

UCH-FC
Biotecnología
P436

C.1 UNIVERSIDAD DE CHILE FACULTAD DE CIENCIAS ESCUELA DE PREGRADO



“LA METODOLOGÍA DE *DYNAMIC CLAMP*: IMPLEMENTACIÓN Y APLICACIONES PARA EL ESTUDIO DE LA DINÁMICA NEURONAL”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

ULISES PEREIRA OBILINOVIC
Nombre del candidato

Dra. Magdalena Sanhueza Tohá
Director del Seminario de Título

12 de Junio de 2013
Santiago - Chile

ESCUELA DE PREGRADO – FACULTAD DE CIENCIAS – UNIVERSIDAD DE CHILE



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, que el Seminario de Título presentado por el candidato **Sr. Ulises Pereira Obilinovic**, "**La Metodología de *dynamic clamp*: implementación y aplicaciones para el Estudio de la Dinámica Neuronal**", ha sido aprobado por la Comisión evaluadora y revisora, como requisito parcial para optar al título profesional de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

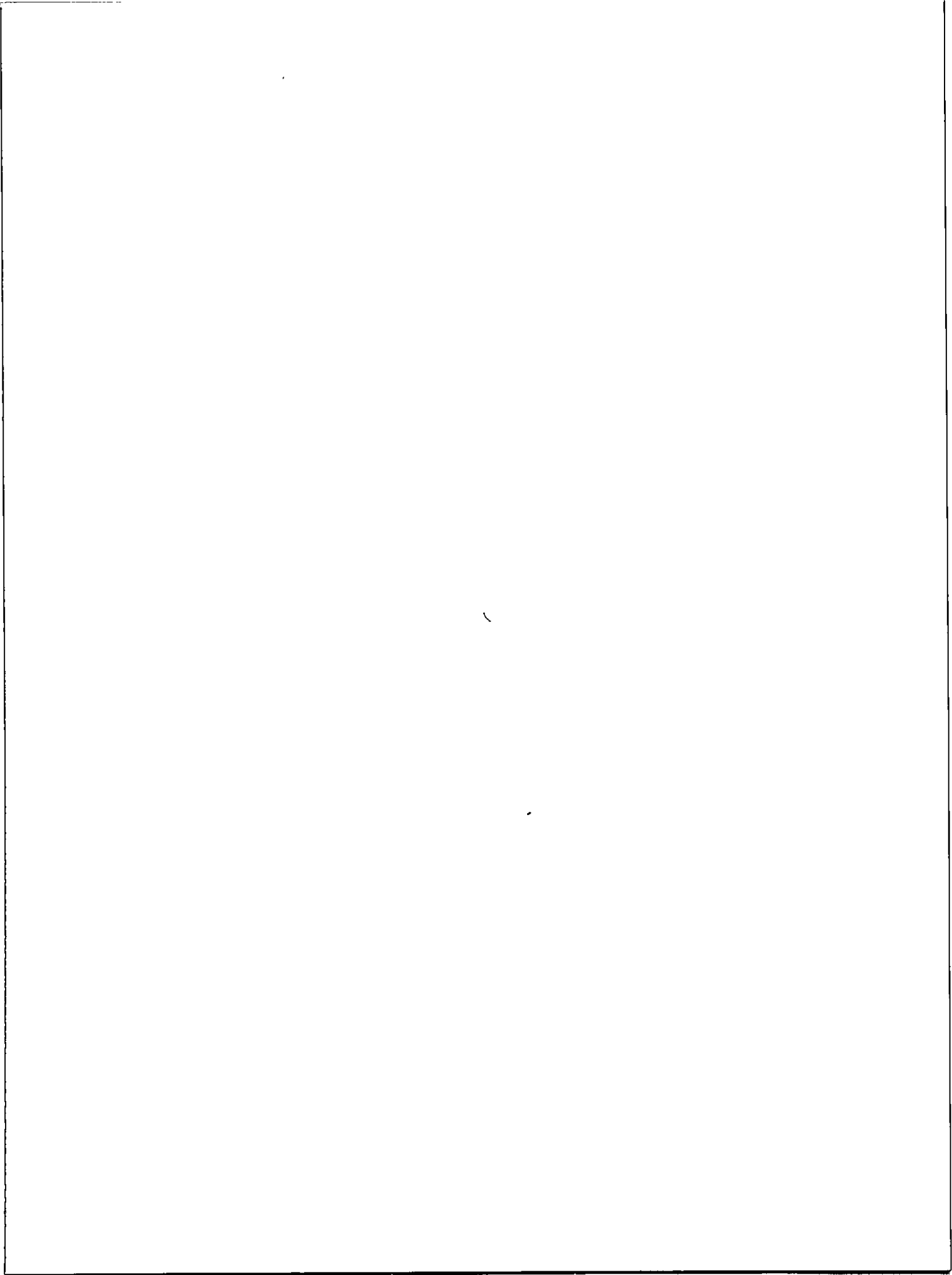
Dra. Magdalena Sanhueza Tohá
Directora Seminario de Título

Comisión Revisora y Evaluadora

Dra. Cecilia Vergara Montecino
Presidente

Dr. Juan Carlos Letelier Parga
Evaluador

Santiago, 12 de Junio de 2013





“I celebrate myself, and sing myself,
And what I assume you shall assume,
For every atom belonging to me as good belongs to you.
I loaf and invite my soul,
I lean and loaf at my ease observing a spear of summer grass.
My tongue, every atom of my blood, formed from this soil, this air,
Born here of parents born here from parents the same, and their parents the same, ...”

Walt Whitman

A mi familia por su apoyo incondicional. A mi esposa Macarena, por el soporte emocional para realizar este trabajo.

Índice de contenidos

1. Resumen	1
2. Introducción	3
2.1. La técnica de <i>dynamic clamp</i>	3
2.2. El estado de alta conductancia	8
3. Materiales y Métodos	16
3.1. Obtención de rebanadas de cerebro de rata	16
3.2. Sistema de registros electrofisiológicos	17
3.3. Sistema de registro y de <i>dynamic clamp</i>	18
3.3.1. Sistema DAQI	19
3.3.2. Sistema DAQII	19
3.3.3. Estimulación con el sistema de <i>dynamic clamp</i>	20
3.4. Cálculo de la resistencia de entrada	21
3.5. Protocolos de estimulación dinámica	22
3.5.1. Inserción de conductancias pasivas (CP)	22
3.5.2. Estado de alta conductancia artificial (EACA)	24
3.5.3. Estimulación periódica sináptica artificial (EPSA)	27

3.5.4. Protocolo para el estudio del efecto de la intensidad del ruido . sináptico artificial	29
3.5.5. Conductancias activas	29
3.6. Análisis de datos	30
3.6.1. Cálculo de la densidad del espectro de potencia	31
3.6.2. Cálculo de la probabilidad de disparo	31
3.6.3. Cálculo de entropía	32
3.6.4. Cálculo de ISID (Densidad de intervalos inter-espiga)	32
3.6.5. Cálculo de SNR* (Razón señal ruido modificada)	33
4. Resultados	35
4.1. La inserción de conductancias pasivas excitatorias e inhibitorias reduce la resistencia de entrada R_{in} neuronal	35
4.2. Recreación <i>in vitro</i> de las principales características electrofisiológicas del estado de alta conductancia observado <i>in vivo</i>	38
4.3. En el estado de alta conductancia artificial (EACA) cambia la respuesta neuronal a estímulos	42
4.4. Buscando resonancia estocástica en estado de alta conductancia artificial (EACA)	53

4.5. Restitución del régimen de disparo después del bloqueo farmacológico de los canales de sodio usando la técnica de dynamic clamp	60
5. Discusión	64
5.1. La inserción de conductancias pasivas excitatorias e inhibitorias reduce la resistencia de entrada R_{in} neuronal	64
5.2. Recreación <i>in vitro</i> de las principales características electrofisiológicas del estado de alta conductancia observado <i>in vivo</i>	65
5.3. En el estado de alta conductancia artificial (EACA) cambia cualitativamente la respuesta neuronal a estímulos	68
5.4. Buscando resonancia estocástica en estado de alta conductancia artificial (EACA)	71
5.5. Restitución del régimen de disparo después del bloqueo farmacológico de los canales de sodio usando la técnica <i>dynamic clamp</i>	73
6. Conclusión	74
Referencias	85
Apéndices	86
A. Descripción matemática de las conductancias activas tipo Sodio y Potasio in-	

sertadas usando la técnica *dynamic clamp* 86

**B. Codigos de los protocolos de estimulación desarrollados y que fueron integra-
dos al software RTXI 88**

Índice de figuras

1.	La técnica de <i>dynamic clamp</i>	5
2.	$G_{EP\text{SA}}(t)$ versus tiempo	28
3.	Inserción de conductancias pasivas (CP) usando la técnica <i>dynamic clamp</i>	38
4.	Fluctuaciones del potencial de membrana en la condición EACA	41
5.	Estimulación periódica sináptica artificial (EP\text{SA}) mediante <i>dynamic clamp</i>	44
6.	Estimulación EP\text{SA} para condición Control, CP y EACA	46
7.	Cambios en la curva de probabilidad de disparo	49
8.	Respuesta a estimulación EP\text{SA} para distintas intensidades de ruido sináptico	55
9.	Efecto de σ_i en la respuesta neuronal a un estímulo EP\text{SA}	58
10.	Recuperación del régimen de disparo después del bloqueo farmacológico de los canales de sodio	61

1. Resumen

En este seminario de título se implementó la técnica de *dynamic clamp* y se desarrolló una serie de procedimientos experimentales y computacionales para estudiar y recrear *in vitro* el estado de alta conductancia observado *in vivo* en neuronas del cerebro de mamíferos. En conjunto con esto, se desarrollaron protocolos experimentales para estudiar el efecto del ruido sináptico en la respuesta neuronal a señales sinápticas coherentes. Además, se desarrollaron protocolos experimentales usando la técnica de *dynamic clamp* con el objetivo de insertar conductancias dependientes de potencial en neuronas en forma artificial.

Los resultados preliminares obtenidos muestran que en el estado de alta conductancia cambia cualitativamente la curva de probabilidad de disparo de potenciales de acción en respuesta a estímulos. Esto sugiere que en la condición *in vivo*, una neurona es capaz de representar más información de la intensidad de un estímulo a través de potenciales de acción, además de amplificar la respuesta a señales sinápticas débiles, que en condiciones *in vitro* son sub-umbrales.

Para probar el funcionamiento de la técnica de *dynamic clamp* en la inserción de conductancias dependientes de potencial, se llevó a cabo artificialmente un *knock in* de conductancias tipo sodio y potasio, y se logró restituir el régimen de disparo de potenciales de acción de membrana en condiciones de bloqueo farmacológico de los canales de sodio

en neuronas piramidales de hipocampo.

La implementación de la técnica de *dynamic clamp* y el desarrollo de protocolos de estimulación mediante esta técnica para simular el ruido sináptico y para insertar conductancias activas, realizado en este seminario de título, abre una nueva gama de posibilidades de investigación en el laboratorio de Fisiología Celular.

2. Introducción

2.1. La técnica de *dynamic clamp*

Usando las técnicas electrofisiológicas de *patch clamp* en sus distintas configuraciones, se ha logrado conocer una inmensa parte de lo que se sabe de fisiología y biofísica de las células excitables en la época moderna. Con los datos biofísicos y electrofisiológicos que se han obtenido hasta ahora, se han construido modelos basados en la cinética molecular de los canales de iones que describen la dinámica de la actividad eléctrica en una neurona (Latorre, 1996). Esto ha permitido explicar, con una teoría matemáticamente consistente, cómo distintas configuraciones de conductancias en una neurona generan los distintos comportamientos observados experimentalmente, como el *bursting*, la descarga tónica, las oscilaciones subumbrales y la preferencia de frecuencia, entre otros (Izhikevich, 2010). Así, en vista del avance en los últimos treinta años en la construcción de modelos matemáticos que explican la dinámica neuronal (Abbott, 2008), cada vez ha sido de mayor interés poner a prueba experimentalmente estos modelos teóricos. Para realizar esto, es necesario contar con técnicas adecuadas que permitan perturbar de forma dinámica los distintos tipos neuronales. Esto es, generar estímulos realistas que simulen la corriente generada por la apertura o cierre de conductancias de membrana, dependiendo del estado dinámico en el cual se encuentra la neurona. Así, es posible modificar la dinámica intrínse-

ca de la neurona o introducir estímulos extrínsecos como por ejemplo entradas sinápticas simuladas dependientes de actividad, lo cual no se ha podido obtener usando las técnicas electrofisiológicas de *patch clamp* tradicionales.

