universitario Bariloche. S. C. Bariloche (Río Negro) Argentina.

Keywords: Kir Channels; Thalamocortical Neurons; Repetitive Burst Firing; Sub-threshold Conductances

Running Head:  $I_{Kir}$  promotes the intrinsic pacemaker activity of TC neurons

\* Correspondence:

Yimy Amarillo

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

Física Estadística e Interdisciplinaria

Centro Atómico Bariloche

Avenida Bustillo 9500

San Carlos de Bariloche, Río Negro, Argentina

[amarillo@cab.cnea.gov.ar](mailto:amarillo@cab.cnea.gov.ar)

[Marcela S Nadal](#)

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

Física Estadística e Interdisciplinaria

Centro Atómico Bariloche

Avenida Bustillo 9500

San Carlos de Bariloche, Río Negro, Argentina

[Marcela.nadal@cab.cnea.gov.ar](mailto:Marcela.nadal@cab.cnea.gov.ar)

## **ABSTRACT**

Slow repetitive burst firing by hyperpolarized thalamocortical (TC) neurons correlates with global slow rhythms ( $< 4$  Hz), which are the physiological oscillations during N-REM sleep, or pathological ones during idiopathic epilepsy. The pacemaker activity of TC neurons depends on the expression of several subthreshold conductances, which are modulated in a behaviorally dependent manner. Here we show that up-regulation of the small and neglected inward rectifier potassium current  $I_{Kir}$  induces repetitive burst firing at slow and delta frequency bands. We demonstrate this in mice TC neurons in brain slices by manipulating the Kir maximum conductance with dynamic clamp. We also performed a thorough theoretical analysis that explains how the unique properties of  $I_{Kir}$  enable this current to induce slow periodic bursting in TC neurons. We describe a new ionic mechanism based on the voltage and time-dependent interaction of  $I_{Kir}$  and  $I_h$  that bestows TC neurons with the ability to oscillate spontaneously at very low frequencies, even below 0.5 Hz. The bifurcation analysis of conductance based models of increasing complexity demonstrates that  $I_{Kir}$  induces bistability of the membrane potential at the same time that induces sustained oscillations in combination with  $I_h$  and increases the robustness of  $I_T$  mediated oscillations.

## **NEW AND NOTEWORTHY**

The strong-inwardly-rectifying potassium current  $I_{Kir}$  of thalamocortical neurons displays a region of negative slope conductance in the current/voltage relationship that generates potassium currents activated by hyperpolarization. Bifurcation analysis shows that  $I_{Kir}$  induces bistability of the membrane potential; generates sustained subthreshold oscillations by interacting with the hyperpolarization activated cationic current  $I_h$ ; and increases the robustness of oscillations mediated by the low threshold activated calcium current  $I_T$ . Up-regulation of  $I_{Kir}$  in thalamocortical neurons induces repetitive burst firing at slow and delta frequency bands ( $< 4$ Hz).



## INTRODUCTION

Generation and maintenance of the global brain rhythms in the slow and delta bands ( $< 4$  Hz) that characterize N-REM (non-rapid eye movement) sleep and idiopathic epilepsies are associated with the intrinsic oscillatory behavior of thalamocortical (TC) neurons in the thalamus (Curro-Dossi et al. 1992; McCormick and Pape 1990b; Soltesz et al. 1991; Steriade and Contreras 1995). Depending on the level of their resting membrane potential, these neurons display two firing modes that correlate with distinct behavioral states. During the waking, alert states, TC neurons are depolarized and fire action potentials tonically at variable frequencies (Steriade et al. 1996), which are synchronized over specific thalamocortical circuits (Buzsaki 2006). In contrast, a large-scale synchronization of sustained, low-frequency oscillations characterizes unconscious states like slow-wave sleep (Steriade 1997) and absence seizures (Steriade and Contreras 1995). The slow rhythms ( $< 4$  Hz) that characterize these physiological and pathological states are correlated with repetitive burst firing by hyperpolarized thalamocortical neurons (Steriade and Contreras 1995). At subthreshold membrane potentials, TC neurons fire repetitive bursts of action potentials thanks to a unique set of ion conductances, including the essential calcium current  $I_T$  that generates low threshold spikes (LTS) (Amarillo et al. 2014). Electrophysiological studies on genetically modified animals also link the mechanisms that control the subthreshold excitability and the repetitive burst firing of TC neurons with the expression of sleep rhythms and epileptic oscillations. For example, there is a large decrease of delta oscillations during N-REM sleep in mice that lack the ion channel subunit (Cav3.1) responsible for the low threshold calcium current  $I_T$  (Lee et al. 2004), which is essential for the intrinsic oscillations in TC neurons. On the other hand, either overexpression of the  $I_T$  current, or elimination of the hyperpolarization activated cationic current  $I_h$ —another important current that controls the excitability of TC neurons (Amarillo et al. 2015; Amarillo et al. 2014)—, results in a phenotype of absence epilepsy characterized by spike and wave discharges at about 3 Hz (Ernst et al. 2009; Ludwig et al. 2003).

From a theoretical point of view, the minimal requirements to generate membrane potential oscillations are the combination of an amplifying variable and a resonant variable in the presence of leak conductances (Hutcheon and Yarom 2000; Izhikevich 2005). The biophysical properties of the T-type calcium channels allow for spontaneous, subthreshold oscillations, since  $I_T$  behaves as both an amplifying current (through the activation gate  $m_T$ ) and a resonant current (through the inactivation gate  $h_T$ ) (Amarillo et al. 2015). The bifurcation analysis of the minimal  $I_T$ -Leaks model of TC neurons uncovered the dynamic interplay of these two variables in the generation and maintenance of intrinsic oscillations in the delta band (Amarillo et al. 2015).

Besides  $I_T$  and the potassium and sodium leak currents, another four subthreshold conductances modulate and control the propensity of TC neurons to oscillate at low frequencies (Amarillo et al. 2014). The interaction of the voltage and time dependent properties of these seven ion channels establishes the sequence of events that underlie the generation and maintenance of repetitive burst firing in TC neurons (Amarillo et al. 2014). We demonstrated that  $I_h$  has a stabilizing role in the oscillations, since it amplifies the range of membrane voltage at which the oscillations can occur (Amarillo et al. 2015). Our analysis also suggested that the inward rectifier potassium current  $I_{Kir}$  (largely mediated by Kir2.2 channels in TC neurons; Amarillo et al. 2014), promotes the periodicity of  $I_T$ -mediated burst firing by potentiating inter-burst hyperpolarizations (Amarillo et al. 2014).  $I_{Kir}$  behaves as a hyperpolarization-activated outward current due to the existence of a negative slope region in the current/voltage relationship. In this negative slope conductance region, displacements of the membrane potential in the hyperpolarizing direction produce the regenerative activation (unblock) of  $I_{Kir}$ , and thereby, regenerative hyperpolarization. Progressive hyperpolarization removes inactivation of  $I_T$  at the same time that induces activation of  $I_h$ , which brings the membrane potential back to the region

of activation of  $I_T$ . Here we show that an increase (introduced with dynamic clamp) in Kir maximum conductance in TC neurons recorded from mouse brain slices, elicits oscillations at delta and slow frequencies in all the recorded neurons. This suggests that up-regulation of  $I_{Kir}$  in TC neurons could amplify the natural resonance of TC neurons at burst firing frequencies, thereby increasing the propensity of the thalamocortical system to synchronize at these slow frequencies. This mechanism could take place physiologically during N-REM sleep, or pathologically, during epilepsy.

## METHODS

### *Computational modeling*

For this study, we used Hodgkin and Huxley-like equations similar to those used previously (Amarillo et al. 2014). Bifurcation analysis and phase plane portrait analysis were performed using XPPAUT (Ermentrout 2002), using absolute values of maximum conductance or permeability (in nS or  $\text{cm}^3/\text{s}$ , respectively). Time course simulations were performed using the NEURON environment (Hines and Carnevale 1997), where per unit area values were used (in  $\text{S}/\text{cm}^2$  or  $\text{cm}/\text{s}$ , respectively). The interconversion between absolute and per unit area values was carried out considering a total capacitance of 0.2 nF for all model cells. In table I we report the absolute values. Time course simulations were performed assuming a temperature of  $28^\circ\text{C}$  (to match the temperature of the *in vitro* recordings), and the equations of time dependence (time constants) were adjusted accordingly by using the reported  $Q_{10}$  conversion factors (Table I).

The voltage equations have the form:

$$dV/dt = (I_{inj} - \Sigma I_i) / C \quad (1)$$

where  $I_{inj}$  is the magnitude of injected current,  $C$  is the capacitance, and  $\Sigma I_i$  is the sum of all ionic currents as follows:  $\Sigma I_i = I_{Kir} + I_{Kleak} + I_{Naleak}$  for the minimal  $I_{Kir}$ -Leaks model;  $\Sigma I_i = I_{Kir} + I_h + I_{Kleak} + I_{Naleak}$  for the minimal  $I_{Kir}$ - $I_h$ -Leaks model;  $\Sigma I_i = I_{Kir} + I_h + I_T + I_{Kleak} + I_{Naleak}$  for the  $I_{Kir}$ - $I_h$ - $I_T$ -Leaks model; and  $\Sigma I_i = I_{Kir} + I_h + I_T + I_A + I_{NaP} + I_{Na} + I_K + I_L + I_{AHP} + I_{KCa} + I_{CAN} + I_{Kleak} + I_{Naleak}$  for the more complete model that includes subthreshold and suprathreshold operating conductances.

The current equations for all ionic currents, except the calcium currents  $I_T$  and  $I_L$ , have the form:

$$I_i = \bar{g}_i m_i^p(V,t) h_i^q(V,t) (V - E_i) \quad (2)$$

where  $I_i$  is a given ionic current;  $\bar{g}_i$  is the maximum conductance for current  $i$ ;  $m_i$  and  $h_i$  are the voltage and time dependent activation and inactivation variables for that current respectively;  $p$  and  $q$  are exponents;  $V$  is voltage and  $E_i$  is the reversal potential for that current. Activation of currents  $I_{Kir}$ ,  $I_{NaP}$ ,  $I_{AHP}$  and  $I_{KCa}$  was assumed to be instantaneous therefore, for these currents the time dependent  $m_i^p(V,t)$  variable was replaced by  $m_{i\infty}^p(V)$  in equation (2).

To eliminate the negative slope conductance region in the simulated steady state  $I/V$  relationship of  $I_{Kir}$  (Fig 4A), we modified the original Boltzmann equation that was obtained by fitting experimental data (table I) and replaced it by:

$$m_{i\infty} = 0.9 / (1 + \exp[(V + 97.9) / 9.7]) + 0.1 \quad (3)$$

Current equations for the calcium currents are:

$$I_i = p_i m_i^p h_i^q G(V, Ca_o, Ca_i) \quad (4)$$

where  $p_i$  is the maximum permeability,  $m_i$  and  $h_i$  are the activation and inactivation variables respectively and  $G(V, Ca_o, Ca_i)$  is the non-linear GHK function of potential and calcium concentration;

$$G(V, Ca_o, Ca_i) = z^2 F^2 V / RT (Ca_i - Ca_o \exp[-zFV/RT]) / (1 - \exp[-zFV/RT]), \quad (5)$$

where  $Ca_o$  and  $Ca_i$  are the extracellular and the intracellular concentrations of  $Ca^{++}$  and  $z$ ,  $F$ ,  $R$  and  $T$  are the valence, the Faraday constant, the gas constant and the absolute temperature, respectively. This constant field equation is used because of the large ratio between intra and extracellular calcium concentrations, and also because of the nonlinear and far-from-equilibrium behavior of calcium currents (Hille 2001).

The GHK formalism is not suitable to implement artificial  $I_T$  with dynamic clamp because it is not possible to control calcium concentrations. Hence, for the experiment with artificial  $I_T$  introduced by dynamic clamp, the current equation for  $I_T$  (Table I) was replaced by a Nernstian equation as it has been previously implemented (Hughes et al. 2009):

$$I_T = \bar{g}_T m_T^2 h_T (V - E_T) \quad (6)$$

where  $\bar{g}_T$  is the maximum conductance for  $I_T$  and  $E_T$  is the reversal potential for calcium ( $E_T = 130$  mV).

Equations for the activation and inactivation variables have the form:

$$dm_i/dt = (m_{i\infty}(V) - m_i)/\tau_{mi}(V) \quad (7)$$

$$dh_i/dt = (h_{i\infty}(V) - h_i)/\tau_{hi}(V) \quad (8)$$

where  $m_{i\infty}(V)$ ,  $h_{i\infty}(V)$ ,  $\tau_{mi}(V)$ ,  $\tau_{hi}(V)$  are the steady state and time constants of activation and inactivation for a given current  $I_i$ . The expressions for these steady state and time constants are given in table I, together with the default parameter values (those used in the last section of results). Parameter values subjected to analysis are specified in the main text of the results section and corresponding figure legends.