Desde la década de los setenta la técnica de *patch clamp* se ha ido refinando, siendo en este momento posible llevar a cabo registros en la mayoría de los tipos neuronales, en las dendritas (Davie y col., 2006) e incluso en el segmento inicial del axón (Kole y col., 2008). Pero aún así, la técnica es limitada con respecto a la flexibilidad de los estímulos con que se puede perturbar una neurona. En este contexto, en 1993 fueron por primera vez publicadas las bases de la técnica de *dynamic clamp* (Sharp y col., 1993b,a; Robinson y Kawai, 1993), que permite insertar funcionalmente conductancias artificiales en neuronas.

Esta técnica puede describirse de modo general como una interfaz en tiempo real entre una o varias neuronas y un computador o máquina análoga, con la cual es posible simular la inserción de cualquier conductancia en una neurona, si se conocen las ecuaciones que describen la dinámica de dicha conductancia. Para insertar artificialmente conductancias, se usa la técnica de *patch clamp* de célula completa en modalidad de corriente controlada para realizar la medición del potencial de membrana y la inyección de corriente, y se realiza el cálculo de la corriente que se debe inyectar para simular la conductancia de interés usando un computador o una máquina análoga. Los procesos de: i) registro del potencial de membrana, ii) cómputo de la corriente que se debe inyectar (que es dependiente del poten-

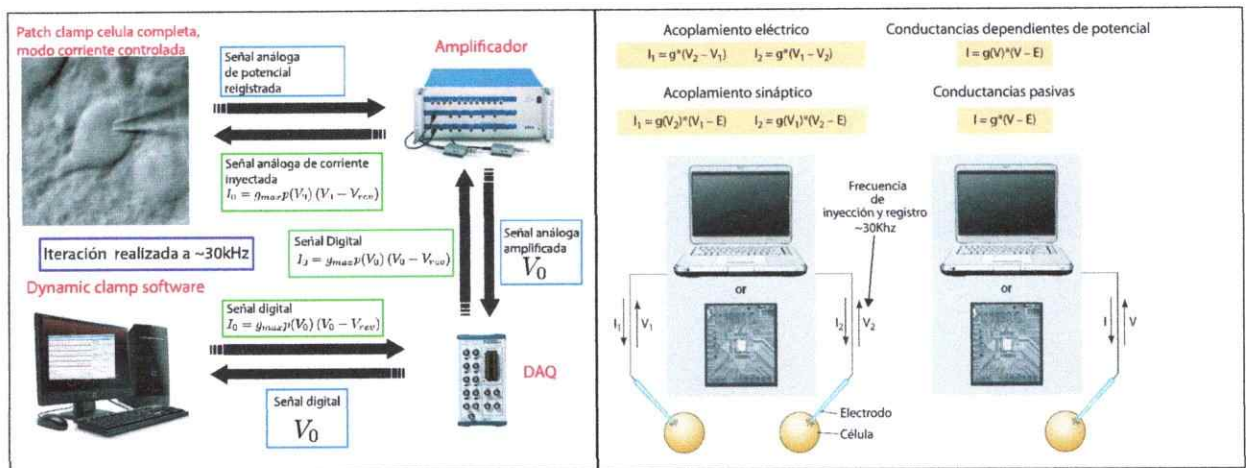


Figura 1: La técnica de *dynamic clamp*. a) Operaciones básicas que realiza el sistema de inserción de conductancias en tiempo real en una iteración: se mide el potencial de la neurona en un tiempo t_0 usando la técnica de patch clamp (célula completa y corriente controlada), esta señal analoga es amplificada por el amplificador operacional y luego digitalizada por la tarjeta de adquisición de datos. La señal digital es usada para calcular mediante el *software* de *dynamic clamp* la corriente que debe ser inyectada en la iteración actual para simular la conductancia que se quiere insertar. La señal digital de corriente a inyectar es convertida en una señal analoga por la tarjeta de adquisición de datos y luego, usando el amplificador operacional, inyectada a la neurona. Este proceso se itera a altas frecuencias ($\sim 30\text{kHz}$), generando para efectos neurofisiológicos la inserción continua en el tiempo de una conductancia. b) Aplicaciones de la técnica de *dynamic clamp*: simulación del acoplamiento sináptico y eléctrico entre dos o más neuronas (izquierda); inserción de conductancias que pueden depender o no del potencial de membrana (derecha). También es posible suprimir conductancias endógenas. Adaptado de (Goaillard y Marder, 2006).

cial medido) e iii) inyección de la corriente, se realizan a altas frecuencias de manera ininterrumpida en el tiempo, para simular en forma continua la existencia de las conductancias en las vecindades de la zona de registro. Para entender de manera más clara el funcionamiento de la técnica, en la Figura 1a se explican de manera esquematizada las operaciones básicas que realiza el sistema de inserción de conductancias *dynamic clamp* en tiempo

real. Se muestra a modo de ejemplo el procedimiento para la inserción de una conductancia activa con conductancia máxima g_{max} , potencial de inversión V_{rev} y una sola variable de compuerta $p(t)$. En 1) se mide el potencial de membrana V_0 en un determinado tiempo t_0 . Luego, en 2) se computa la corriente que debe inyectar el sistema para simular una conductancia determinada (que para una conductancia activa es $I_0 = g_{max}p(t_0)(V_0 - V_{rev})$). Para conductancias dependientes de potencial la cinética de la corriente está descrita por ecuaciones diferenciales ordinarias que son integradas numéricamente por el *software* en tiempo real, pero en general, el estímulo insertado puede obedecer cualquier dinámica descrita matemáticamente, tanto determinista como estocástica. Luego, en 3) Se inyecta la corriente calculada a la neurona, para luego repetir iterativamente este procedimiento. Para que esta técnica funcione es fundamental que las iteraciones sean a velocidades varias veces más rápidas que el tiempo característico de cualquier proceso biofísico que pueda registrarse en la neurona ($\sim 30\text{kHz}$). Esto quiere decir, usando tiempos de registro e inyección muy cortos (tiempo entre t_0 y t_1), para simular la inserción de una conductancia de manera continua en el tiempo (Economio y col., 2010; Prinz y col., 2004).

Con este sistema es posible simular, en el lugar de medición del potencial de membrana, la existencia de cualquier conductancia que tenga una descripción matemática, necesitándose sólo el sistema experimental de registro y una capacidad de cómputo presente en la mayoría de computadores de escritorio que están actualmente en el mercado (Prinz

y col., 2004). Como se muestra en la Figura 1b, usando la técnica de *dynamic clamp* se pueden insertar distintos tipos de conductancias que dependan o no del potencial de membrana, siendo posible tanto la inserción de conductancias como también la supresión de conductancias endógenas. De este modo, se lleva a cabo artificialmente un *knock in* o *knock out* de conductancias (Ma y Koester, 1996; Hughes y col., 1998; Dorval, 2005). Como se observa en la Figura 1b, también es posible realizar artificialmente el acoplamiento sináptico o eléctrico entre dos o más neuronas (Sharp y col., 1996; Elson y col., 1998). Usando esta técnica, también se puede insertar conductancias que simulan la actividad sináptica de una red neuronal activa a partir de modelos fenomenológicos (Fellous y col., 2003) o biofísicamente detallados (Kispersky y col., 2011). Así, la técnica de *dynamic clamp* es muy versátil y nuevas e interesantes aplicaciones aún están en desarrollo (Idoux y Mertz, 2011; Brette y col., 2008).

Una limitación de esta técnica que hay que tener claro es que la inserción de conductancias es sólo local en el entorno de la pipeta, no siendo posible estudiar el efecto de cambios en la distribución espacial de las conductancias en una neurona usando esta metodología. Otra limitación importante es que la corriente inyectada por el sistema cuando se inserta una conductancia artificial es inespecífica, es decir, es debido al flujo de distintos tipos de iones (Ej: Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^-), a diferencia de la mayoría de las conductancias endógenas. Por lo tanto, con esta técnica sólo se puede estudiar el efecto de insertar una

conductancia determinada, sin incluir el posible efecto del cambio en las concentraciones iónicas particulares debido a la activación de esa conductancia, a diferencia de lo que ocurre cuando la conductancia insertada es una *conductancia real* y no una artificial. Muchas veces esto es importante, sobre todo para conductancias que permean Ca^{2+} , ion fundamental en la señalización celular. Por último, distorsiones en la medición del potencial de membrana propias de la técnica *patch clamp* en modalidad de corriente controlada o artefactos producidos por la resistencia en serie, pueden inducir errores en la inyección de corriente, lo cual puede ser crítico al insertar conductancias dependientes de potencial. Por lo anterior, se debe ser más cuidadoso que lo usual para minimizar estas distorsiones, usando pipetas de resistencia baja.

Mayores detalles acerca de la técnica se encuentran en las revisiones (Economu y col., 2010; Prinz y col., 2004), que entregan un panorama amplio y explicativo sobre aspectos técnicos y las distintas aplicaciones que se han hecho hasta ahora de esta metodología.

En este seminario de título se implementó la metodología de *dynamic clamp* y ésta se utilizó para recrear *in vitro* el estado de alta conductancia.

2.2. El estado de alta conductancia

En la corteza cerebral, una neurona piramidal recibe entre 5000 y 60000 contactos sinápticos. Se ha observado que en las estructuras corticales *in vivo* las neuronas disparan

espontáneamente, esto quiere decir sin necesidad de estimularlas eléctricamente (Evarts, 1964). Si los disparos de la mayoría de las neuronas de la red neuronal activa no están correlacionados, entonces uno esperaría que la conductancia sináptica total en una neurona en el tiempo tuviera una dinámica fluctuante de manera estocástica, fenómeno que puede ser entendido como un bombardeo sináptico debido a las descargas presinápticas no correlacionadas. En los pocos registros intracelulares que se han hecho *in vivo* en animales despiertos (Matsumura y col., 1988; Baranyi y col., 1993; Steriade y col., 2001; Woody y Gruen, 1978; Berthier y Woody, 1988) (son pocos debido a la inestabilidad mecánica al realizar los registros) se ha observado una dinámica del potencial de membrana y características electrofisiológicas de las neuronas consistentes con la idea de un bombardeo sináptico. A este conjunto de características electrofisiológicas que se observan en una neurona *in vivo* se le llama **estado de alta conductancia**. Es importante recalcar que estas características electrofisiológicas son diferentes a las observadas en registros de rebanadas de cerebro, condición experimental que llamaremos *in vitro*.