The calcium dependent potassium current  $I_{AHP}$  and the voltage and calcium dependent potassium current  $I_{KCa}$  were gated by the variation of intracellular calcium linked to activation of the high threshold calcium current  $I_L$ , whereas the calcium dependent cationic current  $I_{CAN}$  was gated by the variation of intracellular calcium linked to activation of  $I_T$ . Intracellular calcium dynamics, in turn, was modeled as previously (Amarillo et al 2014, McCormick and Huguenard 1992) using a simple diffusion model from a shell of 100 nm depth just beneath the plasma membrane with the dimensions of the model cell (22700  $\mu m^2$ ). The equation that describes this diffusion is:

$$dCa_i/dt = -(I_T \text{ or } I_L)/\text{depth}/F/2 (0.0000001) + (Ca_i0 - Ca_i)/\beta \quad (9)$$

where *depth* is the thickness of the shell, *F* is the faraday constant,  $Ca_i0$  is the initial calcium concentration (50 nM) and  $\beta$  is the diffusion rate (1 ms).

Addition of the calcium dependent cationic current  $I_{CAN}$  was necessary to reproduce the decaying plateau potentials that follow LTSs observed experimentally.  $I_{CAN}$  was adapted from (Zhu et al. 1999) with the parameters listed in table I.

#### *Slice preparation and electrophysiology*

All experiments were carried out in accordance with the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the Institutional Committee for the Care and Use of Laboratory Animals (CICUAL) of the National Atomic Energy Commission from Argentina (CNEA). All procedures for obtaining brain slices and for electrophysiological recording have been previously described (Amarillo et al. 2008; Amarillo et al. 2014).

Briefly, brain slices were prepared from 2 to 4 weeks old NIH Swiss mice. Following induction of deep anesthesia with pentobarbital sodium (50-75 mg/kg, ip), mice were decapitated and the brains removed into an ice-cold oxygenated artificial cerebrospinal fluid (ACSF) that contained (in mM) 126 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub> and 10 dextrose. The brain was blocked at a coronal plane and 350  $\mu$ m-thick slices were cut using a manual vibroslicer (WPI, Sarasota, FL, USA). Slices including the ventrobasal thalamic nuclei were incubated at 30°C for 1 hour and thereafter maintained at room temperature in oxygenated ACSF (95% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>) until they were transferred to the recording chamber continuously perfused with oxygenated ACSF.

Neurons from ventrobasal thalamic nuclei (ventral posterolateral and ventral posteromedial nucleus) were visualized using a CCD camera (Panasonic, Newark, NJ, USA) mounted on a Carl Zeiss Axioskop FSII plus fixed-stage microscope (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany) equipped with IR-DIC optics. Patch pipettes were made from borosilicate glass in a Sutter P-1000 horizontal puller (Sutter Instrument Company, Novato, CA, USA) with resistances between 2 and 5 M $\Omega$  and filled with an intracellular solution containing (in mM) 119 CH<sub>3</sub>KO<sub>3</sub>S, 12 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 0.1 CaCl<sub>2</sub>, 1 EGTA, 10 HEPES, 0.4 Na-GTP, 2 Mg-ATP, pH 7.4. Neurons were recorded in fast current clamp mode using an Axoclamp 700B amplifier (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) after stabilization of the resting membrane potential. Recordings were low pass filtered at 10 KHz, pipette capacitance was canceled and bridge balance compensated. A sampling rate of 10 kHz was used; data was acquired on a personal computer using the PClamp10 software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) and stored for further analysis.

#### *Dynamic clamp*

Dynamic clamp was implemented using a dedicated DAQ card PCIe-6351 (National Instruments, Austin, TX, USA) that was commanded by the open source software StdpC under the Windows 7 OS (Kemenes et al. 2011). The analog output of the Multiclamp 700B amplifier was connected to analog inputs on both the acquisition card Digidata 1440a (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) and the dynamic clamp card PCIe-6351. This signal was used to track the membrane potential with the acquisition software PClamp10 as well as the voltage input for implementing the dynamic clamp loop. Analog outputs of the two interface cards were connected to a custom-made real time voltage summing device (Patent P20170101319, CONICET, Argentina), whose output was connected, in turn, to the analog input of the amplifier. This configuration allows us to simultaneously perform current clamp protocols with the PClamp10 software and dynamic clamp simulations with the StdpC software, in the Multiclamp 700B amplifier.

## **RESULTS**

### *The unique biophysical properties of $I_{Kir}$ induce bistability of the membrane potential*

The inward rectification profiles of potassium channels of the Kir2.X family show a distinctive region of negative slope in the current/voltage relationship (Dhamoon et al. 2004). This property of Kir channels is produced by the voltage dependent block of the channel pore by intracellular  $Mg^{2+}$  and polyamines (reviewed in Anumonwo and Lopatin 2010). We have previously identified Kir2.2 as the main ion channel subunit responsible for  $I_{Kir}$  in thalamocortical neurons (Amarillo et al. 2014). Currents produced by Kir2.2 channels in heterologous systems show the strongest voltage dependent inward rectification compared to those produced by Kir 2.1 and Kir 2.3 channels (Dhamoon et al. 2004). Accordingly, thalamocortical neurons display a fast inward rectification that is not present on TC cells from Kir2.2 KO mice or when Kir channels are blocked by low concentrations of barium (10-50  $\mu M$ ) (Amarillo et al. 2014).

In TC neurons from mice, the shape of the total subthreshold steady state I/V curve is determined by the combined contribution of seven conductances (Amarillo et al. 2014). We started by analyzing a model that includes  $I_{Kir}$  (modeled based on data from thalamocortical neurons from mice –Amarillo et al. 2014–) and the potassium and sodium leak conductances. The steady state I/V relationship for the leaks alone (Fig 1A, dashed trace) is linear; whereas the steady state I/V relationship for  $I_{Kir}$  shows strong inward rectification and a negative slope conductance region between  $-85mV$  and  $-60mV$  (Fig 1A, dotted trace). For certain combination of conductance values of Kir and leaks (see figure legend), the I/V curve of this  $I_{Kir}$ -Leaks minimal model is non-monotonic (Fig 1A, solid black trace), and the steady state I/V curve crosses the zero current axis at three values of membrane potential (Fig 1A, dots). For a one dimensional system, this I/V curve gives rise to a saddle-node bifurcation (S-N) (Izhikevich 2005) with two stable equilibrium points (Fig 1A, a and c) separated by one unstable equilibrium point (Fig 1A, b). The consequence of this dynamical property is the expression of membrane potential bistability. Fig 1B shows the simulated evolution in time of the membrane potential for the  $I_{Kir}$ -Leaks minimal model for six different initial  $V_m$  values, around the unstable equilibrium point. For the three initial values that are above the unstable point ( $-74.6 mV$ ), the membrane potential evolves towards the depolarized stable equilibrium ( $-57.7 mV$ ), whereas for the other three values, the membrane potential stabilizes at the hyperpolarized stable equilibrium ( $-87.2 mV$ ). This bistability is further evidenced when shown *vis a vis* the bifurcation diagram of the  $I_{Kir}$ -Leaks model at injected current = 0 (Fig 1B, right). The physiological modulation of the potassium leak current by neurotransmitters is considered the mechanism that controls the resting membrane potential of thalamocortical neurons (McCormick and Prince 1987; 1988). For this reason, we analyzed the effect of varying the potassium leak maximum conductance ( $\bar{g}_{Kleak}$ ) on the dynamical behavior of the  $I_{Kir}$ -Leaks model. Similarly to using current injection as the bifurcation parameter, changing  $\bar{g}_{Kleak}$  displays two saddle node bifurcation points and a region of instability in the bifurcation diagram (Fig 1C).

### *The interaction of amplifying $I_{Kir}$ and resonant $I_h$ generates sustained subthreshold oscillations*

The hyperpolarization activated cationic current ( $I_h$ ) plays an important role in establishing the resting membrane potential and modulating the oscillations mediated by the low threshold calcium current  $I_T$  in thalamocortical neurons (Amarillo et al. 2015; McCormick and Pape 1990b; Soltesz et al. 1991).  $I_h$  adds robustness to the repetitive low threshold spikes (LTSs) by potentiating the initial phase of depolarization. In addition, the resonant activation of  $I_h$  allows transient, negative excursions of the membrane potential between LTSs; without this recovering mechanism, the membrane potential would stabilize at the more negative total steady state conductance level (Amarillo et al. 2015).

The interaction of a resonant current such as  $I_h$  with an amplifying current such as  $I_{Kir}$  can theoretically support periodic subthreshold oscillations (Izhikevich 2005). In striatal

cholinergic interneurons, these two hyperpolarization-activated currents underlie the cyclic transient hyperpolarizations that generate the inter-bursts intervals in these neurons (Wilson 2005). In agreement with these results, we have previously shown that the  $I_{Kir}$ - $I_h$ -Leaks minimal model exhibits sustained oscillations (Amarillo et al. 2014). Fig 2A shows the time course of the changes in the membrane potential produced by this two dimensional model ( $dV/dt$  and  $dm_h/dt$ ) for a maximum conductance of  $Kir$  of 41 nS, and physiological values of maximum conductances of  $h$  and the leaks ( $\bar{g}_h = 5$  nS;  $\bar{g}_{Kleak} = 2.3$  nS;  $\bar{g}_{Naleak} = 0.7$  nS). At rest -with zero current injection- the membrane potential stabilizes at  $-82.66$ mV. The injection of a current of 60 pA induces robust periodic oscillations (black trace) that are not observed with injection of either 40 pA (black trace, damped oscillations) or 80 pA (gray traces). The phase plane portrait of these three conditions (Fig 2B) shows that: 1) the trajectory of the dampened oscillations (upper gray trajectory and V-nullcline) obtained with injection of 40 pA coalesces to a stable focus (s); 2) the orbit of the oscillations obtained with 60 pA (middle black trajectory and V-nullcline) enters a stable limit cycle around an unstable focus (u); and 3) the membrane potential stabilizes at a depolarized stable focus (s) when the current injection is 80 pA (lower gray trajectory and V-nullcline). In the three cases, the voltage and  $I_h$  activation nullclines ( $m_h$ , steady state activation curve for the  $h$  current) intersect in a single focus, which is either stable or unstable. This indicates that the transition from either of the two stable foci (s) to the unstable focus (u) occurs via a Hopf bifurcation, as shown in Fig 2C. The bifurcation diagram shows the two Hopf bifurcation points and the amplitude of the limit cycle as the current injection changes (the dots indicate the max/min of the limit cycle). At the bifurcation points, the gradually increasing/decreasing amplitude of the limit cycle indicates that both transitions occur via supercritical Hopf bifurcations.

As mentioned in the previous section, physiological changes in  $\bar{g}_{Kleak}$  induce changes in the resting membrane potential of thalamocortical neurons. To examine the range of values of  $\bar{g}_{Kleak}$  that induces oscillations, we performed the bifurcation analysis using  $\bar{g}_{Kleak}$  as the bifurcation parameter (Fig 2D). The system enters a stable limit cycle via a supercritical Hopf as  $\bar{g}_{Kleak}$  is decreased. Between this bifurcation point ( $\bar{g}_{Kleak} \approx 1.1$  nS) and a  $\bar{g}_{Kleak}$  value of  $\approx 0.4$  nS, the membrane potential is unstable. At this last point, the limit cycle disappears via a saddle-node on invariant circle bifurcation (S-NIC). This last bifurcation allows the system to undergo oscillations at low frequencies (Izhikevich 2005), providing a possible mechanism to generate physiological or pathological slow rhythms ( $< 1$  Hz) (Fig 2D: inset).

### *Effect of $I_{Kir}$ on the dynamics of a reduced model of thalamocortical neurons*

The low threshold calcium current  $I_T$  is absolutely required for burst firing in thalamocortical neurons, as evidenced by both pharmacological (Dreyfus et al. 2010) and genetic ablation studies (Kim et al. 2001). The interaction between the amplifying activation variable  $m_T$  and the resonant inactivation variable  $h_T$  of  $I_T$  creates an oscillatory unit that can support sustained oscillations (repetitive LTSs, Amarillo et al. 2014; Hutcheon and Yarom 2000). The other subthreshold conductances expressed by thalamocortical neurons modulate the generation, repetitiveness, repolarization, frequency and voltage range of the LTSs produced by  $I_T$  (Amarillo et al. 2015; Amarillo et al. 2014).