Las principales características electrofisiológicas observadas en neuronas *in vivo* (estado de alta conductancia) son: disminución de entre un 25%-50% de la resistencia de entrada con respecto a registros *in vitro* en las mismas regiones cerebrales, un potencial de membrana despolarizado (alrededor de -60mV), fluctuaciones estocásticas del potencial de membrana ($\sigma_V = 2-6\text{mV}$) y descargas tónicas irregulares entre 4-40Hz (Destexhe

y col., 2003). La disminución de la resistencia de entrada es producida por el aumento de la conductancia total de la neurona, debido a un aumento de la conductancia sináptica promedio. La existencia de un potencial de reposo más despolarizado se debe a la activación de conductancias sinápticas tanto excitatorias como inhibitorias que no están activas en condiciones *in vitro*, y cuyo potencial de inversión efectivo (tomando en cuenta los dos tipos de conductancias sinápticas sumadas) es de alrededor de -60 mV. Por otro lado, las fluctuaciones del potencial de membrana y las descargas (basales) son producidas por el carácter estocástico del bombardeo sináptico producido por la red neuronal activa. Un contundente número de estudios hechos tanto *in vivo* como *in vitro* (Haider y McCormick, 2009), además de trabajos *in silico* (Destexhe y Paré, 1999), sugieren que la conductancia total y las fluctuaciones de la conductancia observadas *in vivo* dependen principalmente de la actividad de la red neuronal en la cual está embebida la célula. Por lo tanto, la resistencia de entrada de la neurona *in vivo* depende del estado conductual del animal (vigilia, sueño de onda lenta o sueño paradójico) (Steriade y col., 2001; Haider y McCormick, 2009). Para evaluar la contribución de las conductancias sinápticas a la disminución de la resistencia de entrada de la neurona, se realizaron registros *in vivo* bloqueando los canales de sodio de neuronas en el área cortical de registro, perfundiendo con tetrodotoxina. En estos experimentos se encontró que el potencial de membrana se hiperpolariza hasta valores similares a los observados *in vitro* en registros de rebanadas, y la resistencia de entrada aumenta

también a valores comparables a los observados *in vitro* en registros de rebanadas con un electrodo similar y los mismos tipos neuronales (Evarts, 1964). Esto sugiere que tanto la despolarización de la membrana como el aumento de la conductancia total de la neurona se deben a la actividad sináptica generada por descargas de potenciales de acción de los componentes de la red. Por otro lado, distintos estudios muestran que la variabilidad del potencial de membrana y la generación de descargas tónicas irregulares observadas *in vivo* en áreas corticales, se deben principalmente a la actividad sináptica de la red neuronal (Destexhe y col., 2003; Haider y McCormick, 2009).

Así, las neuronas *in vivo* conectadas sinápticamente con la red neuronal activa (estado de alta conductancia), poseen características electrofisiológicas cualitativa y cuantitativamente distintas a las observadas en el mismo tipo de neuronas en rebanadas, en donde la red neuronal tiene una actividad baja. Como consecuencia de esto, tienen propiedades muy diferentes de integración de señales sinápticas. En estado de alta conductancia, al aumentar la conductancia promedio de la neurona disminuye la constante de tiempo de la membrana. Esto conlleva una mayor resolución temporal en el procesamiento de señales sinápticas, y así, una discriminación más fina tanto de señales sinápticas más alejadas (Bernander y col., 1991; Rudolph y Destexhe, 2003) como de señales sinápticas de mayor frecuencia (Rudolph, 2003). Por otro lado, una consecuencia directa de la teoría del cable es que al aumentar la conductancia hay una mayor atenuación espacial de la señales

sinápticas. Esta atenuación produce una mayor independencia eléctrica de las dendritas, de modo que cada dendrita podría actuar como una subunidad funcional independiente. Como consecuencia de ello, aumentaría la capacidad de procesamiento de señales provenientes del árbol dendrítico por parte del soma (Gurney, 2001; Rudolph y Destexhe, 2003; Wei y col., 2001). Otro cambio importante es que las fluctuaciones estocásticas de conductancia, causadas por el bombardeo sináptico, generan fluctuaciones del potencial de membrana, lo que produce que la respuesta de la neurona a estímulos tenga también un mayor componente estocástico. Esto constituye una diferencia cualitativa respecto a lo observado *in vitro*, en donde en general se puede establecer a modo de umbral de estímulo un estrecho rango de la intensidad de estímulo sobre el cual las neuronas responden con potenciales de acción, bajo el cual están silentes y dentro del cual disparan aleatoriamente. La respuesta de las neuronas en este estado está caracterizado por un comportamiento predominantemente determinista, pudiendo identificar a esta banda umbral de intensidad de estímulo de manera bien definida para cada experimento. Esto cambia drásticamente en el estado de alta conductancia, en donde para casi todas las intensidades de estímulo la neurona responde disparando de manera predominantemente estocástica, pudiendo en este caso sólo asociarse una determinada intensidad de estímulo con una probabilidad de disparo. Esta característica del estado de alta conductancia ha cambiado la forma de entender el tipo de procesamiento o computación que realiza *in vivo* una neurona con las señales



sinápticas que contienen información en un sentido matemático (Cover y Thomas, 1991). Cambiado el paradigma desde un procesamiento de la información predominantemente determinista, característico de la dinámica observada en registros *in vitro*, a un paradigma en donde se realiza un procesamiento de la información predominantemente probabilístico, propio del estado de alta conductancia. Es importante mencionar que en estado de alta conductancia hay también un cambio de la dinámica intrínseca de la neurona, debido al aumento de la conductancia promedio de la neurona y las fluctuaciones estocásticas de conductancia (Prescott y col., 2008). Las características electrofisiológicas dependientes de la conductancia que podrían considerarse estáticas en experimentos *in vitro*, como el umbral de disparo, el potencial de reposo o la preferencia de frecuencia (en neuronas resonantes), entre otras, no sólo cambian en promedio, sino que sus fluctuaciones estocásticas en el tiempo adquieren mayor relevancia.

Debido a la gran dificultad técnica que supone hacer registros estables *in vivo* en animales despiertos, se han buscado estrategias alternativas para estudiar con detalle el cambio en las propiedades de neuronas únicas en estado de alta conductancia y cómo éstas responden a diferentes tipos de estímulos en presencia de bombardeo sináptico. En su mayoría, estas estrategias han sido teóricas o computacionales: usando modelos, algunos biofísicamente detallados, se ha tratado de estudiar el cambio en la dinámica de la neurona y cómo el ruido sináptico afecta la respuesta neuronal (Destexhe y col., 2003). Un

enfoque alternativo al estudio *in vivo* y al estudio *in silico* del estado de alta conductancia, fue descrito por primera vez por Destexhe y col. en el año 2001. En este trabajo se construyó un modelo fenomenológico basado en un proceso estocástico Uhlenbeck-Ornstein para dar cuenta de la dinámica estocástica observada experimentalmente durante el bombardeo sináptico *in vivo*, modelo que pudo ser implementado experimentalmente usando la técnica de *dynamic clamp* (Fellous y col., 2003). Con este modelo fue posible reproducir *in vitro* las características electrofisiológicas del estado de alta conductancia mediante el *dynamic clamp*. Después de ajustar los parámetros libres a partir de registros de la actividad sináptica, se recuperaron las propiedades estadísticas y espectrales del ruido sináptico observado *in vivo* (Destexhe y Bal, 2010). De este modo, es posible estudiar experimentalmente con detalle el cambio en las propiedades de integración de estímulos sinápticos y el cambio en la dinámica intrínseca de una neurona en el estado de alta conductancia recreado de manera artificial en la célula *in vitro*. En este seminario de título, este modelo fue implementado usando la técnica de *dynamic clamp* y fue utilizado para desarrollar herramientas experimentales para el estudio del impacto del ruido sináptico en la dinámica neuronal. Una explicación en detalle de la descripción matemática del modelo y su implementación se encuentra en la sección 3.5.2 de Materiales y Métodos.

En estudios computacionales (Hô y Destexhe, 2000) y experimentales (Shu y col., 2003) se ha mostrado que estímulos subumbrales que no evocan disparos de potenciales

de acción *in vitro*, en estado de alta conductancia inducen descarga con una probabilidad no nula. Estos estudios muestran que en estado de alta conductancia se amplía el rango de intensidad del estímulo para el cual descarga una neurona, produciendo el ruido sináptico un aumento en la capacidad de respuesta a estímulos de baja intensidad. Este fenómeno tiene ciertas características de lo que se conoce en física como resonancia estocástica (Gammaitoni y col., 1998) y que ha sido descrito en modelos teóricos (Longtin, 1993; Rudolph y Destexhe, 2001) y en experimentos en neuronas (Wiesenfeld, 1995). La resonancia estocástica es un fenómeno bastante ubicuo en la naturaleza, en que un sistema no lineal que recibe una señal sub-umbral amplifica o aumenta la respuesta a esa señal debido a la presencia de ruido en el sistema, existiendo una intensidad del ruido para la que la respuesta es máxima, lo que es muchas veces caracterizado como un máximo en la curva de razón señal/ruido. En este seminario de título se desarrollaron las herramientas experimentales necesarias para estudiar este fenómeno en sistemas neuronales.

3. Materiales y Métodos

3.1. Obtención de rebanadas de cerebro de rata

En este trabajo utilicé ratas Sprague Dawley de 18-23 días de edad. Las ratas fueron profundamente anestesiadas con éter y luego decapitadas. El cerebro fue extraído mediante un corte en la parte medial superior del cráneo en sentido caudo-rostral, y rápidamente el cerebro fue puesto en un vaso precipitado con solución de disección a 4°C, que contenía (en mM): sacarosa 206; KCl 2,8; CaCl₂ 1; MgCl₂ 1; Mg₂SO₄ 2; Na₂HPO₄ 1,125; NaHCO₃ 26; glucosa 10; Ácido Ascórbico 0.4; osmolaridad 295±5 mOsm y pH 7,4 ajustado mediante burbujeo con mezcla de O₂ (95%) y CO₂ (5%). Luego de un minuto de reposo el cerebro era disectado en una placa petri que contenía solución de disección, sobre hielo. Los hemisferios fueron separados y luego se realizó un corte en la parte posterior de cada hemisferio en sentido septotemporal con 45° respecto al eje longitudinal del cerebro. Los dos hemisferios fueron pegados con cianoacrilato en un vibrátomo, dejando vertical el eje dorsoventral del hipocampo y luego bañados con solución de disección a 4°C. Por cada hemisferio se obtuvo un total de 4 rebanadas transversales de 400 μm de espesor, que conserva la conectividad entre el giro dentado, CA3 y CA1. Las rebanadas fueron puestas en una cámara de mantención que contenía líquido cefalorraquídeo artificial (LCRA) compuesto de (en mM): NaCl 124; KCl 2,8; CaCl₂ 2; Mg₂SO₄ 2; Na₂HPO₄

1,25; NaHCO₃ 26; glucosa 10; Ácido Ascórbico 0.4; osmolaridad de 295±5 mOsm y pH 7,4, burbujeado con mezcla de O₂ con CO₂; e incubadas a 30°C durante 1 hora y luego mantenidas a temperatura ambiente durante no más de 8 horas antes de comenzar los registros.

3.2. Sistema de registros electrofisiológicos

Para realizar los registros de la actividad eléctrica de las neuronas piramidales puse una rebanada de cerebro en una cámara de registro de 400µl de capacidad, asegurada poniendo sobre ella un ancla de acero inoxidable en forma de herradura con hilos de fibra de vidrio conectando sus dos extremos. La cámara de registro iba montada sobre la platina de un microscopio derecho Olympus BX51WL y conectada mediante mangueras a un contenedor de 15 ml de LCRA. Una bomba peristáltica Masterflex modelo HV-77120-62 que permitía la recirculación del LCRA que bañaba a la rebanada con un flujo de 2 ml/min. La temperatura de la solución en la cámara de registro se ajustó a 31±2 °C mediante un termorregulador basado en resistencias de potencia que cubría un serpentín de la manguera de la salida de la solución, ubicado a 10 cm de la cámara de registro. Las neuronas fueron visualizadas con un objetivo de 40X mediante óptica derecha con iluminación oblicua. Utilicé pipetas de vidrio de borosilicato de 4-5 MΩ confeccionadas con un Puller horizontal Sutter P-87 rellenas con solución de pipeta que contenía (en

mM): K-gluconato 123; KCl 10; CaCl₂ 0,1; MgCl₂ 1; Na₂-ATP 1; NaGTP 0,2; glucosa 14; EGTA 1; HEPES 10; Fosfocreatina-Na₂ 10, osmolaridad 285±5 mOsm y pH 7,4, ajustado con KOH. Luego de identificar la neurona apropiada llevaba la pipeta hacia ella usando un micromanipulador motorizado Sutter Instrument MP-285, aplicando presión positiva para evitar que se tapara la pipeta al entrar al tejido. Estando sobre el soma liberaba de la neurona la presión aplicada para formar el gigasello (>10GΩ). Evaluaba la magnitud del sello en modalidad de potencial controlado midiendo la corriente que se producía entre la pipeta y el electrodo de tierra al aplicar un pulso cuadrado de 5 mV sobre un potencial de mantención de -70 mV. Si luego de un minuto no se producía la condición de célula completa (ruptura de la membrana que separa el interior de la pipeta con el interior de la célula) inducía la ruptura aplicando una leve succión en la pipeta. El potencial de juntura calculado según Neher (1992) fue de alrededor de -11mV.

3.3. Sistema de registro y de *dynamic clamp*

El sistema de registro y estimulación dinámica necesario para la técnica de *dynamic clamp* fue implementado por mí durante el desarrollo de este seminario de título. La actividad eléctrica fue medida con el amplificador de patch clamp Heka EPC9, el que fue conectado a dos sistemas de adquisición de datos: Sistema DAQI y Sistema DAQII.

3.3.1. Sistema DAQI

La función de este sistema en el montaje experimental fue el control del amplificador Heka EPC9 y eventualmente su utilización como sistema de adquisición de datos. Las señales eléctricas provenientes del amplificador eran adquiridas por la tarjeta de adquisición de datos ITC-16 en un computador con CPU Intel Celeron 2.667 Ghz y sistema operativo Windows XP sp3. El control del amplificador se realizaba mediante el software Pulse 8 (Heka), con el cual se manejaban los parámetros del amplificador, y se controlaban protocolos experimentales automatizados.

3.3.2. Sistema DAQII

La función de este sistema en el montaje experimental fue albergar el sistema de *dynamic clamp* que realiza la estimulación dinámica, la adquisición y el almacenamiento de datos y el control de los parámetros del *dynamic clamp* en tiempo real de manera *on-line*. Las señales eléctricas provenientes del amplificador eran adquiridas mediante la tarjeta de adquisición de datos NI PCI-6221 en un computador con CPU Intel core2 duo 3 Ghz y sistema operativo Ubuntu 10. La estimulación dinámica y adquisición de datos fue controlada con el software libre RTXI. Los protocolos de estimulación basados en modelos teóricos fueron desarrollados en este seminario de título (Sección 3.5) en C++ y fueron integrados al software RTXI. Durante el curso de un experimento, era posible controlar

los parámetros de estimulación en tiempo real de manera *on-line*. La adquisición de datos fue realizada en sistemas de archivos HDF5, una estructura de archivos capaz de guardar de forma organizada grandes cantidades de datos de distintas características. Así, eran guardados en un solo archivo los registros electrofisiológicos y los parámetros y variables dinámicas de los modelos teóricos usados en el sistema de *dynamic clamp*. Se usaron frecuencias de estimulación dinámica (registro y posterior estimulación) de entre 25kHz y 33kHz, que corresponden a períodos de entre 40 μ s y 30 μ s, respectivamente. Esto es entre 25 a 30 veces más veloz que el evento más rápido que se quiere observar, que son los potenciales de acción (\sim 1ms). Esta velocidad de registro es suficiente para poder reconstruir todos los fenómenos que se quieren estudiar, de acuerdo a el teorema de muestreo de Nyquist–Shannon (Marks, 2012).

3.3.3. Estimulación con el sistema de *dynamic clamp*

Luego de obtener la configuración de célula completa en modalidad de voltaje controlado, esperaba entre 3 y 5 minutos con un voltaje de mantención de -60 mV para dializar la neurona con la solución de la pipeta. Luego de esto, cambiaba a la modalidad de corriente controlada, imponiendo una corriente de mantención necesaria para mantener el potencial de membrana en torno a los -60mV. Todo esto era manejado por el sistema DAQI. Usando el mismo sistema, conectaba DAQII al amplificador como un estímulo externo,

e iba disminuyendo suavemente la corriente de mantención inyectada por el sistema DAQI y aumentando la corriente de mantención inyectada por el sistema DAQII, teniendo el cuidado de mantener el potencial de membrana de la neurona en un régimen sub-umbral. Finalmente fijaba la corriente de mantención inyectada por el sistema DAQI en 0pA, y la corriente de mantención del sistema DAQII en la corriente necesaria para mantener la neurona en torno a los -60mV.

Luego de esto, usando el sistema DAQII realizaba lo protocolos de estimulación descritos en la sección 3.5, la adquisición de datos y el control *on line* en tiempo real de los parámetros de estimulación dinámica del sistema de *dynamic clamp*.

3.4. Cálculo de la resistencia de entrada

Utilicé un protocolo que consiste en la inyección de una serie de pulsos cuadrados de corriente de 500 ms de duración desde $-250\text{pA} \pm 50\text{pA}$ hasta $125\text{pA} \pm 75\text{pA}$ respectivamente, con 2s de intervalo entre pulsos. Se obtuvo el voltaje con el que respondió la neurona a cada pulso de corriente, tomando el promedio en un intervalo de 50 ms centrado en la mitad del tiempo de estímulo. La resistencia de entrada se obtuvo de la pendiente del ajuste lineal de la curva del cambio de voltaje versus la intensidad del pulso, sólo para los pulsos hiperpolarizantes (pulsos de corriente negativa).

3.5. Protocolos de estimulación dinámica

En esta sección se mostrarán los diferentes protocolos de estimulación dinámica usando la técnica de *dynamic clamp* usados en este trabajo y desarrollados por mí en el curso de este seminario de título. Los protocolos desarrollados en C++ fueron integrados al software RTXI, para luego utilizarlos experimentalmente. El código en C++ de los protocolos de estimulación dinámica se encuentra en el Apéndice B.

3.5.1. Inserción de conductancias pasivas (CP)

Usando la técnica de *dynamic clamp* se insertaron dos conductancias pasivas (independientes del potencial) que representan las conductancias sinápticas promedio tanto excitatorias (\hat{G}_e) e inhibitorias (\hat{G}_i), con potenciales de inversión de 0mV y -75mV respectivamente. A esta condición experimental se le llamó condición CP (conductancias pasivas). La corriente inyectada por el sistema *dynamic clamp* en esta condición experimental fue:

$$I_{CP} = I_{CC} + \hat{G}_e V + \hat{G}_i (V + 75) \quad (1)$$

Dónde I_{CC} corresponde a una corriente inyectada que no depende del potencial de membrana medido (V), como es el caso de los protocolos de escalones de corriente. Mantendremos esta notación para todos los protocolos. La relación entre la resistencia de entrada original de la neurona en la condición control ($R_{Control}$) y la resistencia de entrada

medida en la condición CP (R_{CP}), se puede encontrar usando la Ley de Ohm, expresión que queda, después de un poco de desarrollo algebraico, como:

$$R_{CP} = \frac{R_{Control}}{1 + R_{Control}(\hat{G}_e + \hat{G}_i)} \quad (2)$$

La Ecuación (2) relaciona la conductancia total insertada a través de *dynamic clamp* ($\hat{G}_e + \hat{G}_i$) y la resistencia de entrada de la neurona en la condición control ($R_{control}$), con la resistencia de entrada cuando las conductancias pasivas son insertadas en la condición CP (R_{CP}). Para validar el sistema experimental, se comparó el cambio en R_{CP} , estimada a través de un ajuste lineal de los datos obtenidos del protocolo de pulsos de corriente, con el cálculo hecho con la Ecuación (2) usando la resistencia de entrada medida de la neurona en la condición control y los parámetros fijados en el sistema experimental \hat{G}_e y \hat{G}_i .

Por último, para calcular el potencial de reposo de la neurona en la condición CP (V_{CP}^*), tomando en cuenta que $V_{Control}^*$ es el potencial de reposo de la neurona en la condición control, debemos imponer que la corriente total que pasa a través de la membrana sea nula, de modo que después de algunos pasos algebraicos se obtiene:

$$V_{CP}^* = \frac{V_{Control}^* R_{Control}^{-1} - 75\hat{G}_i}{R_{Control}^{-1} + \hat{G}_e + \hat{G}_i} \quad (3)$$

3.5.2. Estado de alta conductancia artificial (EACA)

Para recrear el estado de alta conductancia de manera artificial usando la técnica de *dynamic clamp*, se insertaron dos conductancias estocásticas $G_i(t)$ y $G_e(t)$, que representan las conductancias sinápticas instantáneas excitatorias e inhibitorias:

$$G_i(t) = g_i(t) + \hat{G}_i \quad (4)$$

$$G_e(t) = g_e(t) + \hat{G}_e \quad (5)$$

Se usó un modelo fenomenológico basado en un proceso estocástico Uhlenbeck-Ornstein (Uhlenbeck y Ornstein, 1930) para dar cuenta de la dinámica estocástica observada experimentalmente durante el bombardeo sináptico *in vivo*, modelo que fue por primera vez descrito en (Destexhe y col., 2001). En este modelo, \hat{G}_e y \hat{G}_i son conductancias pasivas que representan las conductancias sinápticas promedio excitatorias e inhibitorias, respectivamente; $g_e(t)$ y $g_i(t)$ son variables estocásticas del tipo Uhlenbeck-Ornstein que representan las fluctuaciones de las conductancias sinápticas excitatorias e inhibitorias, respectivamente. Las variables $g_e(t)$ y $g_i(t)$ satisfacen las ecuaciones:

$$\frac{dg_i}{dt} = -\frac{g_i}{\tau_i} + D_i N[0, 1] \quad (6)$$

$$\frac{dg_e}{dt} = -\frac{g_e}{\tau_e} + D_e N[0, 1] \quad , \quad (7)$$

$N[0, 1]$ es un número al azar proveniente de una distribución gaussiana con promedio cero y desviación standard igual a 1. Para realizar la integración numérica de estas ecuaciones diferenciales estocásticas, se utilizó el método de integración numérica de Gillespie (Gillespie, 1996), aplicado por primera vez para simular el estado de alta conductancia en (Destexhe y col., 2001); ver Apéndice B. Usando este método, se logró la eficiencia computacional necesaria para realizar la integración numérica a las velocidades de estimulación dinámica que requiere el sistema de *dynamic clamp*. El método para obtener números al azar de una distribución gaussiana fue el algoritmo de Box-Muller (Fernández y Criado, 1999).

Se tomó en cuenta la relación característica de un proceso de Uhlenbeck-Ornstein:

$$\sigma_{i,e}^2 = \frac{D_{i,e}\tau_{i,e}}{2} \quad , \quad (8)$$

dónde σ corresponde a la desviación standard de g . Se puede ver en la ecuaciones 4, 5 y 6 que el modelo fenomenológico para simular el estado de alta conductancia depende de



seis parámetros: τ_i , τ_e , σ_i , σ_e , \hat{G}_i y \hat{G}_e . En este trabajo se usaron valores para $\tau_e = 2,728$ y $\tau_i = 10,49$ obtenidos del ajuste de la relación (8) a datos experimentales de neuronas corticales (Destexhe y col., 2001). Por otro lado, se consideró que los parámetros restantes: σ_i , σ_e , \hat{G}_i y \hat{G}_e cumplen con las relaciones:

$$\frac{\sigma_i}{\sigma_e} = 2,2 \quad (9)$$

$$\frac{\hat{G}_i}{\hat{G}_e} = 4,736 \quad (10)$$

Relaciones que fueron obtenidas del ajuste del modelo de Uhlenbeck-Ornstein con datos de modelos neuronales biofísicos detallados y registros electrofisiológicos (Destexhe y col., 2001). Más detalles del método para hacer el ajuste de este modelo usando datos experimentales pueden obtenerse en (Destexhe y Bal, 2010). Así, la corriente aplicada por el sistema *dynamic clamp* en la condición de estado de alta conductancia artificial o EACA fue:

$$I_{EACA} = I_{CC} + G_i(t)(V + 75) + G_e(t)V \quad (11)$$

Todos los experimentos hechos en este trabajo fueron con los valores para τ_i y τ_e antes mencionados, pudiendo variar los valores de σ_i , σ_e , \hat{G}_i y \hat{G}_e para distintos experimentos,

pero siempre cumpliendo las relaciones 9 y 10.