In thalamocortical neurons, the oscillatory system formed by  $I_{Kir}$ - $I_h$  described in the previous section co-exists with the oscillatory system formed by the gating variables of  $I_T$ . We sought to examine how the interaction between the different modeled components of these two oscillatory systems impact on the dynamics of the membrane potential. We have previously shown that the depolarizing drive contributed by  $I_h$  in the  $I_T$ - $I_h$ -Leaks model not only adds to the regenerative activation of  $I_T$  during the ascending phase of the LTS, giving rise to larger and faster

oscillations, but it also permits the occurrence of LTSs at more hyperpolarized potentials (Amarillo et al. 2015). Including  $I_{Kir}$  (9 nS; Fig 3A, black diagram) in that model does not change the dynamical properties of the system, which transits between stability and instability via a subcritical Hopf bifurcation (sub. Hopf) at hyperpolarized potentials, and via a supercritical Hopf bifurcation (sup. Hopf) at depolarized levels, either in the presence or absence of  $I_{Kir}$  (Fig 3A, black or grey diagram, respectively). Yet, there are quantitative changes after addition of  $I_{Kir}$  to the  $I_T$ - $I_h$ -Leaks model: First, there is a positive shift in the range of current injections such that, in the presence of  $I_{Kir}$ , no current injection is required to produce maximum amplitude oscillations (see oscillations produced at zero current value -i.e., resting state- in Fig 3A, black diagram). These results indicate that  $I_{Kir}$  bestows the system with the ability to oscillate spontaneously at lower levels of  $I_T$  (see discussion). And second, the minimum value of permeability of  $I_T$  ( $p_T$ ) required to generate sustained LTSs decreases from  $12.8 \times 10^{-9} \text{ cm}^3/\text{s}$  to  $10.7 \times 10^{-9} \text{ cm}^3/\text{s}$ . When we performed the bifurcation analysis using the maximum permeability of  $I_T$  as the bifurcation parameter (for  $I = 0$ ), both in the presence and absence of  $I_{Kir}$ , we were able to visualize the effect of  $I_{Kir}$  on the range of permissive  $p_T$  values (i.e. values of  $p_T$  that allow sustained oscillations) (Fig 3B). Without current injection,  $p_T$  is permissive for values between  $12 \times 10^{-9} \text{ cm}^3/\text{s}$  and  $30 \times 10^{-9} \text{ cm}^3/\text{s}$  when using a  $\bar{g}_{Kir}$  of 9 nS (Fig 3B, black diagram); whereas in the absence of  $I_{Kir}$ , these permissive  $p_T$  values are between  $14 \times 10^{-9} \text{ cm}^3/\text{s}$  to  $22 \times 10^{-9} \text{ cm}^3/\text{s}$  (Fig 3B, gray diagram). The amplitude of the membrane potential oscillations is notably larger in the presence of  $I_{Kir}$ .

When using  $\bar{g}_{Kleak}$  as the bifurcation parameter without current injection, the system has two different dynamical behaviors depending on the magnitude of  $\bar{g}_{Kir}$ : At low levels of  $\bar{g}_{Kir}$  (9 nS), the transitions between rest and the limit cycle occur via Hopf bifurcations (Fig 3C, black diagram), similar to the behavior of the system in the absence of  $I_{Kir}$  (Fig 3C, gray diagram). Addition of low magnitudes of  $I_{Kir}$  again produces a quantitative effect by increasing the range of permissive values of  $\bar{g}_{Kleak}$ . On the other hand, for high values of  $\bar{g}_{Kir}$  (41 nS, Fig 3D), the limit cycle disappears via a S-NIC (saddle-node on invariant circle) bifurcation as  $\bar{g}_{Kleak}$  decreases. As mentioned above, this S-NIC bifurcation endows the system with the ability to oscillate at very slow frequencies. Curiously, for values of  $\bar{g}_{Kleak}$  infinitesimally close to the bifurcation point, the time course changes from the typical triangle shaped oscillations to oscillations with prolonged plateaus after the LTSs (Fig 3D, inset), as seen in recordings from rodent thalamocortical neurons *in vitro* (see below).

*The negative slope conductance region of the I/V curve is the key pro-oscillatory feature of IKir*

To confirm that the negative slope conductance region of the I/V curve of  $I_{Kir}$  is responsible for promoting the oscillatory behavior of the membrane potential of TC neurons, we examine the effect of eliminating this region of negative slope of the IV curve of  $I_{Kir}$  (Fig 4A) in the three models of increasing complexity described in the previous sections. As expected, bistability does not occur in the minimal  $I_{Kir}$ -leaks model with a modified Kir current that lacks the negative slope conductance region because in this case the IV curve is always monotonic (i.e., all the points are stable) (Fig 4A). The bifurcation analysis using this modified Kir in the  $I_{Kir}$ - $I_h$ -Leaks and  $I_{Kir}$ - $I_h$ - $I_T$ -Leaks models (Figs 4B and 4C, respectively) shows that no oscillations (limit cycles) are present when Kir lacks the negative slope conductance. A Kir conductance without negative slope is persistently active at depolarized membrane potentials, and hence, the slope of the  $V/I_{inj}$  curve decreases and flattens (Fig 4B and 4C, dotted line). To exclude the possibility that the lack of periodicity is due to an increased requirement of depolarizing current, we expanded the range of injected current and yet no limit cycle was observed (Fig 4B).

## *Increasing the maximum conductance of $I_{Kir}$ induces sustained repetitive burst firing in TC neurons from mice*

Recorded membrane potential of TC neurons from mice is stable at about  $-67$  mV. In recordings performed in brain slices from rodents, it is very rare to observe spontaneous repetitive bursting without manipulating the extracellular concentration of divalent ions and/or without stimulating the cortico-thalamic/reticulo-thalamic afferents (Jacobsen et al. 2001; Leresche et al. 1991; Warren et al. 1994). Moreover, in typical experiments in rodent brain slices, even sustained injection of current in the depolarizing or hyperpolarizing direction does not induce oscillations at subthreshold levels. Larger magnitudes of depolarizing current (suprathreshold depolarization) elicit either tonic firing or single burst firing depending on the membrane potential prior to the onset of the stimulus (holding potential). Either mode of firing is dependent on the level of inactivation of the low threshold calcium current  $I_T$ , which reflects the history of the membrane potential. At depolarized holding potentials, T channels are inactivated and the neuron responds with a train of action potentials at a frequency that correlates with the magnitude of the injected current. At holding potentials negative to about  $-65$  mV, T channels are increasingly de-inactivated and the neuron responds to a depolarizing input with a low threshold calcium spike (LTS), crowned by a burst of  $Na^+/K^+$ -mediated action potentials (see recordings of TC neurons from rodents elsewhere; for example, Amarillo et al. 2014; Kim et al. 2001; Llinas and Jahnsen 1982; Meuth et al. 2006; Zhu and Uhlich 1998). In order to test the predicted pro-oscillatory effect of  $I_{Kir}$ , we recorded 19 TC neurons in the ventrobasal nuclei of the thalamus from mice and manipulated the maximum conductance of  $K_{ir}$  with dynamic-clamp ( $d\bar{g}_{Kir}$ , see methods). In all tested cells, sole introduction of artificial  $I_{Kir}$  induces repetitive burst firing (examples from three different cells are shown in Fig 5A, Fig5B and Fig 7A). The range of minimal values of  $d\bar{g}_{Kir}$  that induced oscillations was 8 to 53nS, with a mean ( $\pm$  sd) of  $23.9 \pm 9.8$  nS (19 cells). The shape of the burst cycle changes depending on the magnitude of artificial  $\bar{g}_{Kir}$  introduced by dynamic clamp (Fig 5A, the arrow marks the onset of the dynamic clamp). For the minimal  $d\bar{g}_{Kir}$  that induces oscillations, the cycle consists of an initial hyperpolarization followed by a slow recovering depolarization that brings the membrane potential to the LTS threshold. Immediately after the LTS, the next cycle re-initiates with a similar sequence. In contrast, for larger  $d\bar{g}_{Kir}$  magnitudes, a plateau potential of varying lengths follows the LTSs, introducing a delay to the hyperpolarization that initiates the next cycle (Fig 5A, 24 and 30 nS). A similar response was obtained by varying the magnitude of injected hyperpolarizing current for a large value of  $d\bar{g}_{Kir}$  (50 nS, Fig 5B). The plateau potential is only observed for current injections around threshold level ( $-30$  pA), and not for larger hyperpolarizations ( $-60$  pA). A large hyperpolarization ( $-90$  pA) overpowers the amount of artificial  $d\bar{g}_{Kir}$  introduced by dynamic clamp and no subthreshold oscillations are observed (Fig 5B, bottom right).

We have previously estimated that the maximum conductance of native  $K_{ir}$  in most TC neurons is approximately 5 nS (Amarillo et al. 2014, yet there is significant variability among some cells). This was done by subtracting the I/V curves in presence and absence of barium, which is considered a specific blocker of  $K_{ir}$  2.X channels at low concentrations (Dhamoon et al. 2004; Schram et al. 2003). Here we used dynamic clamp to reinstate the endogenous levels of  $\bar{g}_{Kir}$  –and hence the fast inward rectification– in TC cells that have been treated with  $10 \mu M$  barium. Fig 5C shows that the characteristic fast rectification of TC neurons (control, upper left) is lost in the presence of  $10 \mu M$  barium (upper right), and it is subsequently reconstituted after re-introducing  $I_{Kir}$  with dynamic clamp (lower traces). In agreement with our previous estimations, the  $d\bar{g}_{Kir}$  magnitude that restores the fast inward rectification was 5 nS in two cells tested (one is shown in the lower left panel of Fig 5C) and 7 nS in another cell. A larger amount



(15 nS in this cell) bestows TC neurons with a stronger inward rectification (i.e. amplification of hyperpolarization; lower right) and slow oscillations (repetitive bursts are truncated by finalization of current injection steps in the lower right panel of Fig 5C). Fig 5D shows the I/V curves for the same TC neuron recorded in Fig 5C under the different conditions described above: control, 10  $\mu$ M barium and 10  $\mu$ M barium + 5 nS or 15nS  $d\bar{g}_{K_{ir}}$ .

### *Endogenous $I_{K_{ir}}$ promotes repetitive bursting in mouse TC neurons*

As mentioned above, TC neurons from mouse do not display slow intrinsically generated oscillations *in vitro* (in contrast to what is observed in carnivorous species such as cat and ferret). It has been previously shown that adding artificial  $I_T$  induces slow oscillations in all TC neurons recorded *in vitro* (Hughes et al. 2009), a finding that is consistent with theoretical predictions (Rush and Rinzel 1994; Amarillo et al. 2014; Amarillo et al. 2015). We implemented this method to induce oscillations in TC neurons from mouse in coronal slices (Fig 6). We introduced with dynamic clamp the minimal  $I_T$  maximum conductance that induces slow oscillations in the three TC neurons (40, 55 and 70 nS, the latter is shown in Fig 6) and tested whether these oscillations were sensitive to pharmacological blockade of  $I_{K_{ir}}$ . As expected, adding 10  $\mu$ M  $Ba^{++}$  eliminated the oscillations in all three cells. Furthermore, oscillations were rescued by adding physiological magnitudes of  $d\bar{g}_{K_{ir}}$  (5, 7 and 8 nS, respectively) (Fig 6). This result indicates that the intrinsic magnitude of  $\bar{g}_{K_{ir}}$  expressed by TC neurons from mice is able to promote slow oscillations when the appropriate balance among all the subthreshold conductances is provided. This is also consistent with the bifurcation analysis of the model that includes the two oscillatory systems,  $m_T$ - $h_T$  and  $I_{K_{ir}}$ - $I_h$  (Fig 3) in which the presence of low levels of  $I_{K_{ir}}$  increase the range of permissive values of  $p_T$ .

### *Role of $I_{K_{ir}}$ on the oscillatory behavior of TC neurons*

To further explore the mechanism by which increasing  $I_{K_{ir}}$  in rodent TC neurons induces repetitive burst firing, we examined the membrane potential time course of induced repetitive bursts (Fig 7A, upper trace), at the same time that we recorded the  $K_{ir}$  current injected by the dynamic clamp system (Fig 7A, lower trace). As expected from previous computational analysis (Amarillo et al. 2014),  $I_{K_{ir}}$  decreases as the membrane potential recovers towards the base of the LTS, reaching its minimal value during the LTSs and the bursts of action potentials. After the firing of the LTS, the magnitude of  $I_{K_{ir}}$  began to increase during the slow initial hyperpolarization that follows the LTS (plateau potential) until an inflection point (vertical dashed line in Fig 7A), at which the activation of  $I_{K_{ir}}$  becomes regenerative and thus increases abruptly to its maximum value. This is mirrored in the membrane potential by a sudden hyperpolarization, which removes the inactivation of  $I_T$  at the same time that induces the activation of  $I_h$ . To closely examine the interaction among  $I_{K_{ir}}$ ,  $I_h$  and the gating variables of  $I_T$  during this process, we used a more complete model of TC neurons –which includes all the subthreshold conductances as well as the suprathreshold conductances that generate and control  $Na^+/K^+$  spiking– to reproduce the time course of induced oscillations (Fig 7B and C, also see methods and table I). In order to test the possibility that  $I_{K_{ir}}$  could mediate the very slow oscillations and the plateau potentials observed experimentally by a mechanism involving a S-NIC bifurcation as in Figs 2D and 3D, we first try to reproduce the time course of the recorded oscillations combining large  $\bar{g}_{K_{ir}}$  values with low  $\bar{g}_{K_{leak}}$  values (Fig 7B, 34 nS and 0.3 nS, respectively). Indeed, we were able to generate both oscillations at frequencies below 0.2 Hz and large plateau potentials (Fig 7B). Yet, it was not possible to reproduce the exact shape of the plateaus by iteratively manipulating  $\bar{g}_{K_{ir}}$  and  $\bar{g}_{K_{leak}}$ . We then performed additional simulations including the cationic calcium activated current  $I_{CAN}$ , which is known to mediate

plateau potentials by producing an after-depolarization that decays slowly due to its slow deactivation (Hughes et al. 2002; Zhu et al. 1999). Including  $I_{CAN}$  in the model (Fig 7C, third trace) accurately and robustly reproduces the experimental traces for values of  $\bar{g}_{Kir}$  and  $\bar{g}_{Kleak}$  other than those underlying the S-NIC bifurcation ( $\bar{g}_{Kir} = 30$  nS and  $\bar{g}_{Kleak} = 2.5$  nS in Fig 7C, and data not shown). Using this set of parameters (see table 1), the modeled  $I_{Kir}$  (Fig 7C, second trace) reproduces the time course of the dynamic clamp injected current shown in Fig. 7A (second trace). The comparison with the time course of the gating variables of  $I_T$  (Fig 7C, bottom trace) shows that the abrupt amplification of hyperpolarization induced by  $I_{Kir}$  removes nearly 100% of the inactivation of  $I_T$  ( $h_T$  increases, solid trace). This hyperpolarization also induces the delayed activation of  $I_h$  ( $m_h$ , dotted trace). After that,  $I_{Kir}$  decreases as the membrane potential recovers towards the next LTS threshold, when the regenerative activation of  $I_T$  takes place ( $m_T^2$ , dashed trace).