3.5.3. Estimulación periódica sináptica artificial (EPSA)

Para emular de forma artificial en la célula la actividad periódica concertada de grupos de sinapsis excitatorias, producida por la descarga sincrónica de poblaciones de neuronas, usé la función alfa para describir el curso temporal de cada evento sináptico concertado (conductancia sináptica promedio). El uso de esta función en neurociencia se ha descrito en trabajos teóricos para modelar el curso temporal de los potenciales post-sinápticos, ya que su forma es similar a los potenciales sinápticos obtenidos experimentalmente (Rall, 1967). La expresión matemática que describe el curso temporal de la conductancia insertada es:

$$G_{EPSA}(t) = G_{Max} \frac{t}{\tau} e^{-t/\tau+1} \quad , \quad (12)$$

e^1 es un factor de normalización para asegurar que $G_{EPSA}(t)$ tenga un máximo en G_{Max} . En la Figura 2 se observa una gráfica del curso temporal de $G_{EPSA}(t)$ para valores de τ entre 1 y 5ms.

En los experimentos presentados en este trabajo se usó $\tau = 1$ ms. La estimulación se hizo de forma periódica, con un período de 200ms y el potencial de inversión de la corriente fue de 0mV, con el fin de emular corrientes sinápticas excitatorias. Así, la corriente

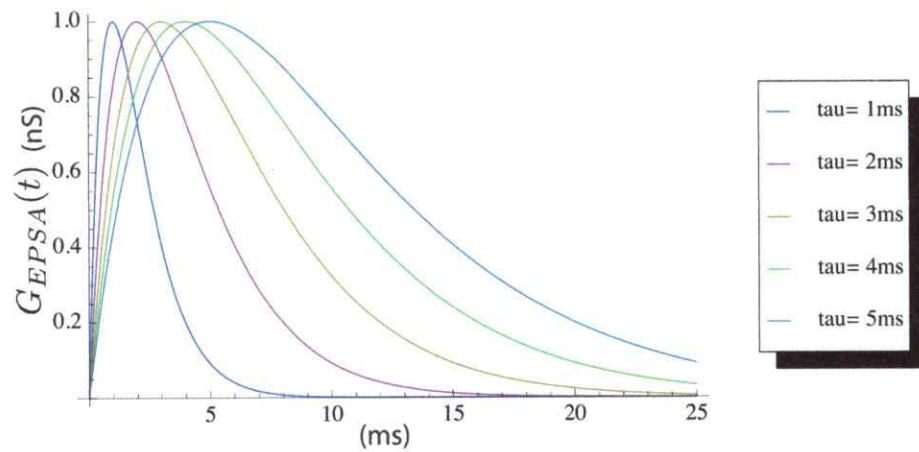


Figura 2: $G_{EPSA}(t)$ versus tiempo: Gráfico de $G_{EPSA}(t)$ versus tiempo, para valores de τ entre 1 y 5ms según muestra la leyenda. $G_{Max} = 1$.

inyectada por el sistema *dynamic clamp* cada 200ms fue:

$$I_{EPSA} = I_{CC} + G_{EPSA}(t)V \quad (13)$$

A este tipo de estimulación periódica sináptica artificial se le denominó estimulación EPSA. En la Sección 4.3, se estimuló con EPSA durante 11 series de estimulación, en donde se aumentó G_{Max} de manera lineal desde un valor inicial (mínimo) hasta un valor final (máximo). Esto se hizo para las tres condiciones experimentales: control, CP y EA-CA. Los valores mínimo y máximo de G_{Max} fueron distintos en cada experimento, con el objetivo de recorrer un intervalo de G_{Max} en donde la estimulación en su inicio potenciales de acción, pero sí lo hiciera al final. El código de este protocolo, desarrollado en C++e

integrado al software RTXI, se adjunta en el Apéndice B.

3.5.4. Protocolo para el estudio del efecto de la intensidad del ruido sináptico artificial

Se estudió el impacto de la intensidad del ruido en el aumento o disminución de la respuesta neuronal a un estímulo periódico sináptico artificial (EPSA) en el estado de alta conductancia artificial (EACA). Para esto, se desarrolló un protocolo experimental en que, una neurona era sometida a un estímulo EPSA subumbral (conductancia máxima G_{Max} constante, período 200 ms, $\tau = 1\text{ms}$) en la condición EACA (variando linealmente σ_i desde 0 a un valor máximo en 11 series, mientras se modificaba σ_e siguiendo la Ecuación 9). Cada serie tuvo una duración de 10 s, con 500 ms sin ruido sináptico artificial ($\sigma_i = 0$ y $\sigma_e = 0$) entre cada una. La estimulación EPSA se mantuvo durante todo el experimento.

Para aislar el efecto de la aparición azarosa de espigas a la frecuencia del estímulo EPSA causada por el ruido sináptico artificial, se usó como control negativo el mismo protocolo experimental descrito anteriormente, pero en ausencia de estimulación EPSA. A esta condición experimental se le llamó control negativo (Sección 4.4).

3.5.5. Conductancias activas

Para recuperar el régimen de disparo durante el bloqueo farmacológico de los canales de sodio usando la técnica *dynamic clamp*, se utilizó un protocolo de escalones de corrien-

te. Se inyectó una serie de pulsos cuadrados de corriente de 500 ms de duración y magnitudes entre 0 y 300pA. Se aplicaron en total 6 pulsos, aumentando la intensidad de manera lineal, con 2 segundos de descanso entre cada pulso. Esto se realizó para tres condiciones experimentales: condición control, condición con TTX y condición TTX+*dynamic clamp*.

En la condición control sólo se le aplicaba a la neurona la corriente de mantención y luego el protocolo de escalones de corriente. En la condición TTX se agregó 2.5 μ l de TTX por cada 10 ml de solución extracelular (concentración final 1 μ M) y luego de esperar 2-3 minutos para que re-circulara la solución con TTX, se realizó el protocolo de escalones de corriente. Por último, se aplicó el mismo protocolo en presencia de TTX, después de insertar mediante *dynamic clamp* conductancias dependientes de potencial de sodio y potasio tipo Hodgkin y Huxley modificadas (Richardson, 2003), según se describe en el Apéndice A.

3.6. Análisis de datos

El análisis de datos fue realizado con el software científico IgorPro 6.02. Para ello desarrollé dentro de esta plataforma protocolos computacionales para la manipulación de gran cantidad de datos (\sim 1Gb) y su análisis.

3.6.1. Cálculo de la densidad del espectro de potencia

Para realizar esto, primero se calculó numéricamente el espectro de potencia del voltaje de membrana sub-umbral registrado en la condición EACA usando la transformada de Fourier rápida (*FFT*) integrada en el software IgorPro. Luego, el espectro de potencia de la señal se normalizó por su integral numérica en el dominio de la frecuencia. Esto queda expresado en la siguiente ecuación:

$$PSD(\omega) = \frac{|FFT(V)|^2}{\int |FFT(V)|^2 d\omega} \quad (14)$$

3.6.2. Cálculo de la probabilidad de disparo

La probabilidad de disparo durante una serie de estimulación se definió como el número de estímulos EPSA en donde se observó al menos una espiga en un intervalo T ms (20 o 50ms) después de comenzar el estímulo ($N_{espigas}$), dividido por el número total de estímulos EPSA de la serie ($N_{estimulos}$). Así la probabilidad de disparo se escribe como:

$$P_{espigas} = \frac{N_{espigas}}{N_{estimulos}} \quad (15)$$

Para los experimentos de la Sección 4.3, se calculó $P_{espigas}$ para cada serie de estimulación correspondiente a una determinada conductancia máxima del estímulo EPSA (G_{Max}). Se usó un $T = 50$ ms, y 50 estímulos por serie ($N_{estimulos} = 50$).

Para los experimentos de la Sección 4.4, se calculó $P_{espigas}$ para cada serie de estimulación correspondiente a una determinada desviación standard del ruido sináptico (σ_i). Se usó un $T = 20\text{ms}$, y 50 estímulos por serie ($N_{estimulos} = 50$).

3.6.3. Cálculo de entropía

Para calcular la entropía de información de Shannon (Cover y Thomas, 1991) se usó la expresión:

$$H = - \sum_{\{series\}} P_{espigas} \ln P_{espigas} \quad (16)$$

En la Sección 4.3, la suma en la Ecuación 16 fue sobre las 11 series de estimulación realizadas.

3.6.4. Cálculo de ISID (Densidad de intervalos inter-espiga)

Primero, se confeccionó un histograma ISI (intervalos de tiempo inter-espiga). Luego de esto, se contó el número de eventos ISI del histograma en un intervalo de tolerancia ($\pm 20\text{ms}$) centrado en la frecuencia de estimulación y los dos siguientes armónicos. Para los experimentos realizados, esto corresponde a los intervalos $200\text{ms} \pm 20\text{ms}$, $400\text{ms} \pm 20\text{ms}$ y $600\text{ms} \pm 20\text{ms}$. Se define ISID1, ISID2 y ISID3 como la proporción de eventos respecto al número total de eventos ISI, que se encuentran, respectivamente en

estos tres intervalos.

$$ISID1 = \frac{N_{ISI}[180ms, 220ms]}{N_{ISITotal}} \quad (17)$$

$$ISID2 = \frac{N_{ISI}[380ms, 420ms]}{N_{ISITotal}} \quad (18)$$

$$ISID3 = \frac{N_{ISI}[580ms, 620ms]}{N_{ISITotal}} \quad (19)$$

Por último, se define ISID cómo:

$$ISID = ISI1 + ISI2 + ISI3 \quad (20)$$

Estas definiciones fueron adaptadas para este trabajo, a partir de los métodos de (Rudolph y Destexhe, 2001) para estudiar resonancia estocástica en modelos computacionales de neuronas.

3.6.5. Cálculo de SNR* (Razón señal ruido modificada)

La cantidad SNR* es una adaptación de la razón señal/ruido para estudiar modelos neuronales, que fue por primera vez propuesta en (Hô y Destexhe, 2000). Esta se define como:

$$SNR^* = \frac{P_{espigas}}{\sigma_V} \quad (21)$$

En dónde σ_V es la desviación standard del potencial de membrana de la neurona.

4. Resultados

En esta sección se mostrarán los resultados de la implementación y desarrollo de una serie de procedimientos experimentales para recrear y estudiar *in vitro* el estado de alta conductancia (Destexhe y col., 2003) observado *in vivo*. En las Secciones 4.1 y 4.2 se mostrarán los resultados obtenidos al recrear el estado de alta conductancia en neuronas piramidales hipocampales en rebanadas de cerebro de rata usando la técnica de *dynamic clamp*. Luego de esto, en la Sección 4.4 se mostrarán resultados preliminares del efecto del ruido sináptico en la respuesta neuronal a señales sinápticas coherentes y la existencia de valores de la intensidad del ruido para los que la respuesta neuronal fue óptima. Por último, en la Sección 4.5 se mostrará el funcionamiento de la técnica de *dynamic clamp* en la inserción de conductancias dependientes del potencial en neuronas piramidales de hipocampo, lo que permitió la restitución del régimen de disparo durante el bloqueo farmacológico de los canales de sodio.