## DISCUSSION

All members of the inward rectifier potassium channel family Kir2, except the Kir2.6 subunit, are expressed in the central nervous system of rodents (Hibino et al. 2010; Karschin et al. 1996; Ryan et al. 2010). The main attributed role of these channels in the brain is the regulation of the cerebral blood flow by controlling the microvascular tone and the neurovascular coupling (Longden and Nelson 2015), which are mediated by non-neuronal Kir2 channels. Few studies have provided direct evidence for a role of Kir2.X channels on the intrinsic physiology of neurons (Amarillo et al. 2014; Carr and Surmeier 2007; Shen et al. 2007). In striatal cholinergic interneurons, Kir2.X like currents seem to play a pro-oscillatory function (Wilson 2005); whereas in neurons of the nociceptive pathway, in the dorsal spinal horn of neonate rats, Kir2 channels prevent the oscillations (Li et al. 2013). Here we used conductance-based models to demonstrate the theoretical basis for a pacemaker promoting function of Kir2-like currents in thalamocortical neurons. To verify this prediction, we recorded rodent thalamocortical neurons *in vitro* and manipulated the levels of  $\bar{g}_{Kir}$  with dynamic clamp.

We showed that the singular negative slope conductance region that characterizes the I/V curve of Kir2 channels, generates bistability of the membrane potential when combined with leak conductances (Fig 1). The linear, monotonic I/V relationship generated by the background leak conductances is transformed into a non-linear, non-monotonic I/V curve by effect of the Kir negative slope conductance, introducing instability in the membrane potential via saddle-node bifurcations (Fig 1). Note that the range at which this instability occurs coincides with the range of membrane potential at which physiological slow oscillations occur in thalamocortical neurons (see below). The dynamical properties of this one-dimensional system (formed by  $dV/dt$ ) can be manipulated either by changing the injected current (as typically performed during electrophysiological experiments) or by changing the maximum potassium leak conductance (as it occurs physiologically). Yet, this is not sufficient to induce oscillations. Stable, robust oscillations are produced by the interaction between  $I_{Kir}$  and  $I_h$  in an  $I_{Kir}$ - $I_h$ -Leaks model (Fig 2). The I/V relationship of this minimal model increases monotonically as the membrane potential changes from negative to positive values, indicating that transitions between rest and oscillations (and vice-versa) occur via Hopf bifurcations (Izhikevich 2005). Furthermore, these bifurcations are of the supercritical type, in which the resting state loses stability with the appearance of a stable limit cycle. To confirm further that the negative slope conductance region of  $I_{Kir}$  is the key feature of  $I_{Kir}$  that promotes periodicity, we performed the bifurcation analysis using a modified Kir that lacks the negative slope conductance region of the  $I_{Kir}$ - $I_h$ -Leaks and  $I_{Kir}$ - $I_h$ - $I_T$ -Leaks models (Fig 4B and C, respectively). Oscillations (limit

cycle) are observed only when Kir has the negative slope conductance, whereas no oscillations are present when Kir lacks the negative slope.

In the  $I_{Kir}$ -Leaks model, bistability occurs via saddle node bifurcations when we used either  $\bar{g}_{Kleak}$  (Fig 1C) or current injection (Fig 1A and B) as the bifurcation parameter. When  $I_h$  is present, the model becomes a two-dimensional system formed by  $dV/dt$  and  $dm_h/dt$ , and different dynamical behaviors are obtained in response to either changes in  $\bar{g}_{Kleak}$  or changes in current injection at hyperpolarized potentials. At these membrane potentials, changes in current injection in either direction (increase or decrease) produce a transition via a supercritical Hopf bifurcation (Fig 2C). As the magnitude of injected current decreases, the frequency of the oscillation suddenly drops to zero, imposing a lower limit of about 0.6 Hz (not illustrated). This supercritical Hopf bifurcation is equivalent to the supercritical Hopf bifurcation that occurs with values of  $\bar{g}_{Kleak}$  of 1.1 nS (Fig 2D). In contrast, for lower values of  $\bar{g}_{Kleak}$ , the stable limit cycle disappears via a saddle-node on invariant circle bifurcation (S-NIC, Fig 2D). This admits oscillations at very low frequencies (i.e. type I excitability) since the frequency decreases with the square root of  $\bar{g}_{Kleak}$  (inset in Fig 2D; see also Izhikevich 2005). This dynamical behavior is compatible with experimentally recorded oscillations in thalamocortical neurons at frequencies below 0.5 Hz (Figs 5 and 7; see also Hughes et al. 2002).

To unveil the role of  $I_{Kir}$  in a model that also includes the oscillatory system provided by the activation and inactivation of  $I_T$ , we examined the bifurcation diagrams of the  $I_T$ - $I_{Kir}$ - $I_h$ -Leaks model in the presence (black diagrams) or absence (gray diagrams) of  $I_{Kir}$ . We analyzed the effect of using the following bifurcation parameters: current injection (Fig 3A),  $I_T$  maximum permeability ( $p_T$ , Fig 3B), or  $\bar{g}_{Kleak}$  (Fig 3C). In the three cases, slow oscillations have larger amplitudes when  $I_{Kir}$  is present (black diagrams), and they also take place over an extended range of the bifurcation parameter. For example, the presence of  $\bar{g}_{Kir}$  (9 nS) diminishes the requirement of  $I_T$ , since strong oscillations can now be produced with  $p_T$  as low as  $10.7 \times 10^{-9} \text{ cm}^3/\text{s}$  (Fig 3B). Furthermore, these oscillations occur under normal, physiological values of  $\bar{g}_{Kleak}$  (2.7 nS). This indicates that the interaction between a large T current and/or a small leak conductance is not the only possible mechanism for intrinsic slow wave sleep oscillations in thalamocortical neurons, as previously suggested (Crunelli et al. 2005). The dynamical behavior of the the  $I_T$ - $I_{Kir}$ - $I_h$ -Leaks system in the presence of high Kir conductance and very low leak conductance further supports this notion. A high value of  $\bar{g}_{Kir}$  (41nS) gives rise to a S-NIC bifurcation (Fig 3D), which bestows the system with the ability to oscillate at frequencies below 0.5 Hz as the bifurcation point is approached at very low values of  $\bar{g}_{Kleak}$  ( $\approx 0.106$  nS). These conditions also reproduce the time course of the oscillations observed experimentally (compare inset in Fig 3D with recording traces in Fig 5 and Fig 7).

Although the narrow conditions of high  $\bar{g}_{Kir}$  and low  $\bar{g}_{Kleak}$  used to model the dynamical behavior in Fig 3D reproduce the time course of the oscillations observed experimentally – including the plateau potentials –, adding the cationic calcium dependent current  $I_{CAN}$  is required for the system to undergo slow oscillations and plateau potentials on a larger parameter space (see below). This setting would be more compatible with a highly variable, physiological scenario.

The results obtained with the reduced computational models of TC neurons predict that an increase in  $I_{Kir}$  induces robust slow oscillations of large amplitude in thalamocortical neurons. To test this experimentally, we recorded TC neurons from mouse brain slices and manipulated the amount of Kir conductance by dynamic clamp. In all TC neurons, the addition of certain magnitudes of  $I_{Kir}$  induces subthreshold oscillations at low frequencies, indicating that all the

cells possess the necessary and sufficient ionic machinery that would interact with the added  $I_{Kir}$  to produce this periodic behavior. The range of minimal values of Kir conductance introduced by dynamic clamp for which we had obtained oscillations in the 19 mouse TC neurons tested was from 8 nS to 53 nS. Although the mean value (23.9 nS) was approximately 3 times larger than the mean value of endogenous Kir conductance (7.8 nS; range between 2.8 nS and 17.1 nS), both ranges of Kir conductance values are overlapping.

The oscillatory behavior of TC neurons depends on the balance of amplifying versus resonant conductances (Amarillo et al. 2014; see also Marder et al. 2015). Hence, the wide range of Kir conductance values for which oscillations are obtained may reflect the existence of different levels of the other conductances in different cells, each requiring a certain value of Kir conductance to promote subthreshold oscillations. To test this directly, we induced oscillations in TC neurons from mice by increasing the availability of  $I_T$  (Fig 6). Oscillations induced in this way disappear after pharmacological blockade of  $I_{Kir}$  and are rescued by addition of physiological magnitudes of  $d\bar{g}_{Kir}$ . This result strongly suggests that the intrinsic magnitude of  $\bar{g}_{Kir}$  expressed by TC neurons from mice has a promoting effect on slow periodicity.

In Fig 7 we provide a mechanistic explanation for the oscillations induced by adding artificial  $I_{Kir}$  to TC neurons from mice. Regenerative activation (unblock) of  $I_{Kir}$  amplifies hyperpolarization (dashed vertical lines in Figs 7A and C); this powerful hyperpolarization strongly activates resonant  $I_h$  (dotted trace in lower graph of Fig 7C) and almost totally removes inactivation of  $I_T$  ( $h_T$  approaches 1.0; solid trace in lower graph of Fig 7C); the slow activation of  $I_h$  brings the membrane potential towards the point of regenerative activation of highly available  $I_T$ ; regenerative activation of  $I_T$  produces the upstroke of the LTS and the subsequent inactivation of this current produces the repolarization of the membrane potential after the burst of  $Na^+/K^+$  mediated action potentials. This repolarization brings the membrane potential to the point where regenerative activation of  $I_{Kir}$  re-initiates the cycle.

Besides the inactivation of  $I_T$ , several ionic conductances participate in the repolarization of the membrane potential during the down stroke of the LTS (Amarillo et al. 2014; McCormick and Huguenard 1992, Hughes et al. 2002; Zhu et al. 1999). In particular, the cationic calcium dependent current  $I_{CAN}$  is activated during the LTS producing a slowly decaying afterdepolarization. The kinetics of this depolarization depends on the slow time constant of deactivation of  $I_{CAN}$  (third trace in Fig 7C; Hughes et al. 2002; Zhu et al. 1999). Without  $I_{CAN}$  in our simulations, it was possible to generate oscillations that resemble the recorded behavior (very low frequencies and plateaus) only if we use a very specific set of Kir and  $I_{leak}$  parameters (Fig 7B). Plateaus are generated in this case by the balance between the weak hyperpolarizing drive provided by a small  $I_{Kleak}$  and all the depolarizing conductances that are active at the end of the LTS (i.e.  $I_{Naleak}$ , steady state activated  $I_{NaP}$  and  $I_h$  and the window current component of  $I_T$  –Amarillo et al 2014–). In this scenario, regenerative activation of  $I_{Kir}$  is triggered by membrane potential fluctuations that reach a not-returning point (see  $V_m$  fluctuations following LTSs in Fig 7B). Including  $I_{CAN}$  in the model reproduces –for a more physiological range of  $I_{Kleak}$  magnitudes– the slow frequency of the oscillations and the shape of the time course of the membrane potential, especially the decaying plateaus. The depolarizing drive of activated  $I_{CAN}$  counteracts  $I_{Kleak}$ -mediated hyperpolarization, forcing the membrane potential to follow its slow deactivation kinetics. In this last scenario, regenerative activation of  $I_{Kir}$  is reached smoothly at a point where  $I_{CAN}$  is sufficiently deactivated (vertical dashed lines in Figs 7A and 7C).

It has been proposed that the bistability that underlies intrinsic slow oscillations in TC neurons is generated by the interaction of the window current component of  $I_T$  and the leak current (Crunelli et al. 2005; Hughes et al. 2002; Hughes et al. 1999). According to this model, the magnitudes of these two currents have to be balanced in such a way that the I/V relationship of the system becomes non-monotonic. When this happens, oscillations result from the alternating destabilization of two stable equilibria: one is destabilized by deactivation of  $I_{CAN}$  at depolarized potentials, followed by the destabilization of the other one by activation of  $I_h$  at hyperpolarized potentials (Crunelli et al. 2005; Hughes et al. 1999). Here we proposed an alternative scenario in which the dynamical interaction between the voltage and time-dependent properties of  $I_{Kir}$  (fast amplifying current) and  $I_h$  (slow resonant current) generates slow oscillations even though the total steady state I/V curve is monotonic. This slow system interacts with the intrinsically oscillatory system formed by the activation and inactivation gates of  $I_T$ , increasing the robustness of the oscillation.

Delta and slow brain rhythms (< 4 Hz) have been linked to changes in synaptic strength and structural remodeling of dendritic spines, which are believed to be the basis of memory consolidation (Wei et al. 2016; Yang et al. 2014). TC neurons seem to play a critical role in the generation and maintenance of these globally synchronized low-frequency oscillations, which are characteristic of unconscious states like deep stages of N-REM sleep (Steriade 1997) and absence seizures (Steriade and Contreras 1995). The pacemaker activity of TC neurons could be controlled by modulating the balance among the different ion conductances (through the interaction with synaptic inputs and network dynamics) to generate the diversity of membrane potential oscillations observed at different behavioral states. For this reason, great attention has been placed on studying modulatory mechanisms of  $I_{Kleak}$ ,  $I_h$  and  $I_T$  in these neurons (Cheong et al. 2008; Leresche et al. 2004; McCormick 1992; McCormick and Pape 1990a; Yue and Huguenard 2001; Zhu and Uhlrich 1998). Our results suggest that the strong inward rectifier potassium current  $I_{Kir}$  should be added to this list, given its pro-oscillatory role in TC neurons demonstrated here. Several signaling cascades, including the PIP2 pathway via lipid kinases and the PKA and src kinase pathways, are known to regulate the activity of Kir2.2 channels (reviewed in Hibino et al 2010). These and other Kir2.2 undiscovered modulatory mechanisms could be important in the regulation of the pacemaker propensity of TC neurons, and henceforth, in the regulation of the slow brain rhythms. In addition to these physiological modulations, gain of function mutations in Kir channels expressed in the heart have been shown to underlie diseases such as atrial fibrillation (Li et al. 2004; Xia et al. 2005). Similar gain of function mutations in the Kir2.2 channels expressed by TC neurons might explain the putative increase in Kir conductance that could induce pathological spike and wave oscillations during absence seizures, a hypothesis that stems from our present study.

Finally, the overexpression of strong inward rectifier potassium channels of the Kir2 family (see for example, Nitabach et al. 2002; Yoon et al. 2008) is a commonly used technique for silencing a particular population of neurons. Here we demonstrate that the negative slope conductance region in the I/V curve of these channels amplifies the hyperpolarization and promotes oscillations when combined with resonant  $I_h$ . Therefore, caution must be taken when using this technique, since overexpression of Kir channels in cells that express  $I_h$  could result in a “paradoxical” increase of excitability.

## DISCLOSURES

The authors declare no conflicts of interest, financial or otherwise.

## GRANTS

This work was subsidized by Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas-Argentina PIP 0256 and doctoral fellowship to AIT.

## FIGURE LEGENDS

### Figure 1. The Kir current induces bistability of the membrane potential

(A) Simulated steady state I/V relationships of the  $I_{Kir}$ -Leaks model cell with parameters adjusted to generate bistability in the absence of current injection.  $\bar{g}_{Kir} = 15.9$  nS,  $\bar{g}_{KLeak} = \bar{g}_{NaLeak} = 0.68$  nS,  $E_{Na} = 0$  mV and  $E_K = -100$  mV. The combined  $I_{Kir}$ -Leaks I/V curve (solid trace) crosses the zero current level at three different voltage values (a, b, c dots). (B) Simulated time course of the membrane potential for the model in (A) for six different initial  $V_m$  values (from negative to positive:  $-80$ ,  $-75$ ,  $-74.7$ ,  $-74.5$ ,  $-74$  and  $-70$  mV). Projected on the right is the bifurcation diagram using  $I_{inj}$  as the bifurcation parameter. The V/I curve crosses zero current at the stable points a and c, and at the unstable point b (the same  $V_m$  values as in A). The dashed segment indicates instability and the solid segments indicate stability. S-N indicates the saddle-node bifurcation points. (C) Bifurcation diagram of the  $I_{Kir}$ -Leaks model in (A) using  $\bar{g}_{KLeak}$  as the bifurcation parameter.

### Figure 2. The interaction of $I_{Kir}$ and $I_h$ induces robust sustained subthreshold oscillations

(A) Time course of the membrane potential produced by the  $I_{Kir}$ - $I_h$ -Leaks model cell for different current injection magnitudes (indicated on the left of each trace). Simulations were initiated at the resting membrane potential ( $-82.66$  mV;  $I = 0$ ) and the injected current was applied during the time indicated by the bar above the upper trace.  $\bar{g}_{Kir} = 41$  nS,  $\bar{g}_h = 5$  nS,  $\bar{g}_{KLeak} = 2.27$  nS and  $\bar{g}_{NaLeak} = 0.68$  nS. Gray traces indicate evolution towards a stable equilibrium and the black trace indicate sustained oscillations (B) Phase plane portrait for the three current levels shown in (A), starting at rest ( $I_{inj} = 0$ ): 40pA, 60pA and 80 pA (Gray and black have the same meaning as in A). Note that for the three conditions the nullclines intersect in a single point: stable foci (s) for 40 and 80 pA and an unstable focus (u) for 60 pA. (C) Bifurcation diagram as the current injection changes showing the two supercritical Hopf bifurcation points (sup. Hopf) and the amplitude of the limit cycle (dots). (D) Bifurcation analysis using  $\bar{g}_{KLeak}$  as the bifurcation parameter. At the saddle-node on invariant circle bifurcation (S-NIC) point, the stable limit cycle appear/disappear as  $\bar{g}_{KLeak}$  increases/decreases due to the presence of a saddle node bifurcation that shrinks/expands a small heteroclinic trajectory (Izhikevich 2005). The inset shows the frequency of the limit cycle as function of  $\bar{g}_{KLeak}$ : the frequency decreases as  $\sqrt{\bar{g}_{KLeak} - \bar{g}_{KLeak}^b}$  when  $\bar{g}_{KLeak}$  decreases (from right to left) toward the bifurcation value  $\bar{g}_{KLeak}^b$ . The separation between slow and delta bands (at 1 Hz) is indicated by the shadowed area.

### Figure 3. Effect of $I_{Kir}$ on the dynamics of a model of thalamocortical neurons that includes $I_h$ and $I_T$

(A) Bifurcation diagram of the  $I_T$ - $I_h$ -Leaks model using current injection as the bifurcation parameter, in the presence of  $I_{Kir}$  (9 nS, black diagram) or in the absence of  $I_{Kir}$  (grey diagram). Identical parameter values were used for the other conductances:  $\bar{g}_h = 5$  nS,  $\bar{g}_{KLeak} = 2.27$  nS,  $\bar{g}_{NaLeak} = 0.68$  nS and  $p_T = 14 \times 10^{-9}$  cm<sup>3</sup>/s. sub. Hopf and sup. Hopf labels indicate subcritical and supercritical Hopf bifurcation points respectively. Dots are max/min of stable (filled dots) or unstable (empty dots) limit cycle. (B) Bifurcation diagram of the  $I_T$ - $I_h$ -Leaks model using the maximum permeability of  $I_T$  as the bifurcation parameter, in the presence of  $I_{Kir}$  (9 nS, black diagram) or in the absence of  $I_{Kir}$  (grey diagram). (C) Bifurcation diagram of the  $I_T$ - $I_h$ -Leaks model using  $\bar{g}_{KLeak}$  as the bifurcation parameter, in the presence of  $I_{Kir}$  (9 nS, black diagram) or in the absence of  $I_{Kir}$  (grey diagram). (D) Bifurcation diagram of the  $I_T$ - $I_h$ -Leaks model using  $\bar{g}_{KLeak}$  as the bifurcation parameter, in the presence of  $I_{Kir}$  (41 nS). The inset shows the time

course of membrane potential oscillations at a  $\bar{g}_{Kleak}$  value that is very close to the bifurcation point ( $\bar{g}_{Kleak} = 1.05973610281$  nS). Conventions and parameter values for the other conductances in (B, C and D) are as in (A).

**Figure 4. Effect of the negative slope conductance region of the I/V curve of  $I_{Kir}$  on the dynamics of TC neuron models.**

**A.** Simulated I/V curves of  $I_{Kir}$  with ( $I_{Kir}$ , solid line) and without ( $I_{KirNoNS}$ , dotted line) negative slope conductance (see methods). **B.** Bifurcation diagram, using  $I_{inj}$  as the bifurcation parameter, of the  $I_{Kir}$ - $I_h$ -Leaks model with (black solid/dashed line and max/min of limit cycle) and without (dotted line) negative slope conductance ( $\bar{g}_{Kir} = 41$  nS,  $\bar{g}_h = 5$  nS,  $\bar{g}_{Kleak} = 2.27$  nS and  $\bar{g}_{Naleak} = 0.68$  nS). **C.** Comparison of the bifurcation diagrams of the three models: 1)  $I_h$ - $I_T$ -Leaks (No  $I_{Kir}$ , gray), 2)  $I_{Kir}$ - $I_h$ - $I_T$ -Leaks with  $Kir$  with negative slope (black solid/dashed line and max/min of limit cycle) and 3)  $I_{KirNoNS}$ - $I_h$ - $I_T$ -Leaks with  $Kir$  without negative slope (dotted line), using  $I_{inj}$  as the bifurcation parameter and physiological values for all conductances ( $\bar{g}_{Kir} = 9$  nS,  $\bar{g}_h = 5$  nS,  $\bar{g}_{Kleak} = 2.27$  nS,  $\bar{g}_{Naleak} = 0.68$  nS and  $p_T = 11.3 \times 10^{-9}$  cm<sup>3</sup>/s).

**Figure 5. Artificial increase of  $\bar{g}_{Kir}$  induces sustained repetitive burst firing in TC neurons from mice.**

**(A)** Current clamp recordings of a TC neuron from the ventro basal complex of mouse thalamus, where different amounts of maximum conductance of  $Kir$ , ranging from 10 to 30 nS, were artificially introduced with dynamic-clamp (the arrow and vertical dashed line indicate the onset of the dynamic clamp). The inset shows a magnified view of one of the bursts of action potentials riding on a low threshold spike. **(B)** Current clamp recordings of a different TC neuron in response to increasing magnitudes of injected hyperpolarizing current before (left traces) and after introduction of 50 nS of  $\bar{g}_{Kir}$  with dynamic-clamp (right traces). **(C)** Current clamp recordings of another TC neuron with a protocol of square pulses in 20 pA increments from  $-100$  pA, under control conditions (upper left) and after bath application of 10  $\mu$ M barium (upper right). Note the disappearance of the fast inward rectification (measured at an early time point –vertical dashed line) after application of  $Ba^{++}$ . The lower left traces show the rescue of the fast inward rectification after introduction of 5 nS of  $\bar{g}_{Kir}$  with dynamic clamp. An excess of  $d\bar{g}_{Kir}$  (15 nS) further increases the fast inward rectification in this cell (lower right). **(D)** Current/Voltage curves for the same TC neuron recorded in (C) under these different conditions, measured at the time indicated by the vertical dashed lines in (C). Control (open circles), 10  $\mu$ M barium (full circles), and 10  $\mu$ M barium + either 5 nS (triangles) or 15nS  $d\bar{g}_{Kir}$  (squares).

**Figure 6. Intrinsic  $\bar{g}_{Kir}$  levels promote repetitive bursting in TC neurons.**

**A.** Repetitive bursting induced by adding artificial  $I_T$  with dynamic-clamp to a TC neuron. Oscillations are more readily elicited at rest ( $-70$  mV, not shown) and at slightly hyperpolarized membrane potentials ( $I_{inj} = -5$  pA). **B.** Blockade of  $I_{Kir}$  with a low concentration of  $Ba^{++}$  (10  $\mu$ M) eliminates oscillations induced by artificial  $I_T$ . **C.** Reinstating  $I_{Kir}$  ( $d\bar{g}_{Kir} = 8$  nS) with dynamic-clamp in the presence of  $Ba^{++}$  (10  $\mu$ M) rescues repetitive bursting induced by artificial  $I_T$ . **D.** The neuron recovers the original (control) induced oscillatory behavior after washing out  $Ba^{++}$  in the absence of  $d\bar{g}_{Kir}$ . A maximum conductance value = 70 nS for  $I_T$  was used in all conditions (see methods).