4.1. La inserción de conductancias pasivas excitatorias e inhibitorias

reduce la resistencia de entrada R_{in} neuronal

Con el objetivo de reproducir la disminución en la resistencia de entrada en el estado de alta conductancia *in vitro* (rebanadas) usando la técnica *dynamic clamp*, inserté dos conductancias pasivas que simulan conductancias sinápticas promedio excitatorias (\hat{G}_e) e

inhibitorias (\hat{G}_i). En el modelo utilizado para simular el estado de alta conductancia, estas conductancias representan la actividad sináptica promedio de la red cortical en la cual se encuentra embebida la neurona (ver Sección 3.5.2). Éstas, sumadas a variables dinámicas de carácter estocástico ($g_i(t)$ y $g_e(t)$), capturan los valores promedio y la variabilidad, respectivamente de la conductancia neuronal debido al bombardeo sináptico por parte la red neuronal. Como se detalla en la Sección 3.5.2 de Materiales y Métodos, este modelo ha permitido reproducir tanto el cambio en la resistencia de entrada como en la distribución de amplitud y el espectro de potencia del potencial de membrana neuronal observado *in vivo*. Al comienzo de cada experimento se ajustaron las conductancias sinápticas pasivas excitatorias e inhibitorias promedio de modo que la resistencia de entrada de la neurona disminuyera entre un 25% y un 50% del valor inicial, lo que se condice con la evidencia empírica obtenida *in vivo* (Berthier y Woody, 1988; Bindman y col., 1988; Paré y col., 1998). Para medir la disminución en la resistencia de entrada de la neurona se compararon los efectos sobre el potencial de membrana de la aplicación de un protocolo de pulsos de corriente (Sección 3.4), en la condición Control (sin *dynamic clamp*) y en la condición en que se insertan conductancias pasivas promedio a través de la técnica de *dynamic clamp* (condición CP).

La Figura 3 muestra los resultados de un experimento representativo (n=15), en que se aplicó el protocolo de pulsos de corriente para calcular la resistencia de entrada de la

neurona. Como se observa en la Figura 3a el cambio de potencial debido a un mismo escalón de corriente es mayor en la condición Control que en la condición CP. Esto indica que en la condición CP disminuye la resistencia de entrada de la neurona con respecto a la condición Control, lo que es consistente con lo que se espera teóricamente de la Ecuación 2 (Sección 3.5.1). Esto se observa de manera precisa en la Figura 3b. Para potenciales hiperpolarizados la resistencia de entrada de la neurona tiene comportamiento aproximadamente ohmico, por lo cual la pendiente del mejor ajuste lineal a estas curvas corresponde a una buena estimación de la resistencia de entrada de la neurona en cada condición experimental. Al hacer los ajustes se obtiene una resistencia de entrada Control de $81 \pm 2M\Omega$ y en la condición CP, de $53 \pm 1,5M\Omega$, lo que corresponde a una disminución del 34%. Esta disminución está en el intervalo apropiado (entre un 25% y un 50%) para recrear el estado de alta conductancia (ver valores de conductancias insertadas en la leyenda de Figura 3a).

Usando la conductancia total que simula insertar el sistema experimental de *dynamic clamp* ($\hat{G}_e + \hat{G}_i$) y la resistencia de entrada estimada en la condición Control ($R_{Control}$) como parámetros en la Ecuación (2), fue posible estimar teóricamente la resistencia de entrada que debería tener la neurona en la condición CP. En este experimento en donde $\hat{G}_i = 7,1nS$ y $\hat{G}_e = 1,5nS$, se obtuvo $R_{CP} \simeq 48M\Omega$, que corresponde a una disminución de 40% con respecto a la condición Control. Existe aproximadamente un 10% de diferencia con respecto a R_{CP} estimada usando el método del ajuste lineal. Esta diferencia menor, es

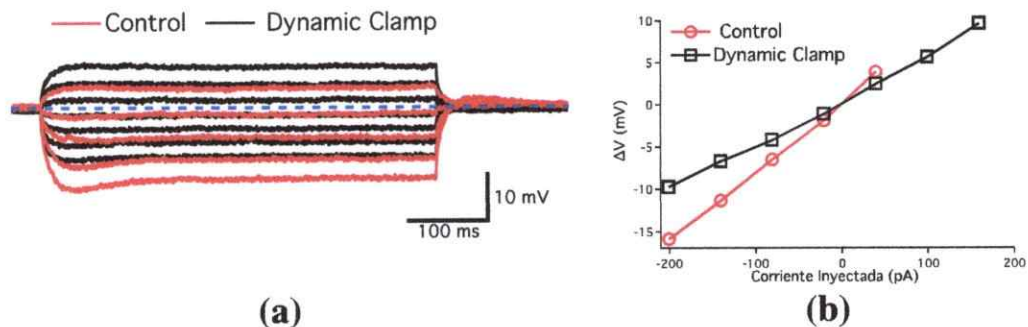


Figura 3: La inserción de conductancias pasivas (CP) a través de la técnica *dynamic clamp* disminuyen la resistencia de entrada neuronal. a) Registros de *Current Clamp* para la condición Control (trazo rojo) y de *dynamic clamp* para la condición CP (trazo negro; donde $\hat{G}_i = 7,1nS$ y $\hat{G}_e = 1,5nS$), en modalidad célula completa, obtenidos en respuesta a una serie de pulsos de corriente desde -200 pA hasta +40 pA (Control) y desde -200 pA hasta 160 pA (CP) con incrementos de 60 pA. La duración de cada pulso fue 500ms, con un intervalo de 1ms entre pulsos, en que sólo se inyectó la corriente de mantención. La línea azul punteada corresponde a -60 mV, potencial cercano al potencial de reposo. b) Gráfico del cambio de potencial de membrana (ΔV) con respecto al potencial en la mitad del pulso (medido 250 ms después del comienzo de la inyección del pulso) versus la corriente inyectada. La curva con trazo rojo y círculos corresponde a la condición Control. La curva con trazo negro y cuadrados corresponde a la condición CP.

un argumento para validar el buen funcionamiento del sistema experimental de *dynamic clamp* implementado.

4.2. Recreación *in vitro* de las principales características electrofisiológicas del estado de alta conductancia observado *in vivo*

Para emular en rebanadas el estado de alta conductancia observado *in vivo*, de forma artificial recreé las características comunes observadas en los pocos registros intracelulares que se han hecho en animales despiertos. Estos son: disminución de la resistencia de

entrada, un potencial de membrana despolarizado con un valor promedio aproximado de -60mV, marcadas fluctuaciones del potencial de membrana con desviación estándar (σ_V) en un rango de 2-6 mV y descargas tónicas e irregulares de entre 5-40 Hz (Berthier y Woody, 1988; Bindman y col., 1988; Paré y col., 1998; Steriade y col., 2001; Matsumura y col., 1988; Baranyi y col., 1993). Para recrear las características estadísticas y espectrales de las fluctuaciones del potencial de membrana en células únicas en rebanadas de cerebro de rata, utilicé el proceso estocástico de Uhlenbeck-Ornstein (Uhlenbeck y Ornstein, 1930). Éste permite describir matemáticamente la variación temporal de las conductancias excitatorias e inhibitorias que se observa *in vivo*, y fue por primera vez propuesto por Destexhe y col. en 2001 para simular el bombardeo sináptico observado *in vivo*. En el lenguaje de programación C++ desarrollé una rutina computacional para ser integrada al software RT-XI (Dorval y col., 2001) que controla el sistema de *dynamic clamp*, como se detalló en la Sección 3.5.2. A esta condición se le denominó estado de alta conductancia artificial (EACA).

Se ajustaron los parámetros en la condición EACA de forma tal que σ_V estuviera en el intervalo 2-6 mV. En la Figura 4 A) se observan registros representativos del potencial de membrana de una neurona con una resistencia de entrada de $81 \pm 2M\Omega$, en las tres condiciones experimentales: Control, CP y EACA. Se puede apreciar claramente en el histograma de la Figura 4 B), que muestra la distribución del potencial de membrana, que

tanto la condición Control como la condición CP tienen una distribución más estrecha en comparación con la condición EACA. Esto se condice con los valores de la desviación standard calculados: $\sigma_V = 0,3\text{mV}$ para las condiciones Control y CP, y $\sigma_V = 2,8\text{mV}$ para la condición EACA. La inserción de corrientes dinámicas fluctuantes (condición EACA) mediante la técnica de *dynamic clamp* hace aumentar las fluctuaciones del potencial de membrana, de modo que la distribución de amplitudes del potencial presenta una mayor desviación estándar en comparación con las condiciones Control y CP. Por otro lado, en las condiciones Control y CP las desviaciones estándar son similares.

Un aspecto importante que se aprecia en la Figura 4 B) es que los valores promedio del potencial de membrana disminuyen ligeramente desde la condición Control ($\langle V \rangle = -59,6\text{mV}$), a la condición CP ($\langle V \rangle = -60,5\text{mV}$) y a la condición EACA ($\langle V \rangle = -60\text{mV}$). Esto se explica porque al insertar conductancias artificiales con potenciales de inversión distintos al de reposo de la neurona, ésta cambia su potencial de reposo en la forma que predice la Ecuación 3 (Sección 3.5.1). Así, la razón entre las conductancias excitatorias e inhibitorias insertadas con la técnica *dynamic clamp* es clave para mantener el potencial de membrana en valores fisiológicamente razonables durante la simulación del estado de alta conductancia. Los valores de las conductancias sinápticas artificiales, como se mencionó en la sección Materiales y Métodos, pueden ser calculados desde registros electrofisiológicos (Destexhe y Bal, 2010) y en este trabajo fueron usados los disponibles en la

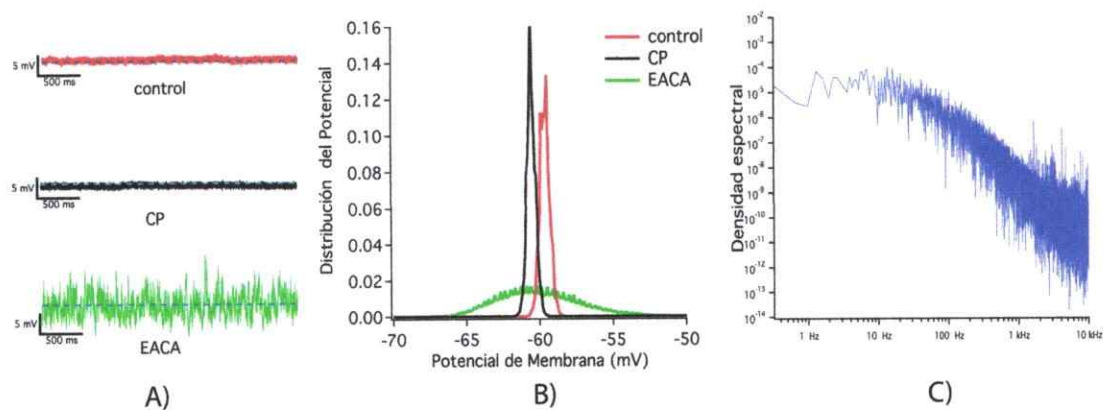


Figura 4: Estudio de las fluctuaciones del potencial de membrana en condición Control, CP y EACA. A) Dinámica temporal del potencial de membrana de una neurona piramidal sometida a tres condiciones experimentales: Control (trazo rojo), CP (trazo negro), EACA (trazo verde). Las líneas punteada de color azul en cada gráfico representan los -60mV . B) Histograma normalizado de distribución de amplitudes del potencial de membrana, realizado a partir de las tres curvas de B) manteniendo el mismo código de colores. C) Densidad del espectro de potencia del potencial de membrana en ausencia de potenciales de acción en la condición EACA.

bibliografía (Destexhe y col., 2001).

Al estudiar la densidad del espectro de potencia (que corresponde al espectro de potencia normalizado) del potencial de membrana en ausencia de potenciales de acción, podemos observar que éste tiene un amplio ancho de banda (Figura 4 C), que para valores de frecuencia altos decae como una ley de potencia ($1/f^k$). Todos esto es consistente con los registros obtenidos *in vivo*, modelos biofísicos y experimentos hechos usando la técnica de *dynamic clamp* (Destexhe y col., 2003).

Así, estos resultados y los de la sección anterior muestran que, insertando conductancias pasivas constantes y conductancias dinámicas cuyo valor varía de manera estocástica

en el tiempo, es posible recrear las tres características principales del estado de alta conductancia que se observa en diferentes neuronas corticales que son: la disminución de la resistencia de entrada, un potencial de membrana despolarizado con un valor promedio de aproximadamente de -60mV y el aumento de la desviación estándar del potencial de membrana en un rango de $2\text{-}6\text{ mV}$. Además, fue posible recrear la densidad del espectro de potencia del potencial de membrana en ausencia de espigas. Por lo tanto, en este seminario de título se ha implementado una técnica que emula el estado de alta conductancia de manera artificial en rebanadas de cerebro de rata.

4.3. En el estado de alta conductancia artificial (EACA) cambia la respuesta neuronal a estímulos

A continuación, desarrollé en el lenguaje de programación C++ una rutina computacional que integré al software RTXI con el propósito de estimular de forma periódica una neurona, insertando una conductancia que tuviera las características temporales de la suma de un conjunto de conductancias sinápticas activadas sincrónicamente. Para modelar el curso temporal de la conductancia de estimulación usé la función alfa descrita en la Sección 3.5.3 de Materiales y Métodos. Esta función ya se ha utilizado en la literatura en trabajos teóricos para describir los potenciales post-sinápticos (Rall, 1967). La motivación para usar estímulos periódicos fue tratar de emular de forma artificial en células indivi-

duales de una rebanada la activación periódica concertada de conjuntos de corrientes sinápticas, producto de la descarga periódica y sincrónica de poblaciones de neuronas. Todo esto con el objetivo de desarrollar protocolos experimentales para estudiar fenómenos como sincronía neuronal (Engel y col., 2001; Varela y col., 2001), resonancia estocástica (Gammaitoni y col., 1998; Wiesenfeld, 1995; Longtin, 1993) y coherencia estocástica (Casado, 1997) en neuronas en rebanadas.

En la Figura 5 A (superior) se observan las corrientes de estimulación periódica sináptica artificial (EPSA) inyectadas a una neurona piramidal de hipocampo en condición Control por el sistema *dynamic clamp*. Se realizaron 11 series de estimulación en donde se aumentó la conductancia máxima aumentó 13.5 nS por serie (series representadas en el eje en profundidad del gráfico). En la Figura 5 B (superior) se puede observar la dinámica del potencial de membrana en respuesta a estos estímulos. El detalle de los gráficos superiores de la Figura 5 (con líneas segmentadas) muestra con claridad la diferencia de paradigma experimental de estimulación con la técnica *dynamic clamp* en contraposición con el modo *current clamp*. Como se puede observar en la Figura 5 A (inferior), cuando no hay descargas de potencial de acción, la corriente inyectada por el sistema *dynamic clamp*, sigue un curso temporal caracterizado principalmente por la función alfa (ver Figura 2). Al aumentar la conductancia máxima y evocar descargas de potencial de acción, el curso temporal de la corriente inyectada además de estar caracterizado por la función alfa,

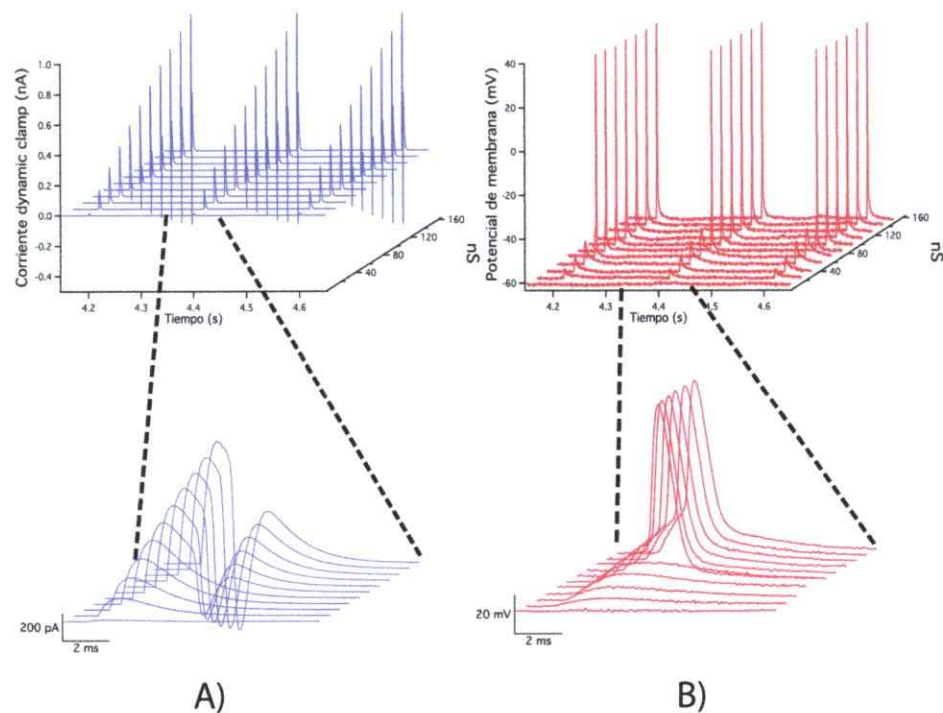


Figura 5: Estimulación periódica sináptica artificial (EPSA) mediante dynamic clamp. A) La figura superior muestra 500 ms de la corriente EPSA de 10 s de duración y periodo de 200 ms, inyectada a una neurona piramidal en condición Control por el *dynamic clamp*. Se realizaron 11 series de estimulación en que se aumentó la conductancia máxima desde 1.5 nS hasta 150 nS, lo que corresponde a un aumento de 13.5 nS por serie (eje en profundidad del gráfico). La Figura B) superior muestra la respuesta del potencial de membrana de la neurona para las 11 series de estimulación. Los trazos inferiores corresponden a un zoom a 12 ms de los gráficos A y B, como lo indican las líneas segmentadas.

muestra una dramática deflexión que sigue el curso temporal de los potenciales de acción que se observan en la Figura 5 B) (inferior, para magnitudes de conductancias máximas entre 75nS a 150nS). En este caso se hace evidente que la inyección de corriente por el sistema *dynamic clamp* sigue la expresión 13 (Sección 3.5.3). Esta ecuación muestra que

la corriente inyectada por el *dynamic clamp*, además de depender temporalmente de la función alfa, depende del potencial de membrana de la neurona. Por lo tanto, los resultados mostrados en la Figura 5 son representativos del paradigma de estimulación eléctrica de la técnica *dynamic clamp*, en dónde la corriente inyectada puede ser tanto función del tiempo como del potencial de membrana de la neurona.

A continuación estudié los efectos del bombardeo sináptico estocástico causado por una red neuronal activa sobre la integración de estímulos coherentes que simulan actividad neuronal sincronizada y periódica. Para esto apliqué el protocolo de estimulación mostrado en la Figura 5 en las condiciones Control, CP y EACA. La Figura 6 muestra los registros obtenidos en un experimento representativo en una neurona con resistencia de entrada de $81\text{M}\Omega$ (Control). Definiremos el umbral de estimulación como la magnitud de la conductancia máxima de EPSC sobre la cual son evocados potenciales de acción y bajo la cual no son evocados. Observamos en los gráficos *raster* 6 D (Control) y 6 F (CP), que en estas dos condiciones experimentales, el umbral está en un intervalo de conductancia muy estrecho ($\sim 15\text{nS}$) siendo casi un valor de conductancia determinada. Valores mayores a 55nS en la condición Control y 82nS en la condición CP evocan potenciales de acción para cada estímulo, sólo observándose variabilidad para valores muy cercanos a lo que podemos definir como el umbral de estimulación (*raster* 4 para el Control y 6 para CP), lo cual puede ser debido al ruido experimental o al ruido eléctrico intrínseco

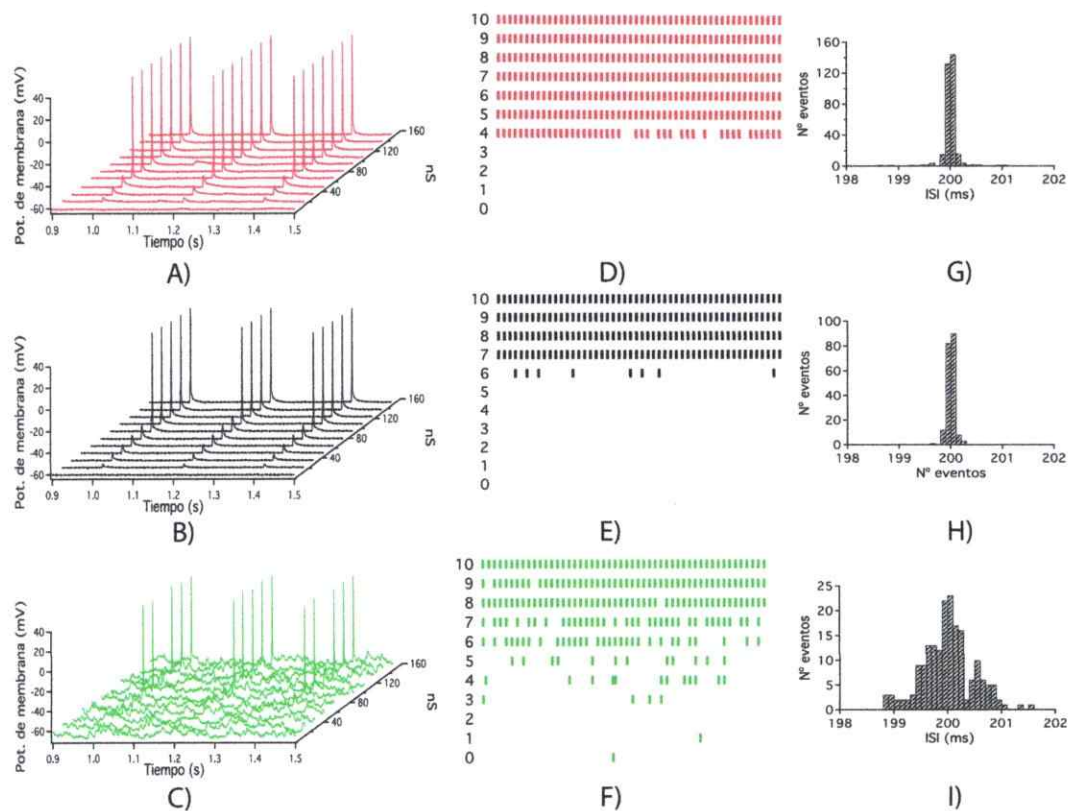


Figura 6: Estimulación EPSC para condición Control, CP y EACA. A, B y C muestran 600 ms del curso temporal del potencial de membrana de una neurona piramidal sometida a 11 series de EPSC, de 200 ms de período y 10 s de duración cada una, aumentando la conductancia máxima desde 1.5 nS hasta 150 nS (eje en profundidad del gráfico). A, B, C corresponden a la condición Control (rojo), CP (negro) y EACA (verde), respectivamente. D, E y F son gráficos *raster* para las 11 series de estimulación, numeradas en el eje vertical, en las condiciones Control (rojo), CP (negro) y EACA (verde) respectivamente. G, H y I son histogramas de ISI entre 198 y 202 ms para los eventos de potencial de acción ocurridos durante las 11 series de estimulación (ancho de bin es de 0.1ms), para la condición Control, CP y EACA respectivamente. Los histogramas tienen distintas escalas para ilustrar mejor los resultados.

de la neurona (Ej: fluctuaciones de corriente por debido a los canales de iones). Así, la respuesta neuronal en estas dos condiciones experimentales posee un umbral de estimula-

ción relativamente bien definido. A este tipo de comportamiento de respuesta a estímulos le llamaremos determinista, pues el que el estímulo evoque o no potenciales de acción, queda determinado principalmente por la intensidad del estímulo. Es importante recalcar que es denominado determinista, no por que el fenómeno sea totalmente determinista (ya que en todo fenómeno macroscópico incluyendo la dinámica eléctrica de una neurona, siempre existe ruido), si no que los efectos del ruido intrínseco o experimental no juegan un rol determinante en la respuesta a estímulos. Por lo tanto, en estas dos condiciones experimentales (Control y CP) la respuesta a la estimulación es determinista en el sentido anterior. Los histogramas de los ISI para la condición Control (Figura 6 G) y CP (Figura 6 H), tienen un máximo en 200 ms y un ancho menor a 2 ms, en el cual se encuentran representados el 96% y el 94% de los eventos, respectivamente. Esto muestra que, además de existir un umbral claro por sobre el cual existe una alta probabilidad de observar descargas en respuesta al estímulo y bajo el cual prácticamente no se observan descargas, la mayoría de los potenciales de acción ocurridos sobre el umbral fueron cada 200 ms, que es el período de estimulación del protocolo, con menos de 2 ms de variabilidad entre ellos. Por lo tanto, más del 95% de los potenciales de acción ocurridos fueron evocados por el estímulo con una variabilidad en el retardo de menos de 2ms, lo que quiere decir que cuando la conductancia de estimulación está sobre el umbral casi para cada estimulación hay una descarga en estas dos condiciones experimentales. Algo interesante de mencionar



es que se observa un aumento del umbral de estimulación en la condición CP a 82 nS con respecto a la condición Control de 55nS, esto debido a la inserción de conductancias pasivas. Se ha mostrado tanto en estudios teóricos como experimentales que el cambio en las conductancias pasivas puede modificar incluso cualitativamente las propiedades intrínsecas de una neurona (Prescott y col., 2008; Fernandez y White, 2010).