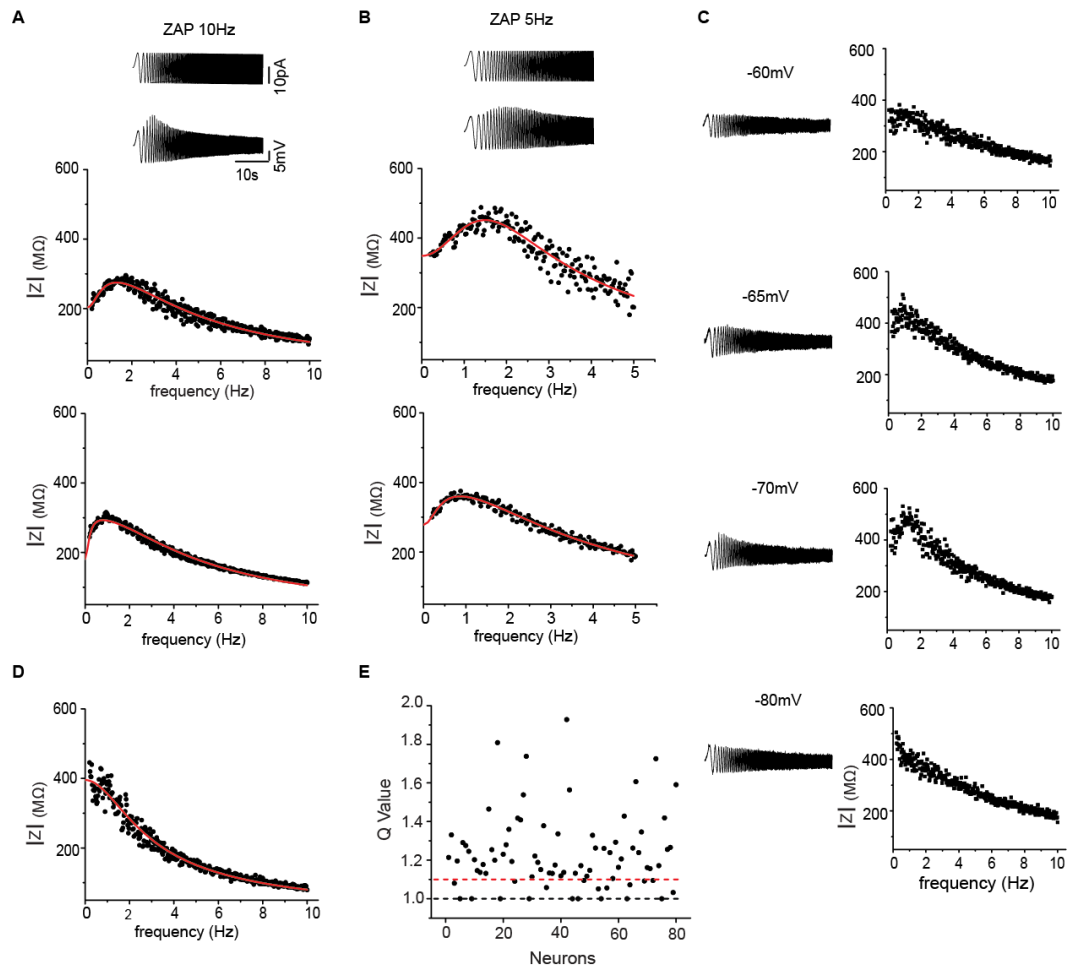
**Figure 7. Mechanism of  $dI_{Kir}$  induced oscillations in TC neurons.**

**(A)** Membrane potential time course of repetitive bursts in a TC neuron (upper trace) induced by introducing 10 nS  $d\bar{g}_{Kir}$ . Aligned below is the time course of the current injected by the dynamic-clamp system (lower trace). Regenerative activation of  $I_{Kir}$  (dashed vertical line) initiates the down stroke of a transient hyperpolarization **(B)** Membrane potential (upper trace)

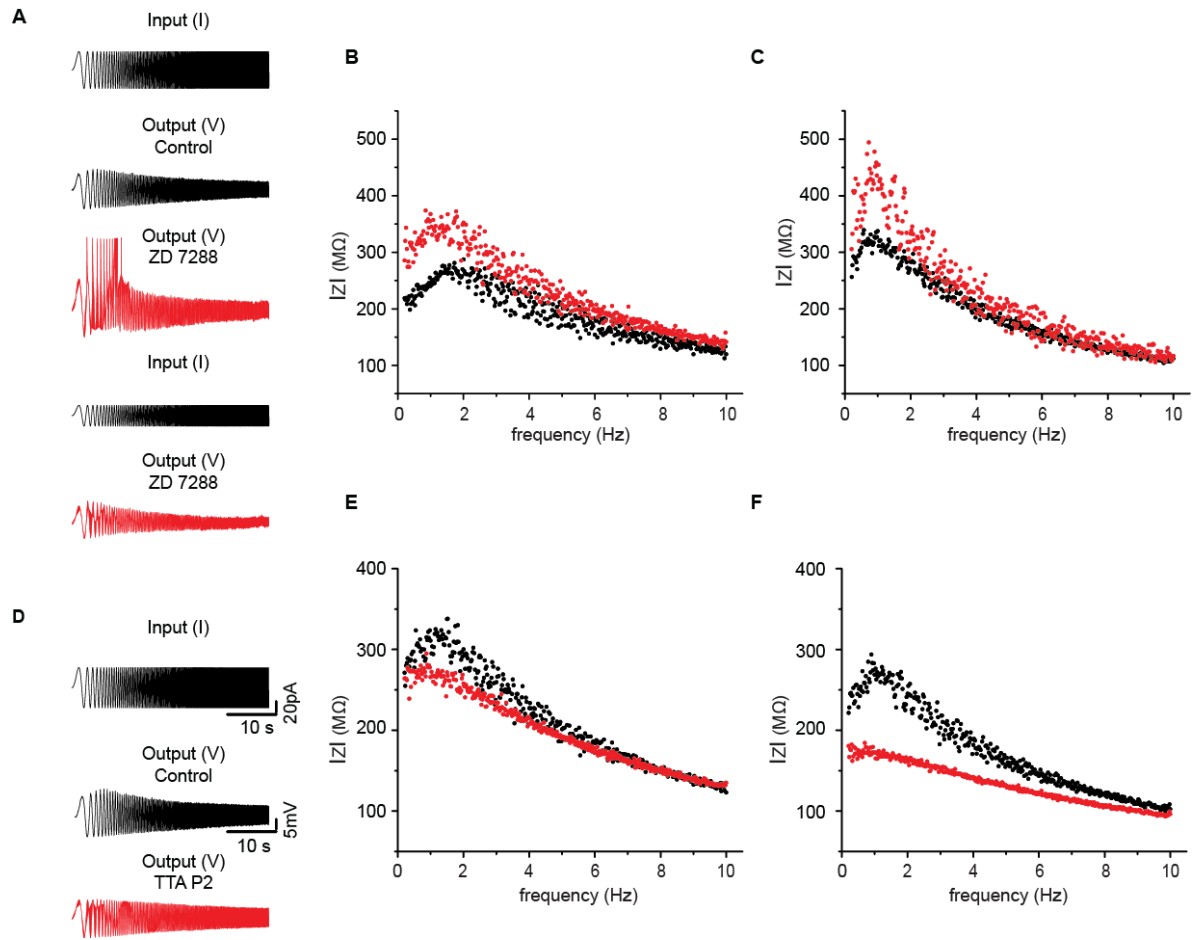
and  $I_{Kir}$  (lower trace) time courses during repetitive bursts in a complete model of TC neuron using a large  $\bar{g}_{Kir}$  value and a low  $\bar{g}_{Kleak}$  value (34 nS and 0.3 nS, respectively) in the absence of  $I_{CAN}$ . See parameters for the other conductances in table I. **(C)** Simulations in the complete TC neuron model that includes the cationic calcium activated current  $I_{CAN}$  (2.5 nS) using  $\bar{g}_{Kir} = 30.6$  nS and a more physiological  $\bar{g}_{Kleak}$  value (2.5 nS). All parameters for these simulations are listed in table I. The upper trace shows the time course of the membrane potential followed below by the time course of  $I_{Kir}$  and  $I_{CAN}$ . The lower traces show the time course of the modeled activation of  $I_h$  ( $m_h$ , dotted trace) and the activation ( $m_T^2$ , dashed trace) and inactivation ( $h_T$ , solid trace) variables of  $I_T$ . The vertical dashed line is placed at an onset of regenerative activation of  $I_{Kir}$ , which coincides with an onset of activation of  $I_h$  and a large deinactivation of  $I_T$ . Horizontal dashed lines indicate the zero current level.



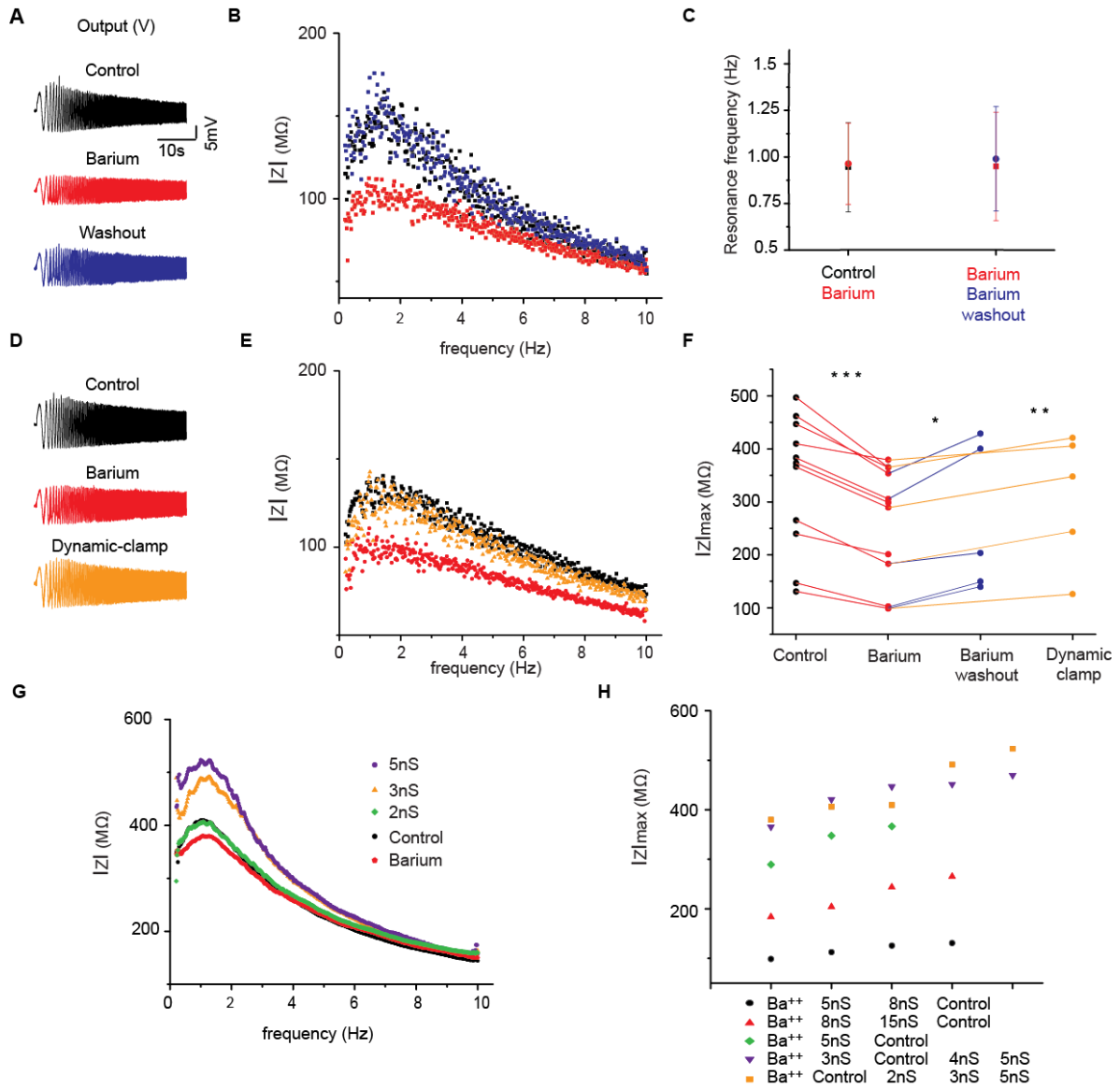
**Fig. 1**



**Fig. 2**



**Fig. 3**



**Fig. 4**

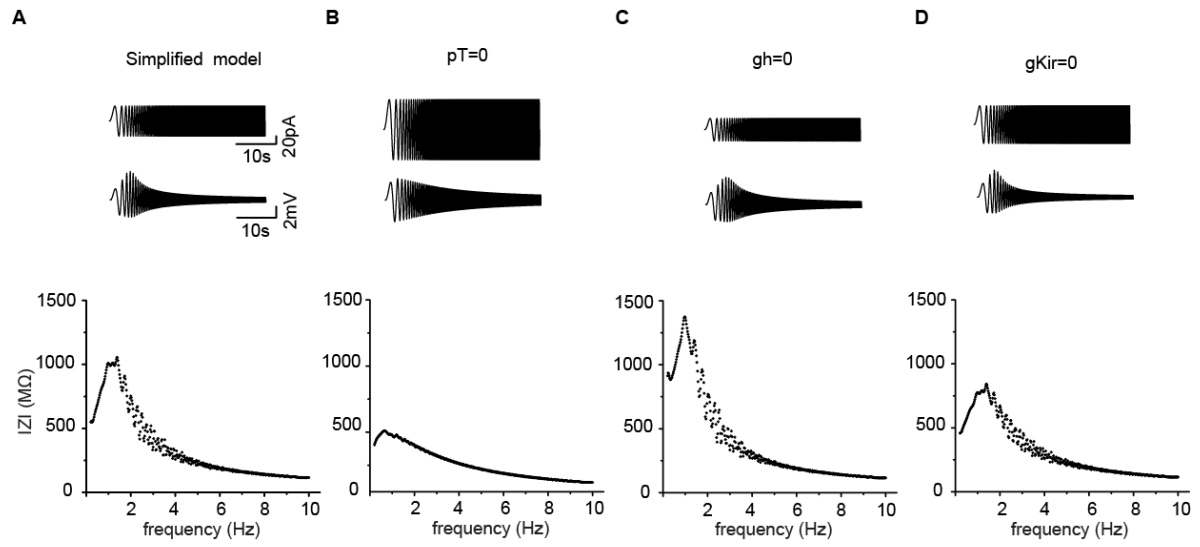


Fig. 5

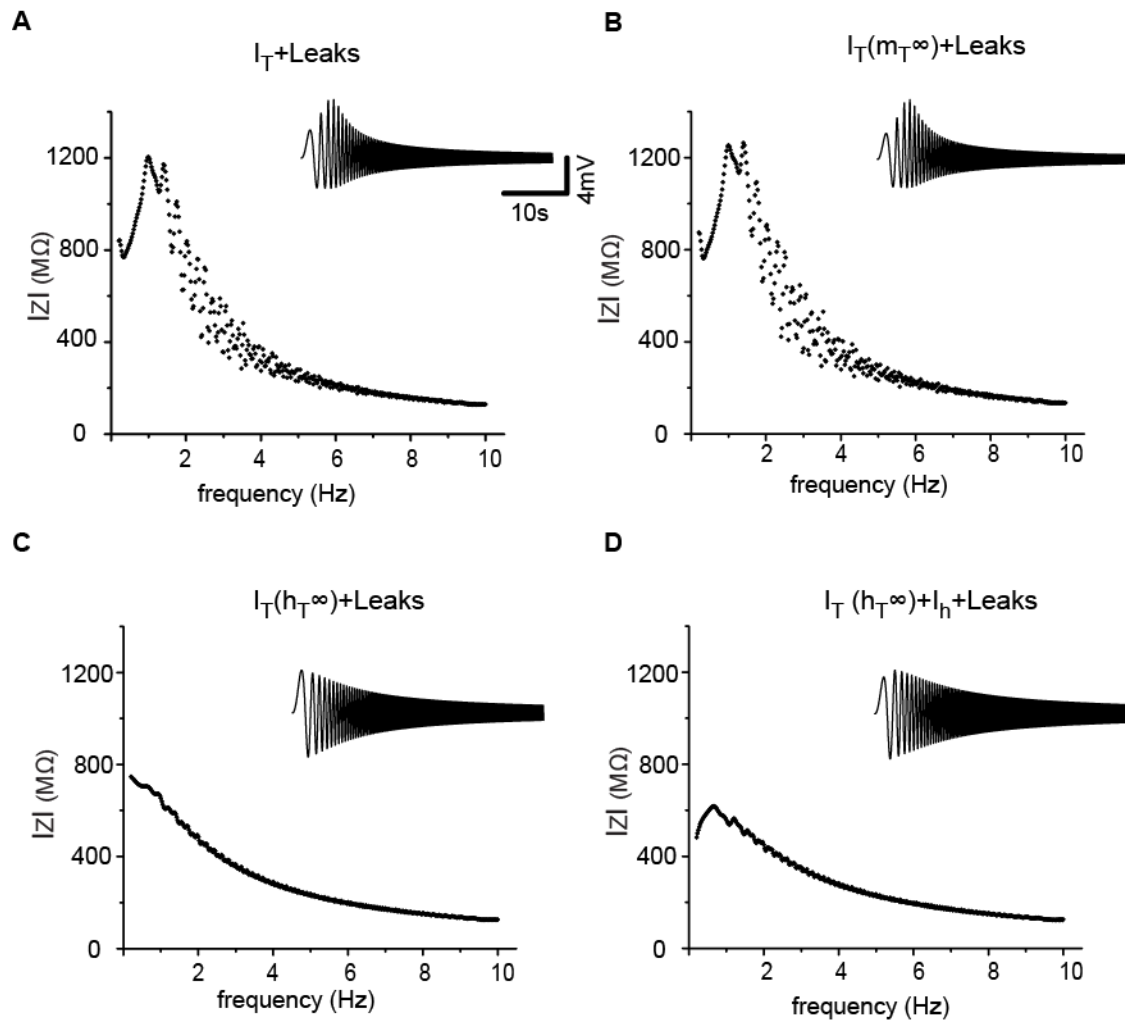
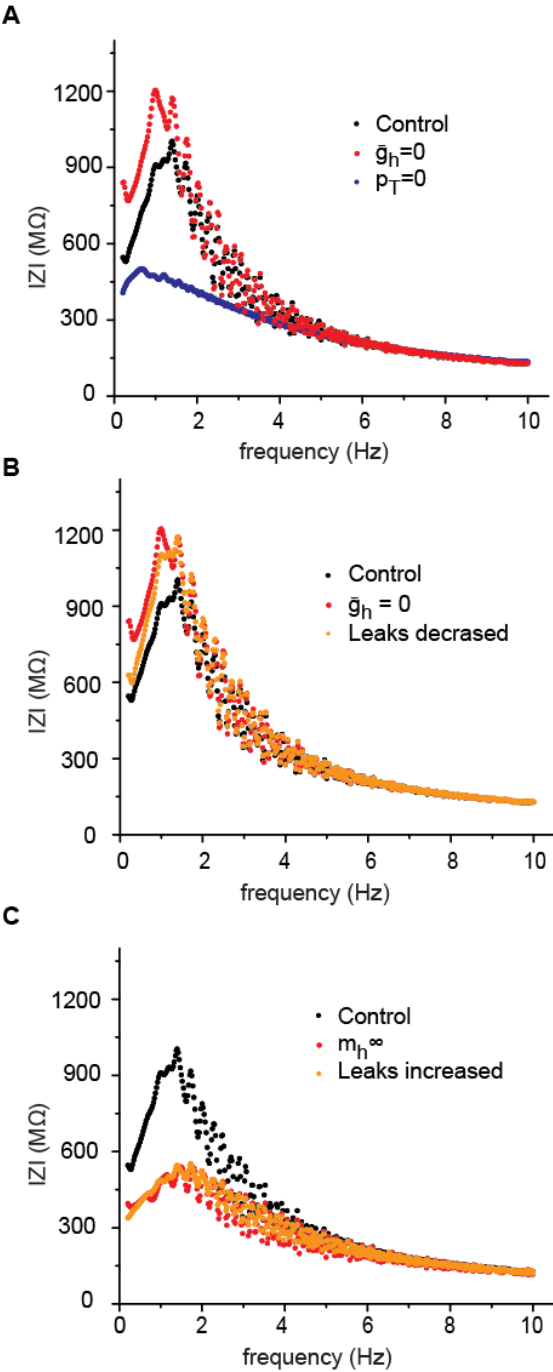
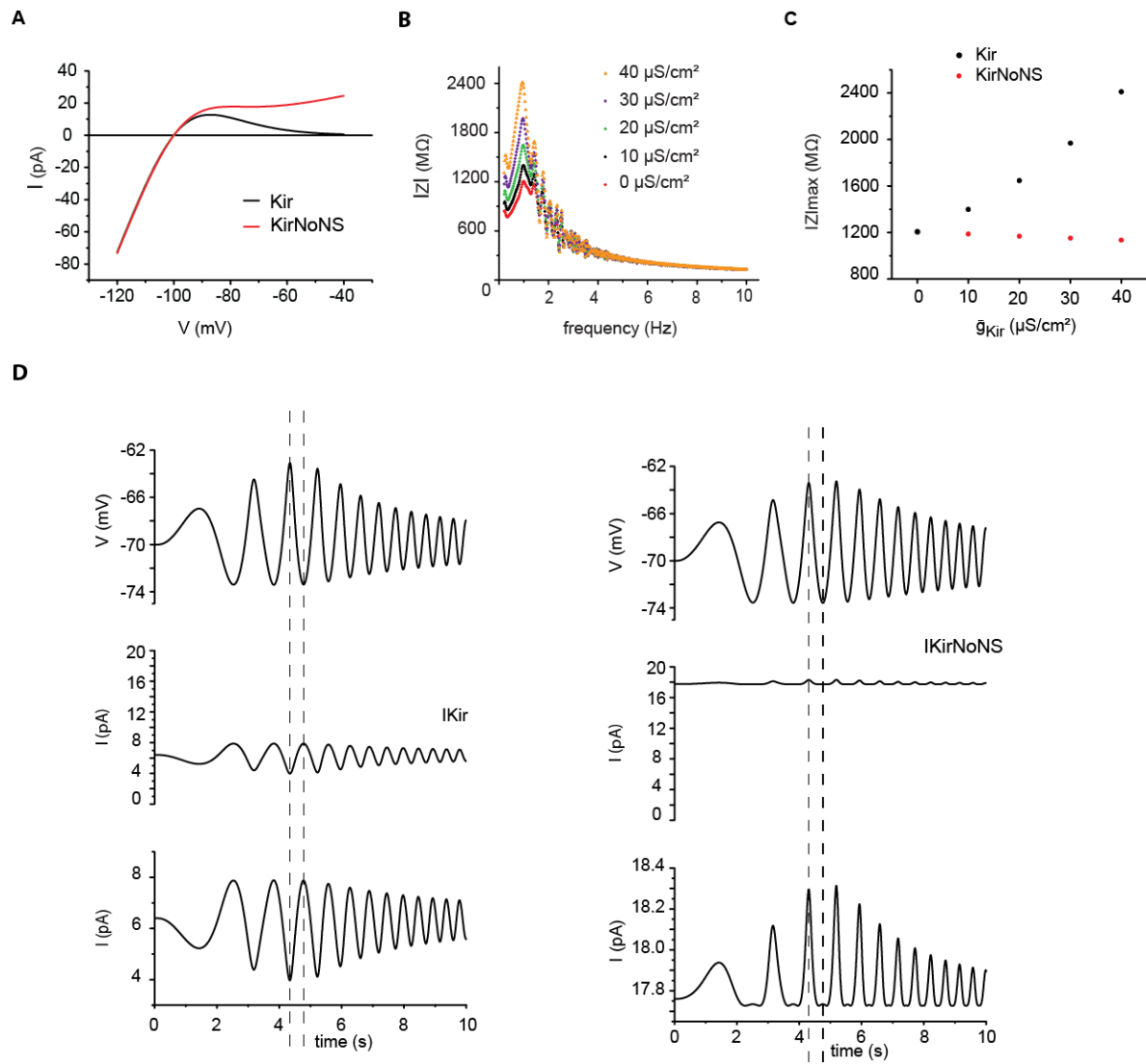


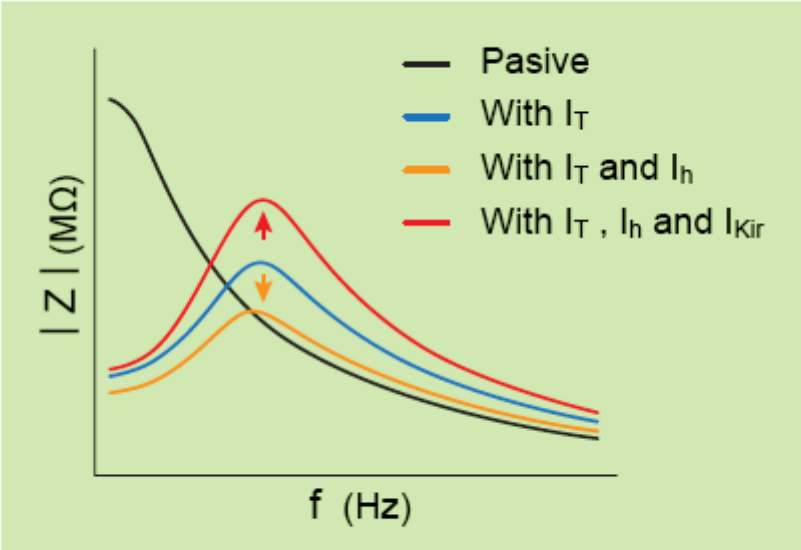
Fig. 6



**Fig. 7**



Graphical abstract





## REFERENCES

- Amarillo Y, De Santiago-Castillo JA, Dougherty K, Maffie J, Kwon E, Covarrubias M, and Rudy B.** Ternary Kv4.2 channels recapitulate voltage-dependent inactivation kinetics of A-type K<sup>+</sup> channels in cerebellar granule neurons. *J Physiol* 586: 2093-2106, 2008.
- Amarillo Y, Mato G, and Nadal MS.** Analysis of the role of the low threshold currents I<sub>T</sub> and I<sub>h</sub> in intrinsic delta oscillations of thalamocortical neurons. *Front Comput Neurosci* 9: 52, 2015.
- Amarillo Y, Zaghera E, Mato G, Rudy B, and Nadal MS.** The interplay of seven subthreshold conductances controls the resting membrane potential and the oscillatory behavior of thalamocortical neurons. *J Neurophysiol* 112: 393-410, 2014.
- Anumonwo JM, and Lopatin AN.** Cardiac strong inward rectifier potassium channels. *Journal of molecular and cellular cardiology* 48: 45-54, 2010.
- Buzsaki G.** *Rhythms of the Brain*. New York: Oxford University Press, Inc, 2006, p. 175-205.
- Carr DB, and Surmeier DJ.** M1 muscarinic receptor modulation of Kir2 channels enhances temporal summation of excitatory synaptic potentials in prefrontal cortex pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 97: 3432-3438, 2007.
- Crunelli V, and Hughes SW.** The slow (<1 Hz) rhythm of non-REM sleep: a dialogue between three cardinal oscillators. *Nat Neurosci* 13: 9-17, 2010.
- Crunelli V, Toth TI, Cope DW, Blethyn K, and Hughes SW.** The 'window' T-type calcium current in brain dynamics of different behavioural states. *J Physiol* 562: 121-129, 2005.
- Cheong E, Lee S, Choi BJ, Sun M, Lee CJ, and Shin HS.** Tuning thalamic firing modes via simultaneous modulation of T- and L-type Ca<sup>2+</sup> channels controls pain sensory gating in the thalamus. *J Neurosci* 28: 13331-13340, 2008.
- Dhamoon AS, Pandit SV, Sarmast F, Parisian KR, Guha P, Li Y, Bagwe S, Taffet SM, and Anumonwo JM.** Unique Kir2.x properties determine regional and species differences in the cardiac inward rectifier K<sup>+</sup> current. *Circulation research* 94: 1332-1339, 2004.
- Curro-Dossi R, Nunez A, and Steriade M.** Electrophysiology of a slow (0.5-4 Hz) intrinsic oscillation of cat thalamocortical neurones in vivo. *J Physiol* 447: 215-234, 1992.
- Dreyfus FM, Tschertter A, Errington AC, Renger JJ, Shin HS, Uebele VN, Crunelli V, Lambert RC, and Leresche N.** Selective T-type calcium channel block in thalamic neurons reveals channel redundancy and physiological impact of I(T)window. *J Neurosci* 30: 99-109, 2010.
- Ermentrout B.** *Simulating, Analyzing, and Animating Dynamical Systems: A Guide to Xppaut for Researchers and Students*. Philadelphia: SIAM, 2002.
- Ernst WL, Zhang Y, Yoo JW, Ernst SJ, and Noebels JL.** Genetic enhancement of thalamocortical network activity by elevating alpha 1g-mediated low-voltage-activated calcium current induces pure absence epilepsy. *J Neurosci* 29: 1615-1625, 2009.
- Hibino H, Inanobe A, Furutani K, Murakami S, Findlay I, and Kurachi Y.** Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiological reviews* 90: 291-366, 2010.
- Hille B.** (2001) *Ionic channels of excitable membranes*. Sunderland, MA: Sinauer.
- Hines ML, and Carnevale NT.** The NEURON simulation environment. *Neural Comput* 9: 1179-1209, 1997.
- Hughes SW, Cope DW, Blethyn KL, and Crunelli V.** Cellular mechanisms of the slow (<1 Hz) oscillation in thalamocortical neurons in vitro. *Neuron* 33: 947-958, 2002.
- Hughes SW, Cope DW, Toth TI, Williams SR, and Crunelli V.** All thalamocortical neurones possess a T-type Ca<sup>2+</sup> 'window' current that enables the expression of bistability-mediated activities. *J Physiol* 517 ( Pt 3): 805-815, 1999.
- Hughes SW, Lorincz M, Cope DW, and Crunelli V.** Using the Dynamic Clamp to Dissect the Properties and Mechanisms of Intrinsic Thalamic Oscillations. In: *Dynamic-Clamp From*

*Principles to Applications*, edited by Destexhe A, and Bal T. New York, NY. USA: Springer, 2009, p. 321-346.

**Hutcheon B, and Yarom Y.** Resonance, oscillation and the intrinsic frequency preferences of neurons. *Trends Neurosci* 23: 216-222, 2000.

**Izhikevich E.** *Dynamical Systems in Neuroscience: The Geometry of Excitability and Bursting*. Cambridge, MA: MIT Press, 2005.

**Jacobsen RB, Ulrich D, and Huguenard JR.** GABA(B) and NMDA receptors contribute to spindle-like oscillations in rat thalamus in vitro. *Journal of neurophysiology* 86: 1365-1375, 2001.

**Karschin C, Dissmann E, Stuhmer W, and Karschin A.** IRK(1-3) and GIRK(1-4) inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel mRNAs are differentially expressed in the adult rat brain. *J Neurosci* 16: 3559-3570, 1996.

**Kemenes I, Marra V, Crossley M, Samu D, Staras K, Kemenes G, and Nowotny T.** Dynamic clamp with StdpC software. *Nature protocols* 6: 405-417, 2011.

**Kim D, Song I, Keum S, Lee T, Jeong MJ, Kim SS, McEnery MW, and Shin HS.** Lack of the burst firing of thalamocortical relay neurons and resistance to absence seizures in mice lacking alpha(1G) T-type Ca(2+) channels. *Neuron* 31: 35-45, 2001.

**Lee J, Kim D, and Shin HS.** Lack of delta waves and sleep disturbances during non-rapid eye movement sleep in mice lacking alpha1G-subunit of T-type calcium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 18195-18199, 2004.

**Leresche N, Hering J, and Lambert RC.** Paradoxical potentiation of neuronal T-type Ca<sup>2+</sup> current by ATP at resting membrane potential. *J Neurosci* 24: 5592-5602, 2004.

**Leresche N, Lightowler S, Soltesz I, Jassik-Gerschenfeld D, and Crunelli V.** Low-frequency oscillatory activities intrinsic to rat and cat thalamocortical cells. *J Physiol* 441: 155-174, 1991.

**Li J, Blankenship ML, and Bacceti ML.** Inward-rectifying potassium (Kir) channels regulate pacemaker activity in spinal nociceptive circuits during early life. *J Neurosci* 33: 3352-3362, 2013.

**Li J, McLerie M, and Lopatin AN.** Transgenic upregulation of IK1 in the mouse heart leads to multiple abnormalities of cardiac excitability. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 287: H2790-2802, 2004.

**Longden TA, and Nelson MT.** Vascular inward rectifier K<sup>+</sup> channels as external K<sup>+</sup> sensors in the control of cerebral blood flow. *Microcirculation* 22: 183-196, 2015.

**Ludwig A, Budde T, Stieber J, Moosmang S, Wahl C, Holthoff K, Langebartels A, Wotjak C, Munsch T, Zong X, Feil S, Feil R, Lancel M, Chien KR, Konnerth A, Pape HC, Biel M, and Hofmann F.** Absence epilepsy and sinus dysrhythmia in mice lacking the pacemaker channel HCN2. *The EMBO journal* 22: 216-224, 2003.

**Llinas R, and Jahnsen H.** Electrophysiology of mammalian thalamic neurones in vitro. *Nature* 297: 406-408, 1982.

**Marder E, Goeritz ML, and Otopalik AG.** Robust circuit rhythms in small circuits arise from variable circuit components and mechanisms. *Current opinion in neurobiology* 31: 156-163, 2015.

**McCormick DA.** Cellular mechanisms underlying cholinergic and noradrenergic modulation of neuronal firing mode in the cat and guinea pig dorsal lateral geniculate nucleus. *J Neurosci* 12: 278-289, 1992.

**McCormick DA, and Huguenard JR.** A model of the electrophysiological properties of thalamocortical relay neurons. *J Neurophysiol* 68: 1384-1400, 1992.

**McCormick DA, and Pape HC.** Noradrenergic and serotonergic modulation of a hyperpolarization-activated cation current in thalamic relay neurones. *J Physiol* 431: 319-342, 1990a.

**McCormick DA, and Pape HC.** Properties of a hyperpolarization-activated cation current and its role in rhythmic oscillation in thalamic relay neurones. *J Physiol* 431: 291-318, 1990b.

**McCormick DA, and Prince DA.** Actions of acetylcholine in the guinea-pig and cat medial and lateral geniculate nuclei, in vitro. *J Physiol* 392: 147-165, 1987.

**McCormick DA, and Prince DA.** Noradrenergic modulation of firing pattern in guinea pig and cat thalamic neurons, in vitro. *J Neurophysiol* 59: 978-996, 1988.

**Meuth SG, Kanyshkova T, Meuth P, Landgraf P, Munsch T, Ludwig A, Hofmann F, Pape HC, and Budde T.** Membrane resting potential of thalamocortical relay neurons is shaped by the interaction among TASK3 and HCN2 channels. *Journal of neurophysiology* 96: 1517-1529, 2006.

**Nitabach MN, Blau J, and Holmes TC.** Electrical silencing of *Drosophila* pacemaker neurons stops the free-running circadian clock. *Cell* 109: 485-495, 2002.

**Rush ME, and Rinzel J.** Analysis of bursting in a thalamic neuron model. *Biological cybernetics* 71: 281-291, 1994.

**Ryan DP, da Silva MR, Soong TW, Fontaine B, Donaldson MR, Kung AW, Jongjaroenprasert W, Liang MC, Khoo DH, Cheah JS, Ho SC, Bernstein HS, Maciel RM, Brown RH, Jr., and Ptacek LJ.** Mutations in potassium channel Kir2.6 cause susceptibility to thyrotoxic hypokalemic periodic paralysis. *Cell* 140: 88-98, 2010.

**Schram G, Pourrier M, Wang Z, White M, and Nattel S.** Barium block of Kir2 and human cardiac inward rectifier currents: evidence for subunit-heteromeric contribution to native currents. *Cardiovascular research* 59: 328-338, 2003.

**Shen W, Tian X, Day M, Ulrich S, Tkatch T, Nathanson NM, and Surmeier DJ.** Cholinergic modulation of Kir2 channels selectively elevates dendritic excitability in striatopallidal neurons. *Nat Neurosci* 10: 1458-1466, 2007.

**Soltesz I, Lightowler S, Leresche N, Jassik-Gerschenfeld D, Pollard CE, and Crunelli V.** Two inward currents and the transformation of low-frequency oscillations of rat and cat thalamocortical cells. *J Physiol* 441: 175-197, 1991.

**Steriade M.** Synchronized activities of coupled oscillators in the cerebral cortex and thalamus at different levels of vigilance. *Cereb Cortex* 7: 583-604, 1997.

**Steriade M, and Contreras D.** Relations between cortical and thalamic cellular events during transition from sleep patterns to paroxysmal activity. *J Neurosci* 15: 623-642, 1995.

**Steriade M, Contreras D, Amzica F, and Timofeev I.** Synchronization of fast (30-40 Hz) spontaneous oscillations in intrathalamic and thalamocortical networks. *J Neurosci* 16: 2788-2808, 1996.

**Warren RA, Agmon A, and Jones EG.** Oscillatory synaptic interactions between ventroposterior and reticular neurons in mouse thalamus in vitro. *J Neurophysiol* 72: 1993-2003, 1994.

**Wei Y, Krishnan GP, and Bazhenov M.** Synaptic Mechanisms of Memory Consolidation during Sleep Slow Oscillations. *J Neurosci* 36: 4231-4247, 2016.

**Wilson CJ.** The mechanism of intrinsic amplification of hyperpolarizations and spontaneous bursting in striatal cholinergic interneurons. *Neuron* 45: 575-585, 2005.

**Wei H, Bonjean M, Petry HM, Sejnowski TJ, and Bickford ME.** Thalamic burst firing propensity: a comparison of the dorsal lateral geniculate and pulvinar nuclei in the tree shrew. *J Neurosci* 31: 17287-17299, 2011.

**Xia M, Jin Q, Bendahhou S, He Y, Larroque MM, Chen Y, Zhou Q, Yang Y, Liu Y, Liu B, Zhu Q, Zhou Y, Lin J, Liang B, Li L, Dong X, Pan Z, Wang R, Wan H, Qiu W, Xu W, Eurlings P, and Barhanin J.** A Kir2.1 gain-of-function mutation underlies familial atrial fibrillation. *Biochemical and biophysical research communications* 332: 1012-1019, 2005.

**Yang G, Lai CS, Cichon J, Ma L, Li W, and Gan WB.** Sleep promotes branch-specific formation of dendritic spines after learning. *Science* 344: 1173-1178, 2014.

**Yoon YJ, Kominami H, Trimarchi T, and Martin-Caraballo M.** Inhibition of electrical activity by retroviral infection with Kir2.1 transgenes disrupts electrical differentiation of motoneurons. *PloS one* 3: e2971, 2008.

**Yue BW, and Huguenard JR.** The role of H-current in regulating strength and frequency of thalamic network oscillations. *Thalamus & related systems* 1: 95-103, 2001.

**Zhu JJ, and Uhlrich DJ.** Cellular mechanisms underlying two muscarinic receptor-mediated depolarizing responses in relay cells of the rat lateral geniculate nucleus. *Neuroscience* 87: 767-781, 1998.

**Zhu JJ, Uhlrich DJ, and Lytton WW.** Burst firing in identified rat geniculate interneurons. *Neuroscience* 91: 1445-1460, 1999.