En contraste con este tipo de respuesta que hemos llamado determinista, en la Figura 6 F se observa que la respuesta neuronal en la condición EACA no posee un umbral definido en términos de la magnitud de la estimulación, existiendo al menos un potencial de acción para casi todas las magnitudes de conductancia de estimulación. Por otro lado a diferencia de Control y CP, sólo el 74% de los eventos de potenciales de acción se encuentran entre 199ms y 201ms, lo que indica que al menos un 26% de los eventos ocurrieron al menos 2ms retardados respecto del comienzo del estímulo, existiendo mayor variabilidad en la respuesta en esta condición experimental con respecto a las otras.

Para entender más claramente la respuesta a estímulos coherentes de una neurona en condiciones experimentales que emulan la red neuronal activa, y entender cuál es el efecto de las fluctuaciones en la conductancia y la disminución de la resistencia de entrada por separado, calculé las curvas de probabilidad de disparo para un intervalo de tiempo de 50 ms después del comienzo de cada estímulo. En la Figura 7 A se observa en la curva Control (rojo) que existe una magnitud de estimulación umbral bien definida (aproximadamente

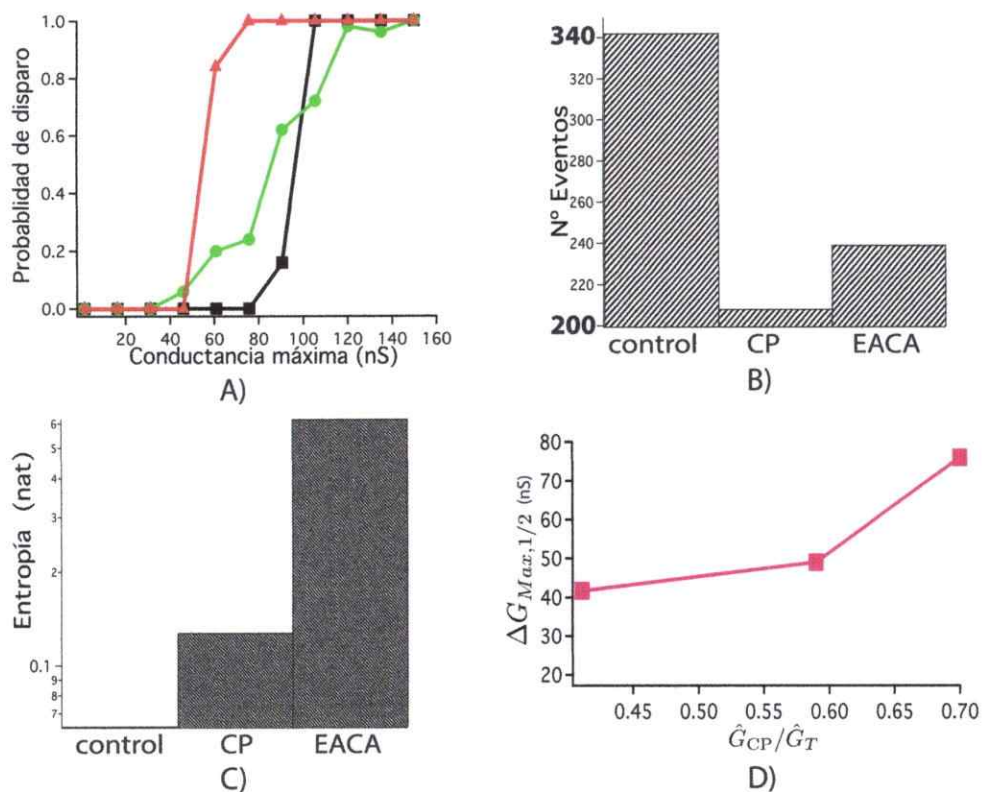


Figura 7: Cambios en la curva de probabilidad de disparo. A) Gráfico de probabilidad de disparo versus conductancia máxima de EPSA. La curva roja corresponde al Control, la negra a CP y la verde a EACA. Estas curvas fueron calculadas dividiendo el número total de espigas en un serie por el número total de estimaciones en esa serie (para 10s de estimulación a 5Hz, son 50 estimaciones). B) Numero total de espigas evocadas en las 11 series para cada condición experimental. C) Entropía de Shannon calculada a partir de la curva de probabilidad de disparo (A) para cada condición experimental. D) Gráfico del corrimiento de la conductancia de estimulación media de la condición CP $G_{Max,1/2}^{CP}$ respecto a la condición Control $G_{Max,1/2}^{Control}$, llamado $\Delta G_{Max,1/2}^{CP}$, versus la proporción de conductancia insertada con respecto a la conductancia total \hat{G}_{CP}/\hat{G}_T para tres neuronas diferentes.

55 nS) sobre la cual la probabilidad de disparo es casi para todos los casos uno y bajo la cual la probabilidad de disparo es nula, teniendo el comportamiento esencialmente deter-

minista antes mencionado con una forma que se aproxima a una función de Heaviside. La curva CP (negro) también posee este comportamiento determinista, pero la magnitud de estimulación umbral aumenta a 82 nS aproximadamente, esto se observa como el corrimiento de la curva hacia la derecha debido a la disminución de la resistencia de entrada producida por la inserción de conductancias pasivas. A diferencia de las otras dos condiciones experimentales, la curva EACA (verde) además de un corrimiento hacia la derecha con respecto a la curva Control, disminuye su pendiente, de modo que la probabilidad de disparo para un rango de conductancias de entre 30 nS y 120 nS tiene valores entre 0 y 1. Por lo tanto, ahora la curva tiene un carácter claramente probabilístico, a diferencia de las curvas Control y CP. Esto quiere decir que para intensidades de estimulación entre 30 nS y 120 nS se puede o no evocar potenciales de acción con cierta probabilidad asociada.

Para evaluar la diferencia en la capacidad de representar información en estas tres condiciones experimentales calculamos la entropía de la información de Shannon para las tres curvas de probabilidad. En el gráfico logarítmico de la Figura 7 C) se observa que la condición EACA posee entropía al menos 5 veces mayor que la condición CP y mas de 10 veces mayor que la condición Control. Esto muestra que la condición experimental EACA tiene mayor incertidumbre con respecto a la respuesta al protocolo de estimulación que las otras condiciones experimentales, pero también muestra que en la condición EACA el sistema tiene mayor cantidad de estados posibles representados en el sentido de la mecánica

estadística. Las posibles consecuencias operacionales de esto se discutirán en la sección Discusión.

La Figura 7 B muestra el número total de potenciales de acción, esto es, la suma de las espigas para las 11 series de estimulación, en cada condición experimental. La condición Control es la que presenta más potenciales de acción (342) durante la estimulación, seguido por la condición EACA (239) y CP (208). Así, en la condición Control la neurona es más excitable con respecto a la condición EACA y a la condición CP. Lo que sugiere la Figura 7 D es que este resultado es dependiente de la proporción de conductancia pasiva insertada con respecto a la conductancia total de la neurona \hat{G}_{CP}/\hat{G}_T , dónde:

$$\hat{G}_{CP}/\hat{G}_T = \frac{\hat{G}_e + \hat{G}_i}{\hat{G}_e + \hat{G}_i + R_{Control}^{-1}} \quad (22)$$

Podemos notar que el número total de espigas evocadas es proporcional al área bajo la curva de la Figura 7 A. Así, si definimos la conductancia de estimulación media $G_{Max,1/2}$ como la conductancia máxima del estímulo para la cual la probabilidad de evocar una espiga es 1/2, entonces curvas con mayor $G_{Max,1/2}$ van a estar más hacia la derecha en la Figura en 7 A, van a tener menor área bajo la curva, y en consecuencia menor cantidad de espigas evocadas. Tomando en cuenta esto es directo notar que a mayor $G_{Max,1/2}$, menor el número de espigas evocadas. La Figura 7 B muestra el corrimiento de la estimulación media ($\Delta G_{Max,1/2}^{CP} = G_{Max,1/2}^{CP} - G_{Max,1/2}^{Control}$) versus \hat{G}_{CP}/\hat{G}_T para tres neuronas diferentes,

así se observa que a mayor \hat{G}_{CP}/\hat{G}_T mayor es el corrimiento ($\Delta G_{Max,1/2}^{CP}$) y por lo tanto más se corre la curva CP hacia la derecha, disminuyendo más la excitabilidad en la condición CP con respecto a la condición Control, para \hat{G}_{CP}/\hat{G}_T mayores. Interesantemente, estos resultados preliminares sugieren que la excitabilidad neuronal puede ser modulada por la relación entre la conductancia promedio que posee la neurona debido a la red activa con respecto a su conductancia intrínseca. Estos resultados son aplicables a neuronas en estado de alta conductancia, ya que estudios teóricos computacionales muestran que la disminución de la ganancia (pendiente de la curve 7 A) es producido por el aumento de las fluctuaciones de conductancia, y el corrimiento de $G_{Max,1/2}$ es producido por el aumento en la conductancia promedio independientemente (Hô y Destexhe, 2000). Así, aun cuando la excitabilidad también dependa de la intensidad de las fluctuaciones, el aumento de la conductancia promedio en la condición EACA produce el corrimiento proporcional de la estimulación media ($\Delta G_{Max,1/2}^{EACA}$). Por lo tanto, a mayor razón entre la conductancia del estímulo y la conductancia total (\hat{G}_{EPSP}/\hat{G}_T) mayor es el corrimiento de la estimulación media ($\Delta G_{Max,1/2}^{EACA}$), respecto del control.

Con esto, y a la luz de la literatura, estos experimentos sugieren que la excitabilidad *in vivo* depende en forma compleja de las fluctuaciones de conductancia debido a la des-correlación de los inputs sinápticos provenientes de la red activa y de la relación entre la conductancia promedio debido a la red activa con respecto a la conductancia intrínseca de

la neurona.

4.4. Buscando resonancia estocástica en estado de alta conductancia artificial (EACA)

Como se mencionó en la introducción, el ruido y la no linealidad de un sistema comúnmente son condiciones necesarias para observar un fenómeno bien conocido en física: resonancia estocástica (Gammaitoni y col., 1998). Estas condiciones se encuentran en el sistema nervioso en general (Rolls y Deco, 2010; Laing y Lord, 2009; Izhikevich, 2010; Ermentrout y Terman, 2010). Así, situándome en el contexto de la resonancia estocástica, en esta parte del trabajo estudié un posible efecto de la intensidad del ruido sináptico artificial sobre la respuesta neuronal a un estímulo periódico sináptico artificial (EPSA). Todo esto, con el propósito de desarrollar las herramientas experimentales para entender cómo una neurona integra la actividad periódica concertada de conjuntos de corrientes sinápticas producidas por la actividad sincrónica de poblaciones de neuronas, al mismo tiempo que integra corrientes sinápticas totalmente descorrelacionadas, producidas por la actividad estocástica de otras poblaciones neuronales. En este contexto, desarrollé procedimientos experimentales para estudiar si existen valores de intensidad del ruido sináptico para los cuales la respuesta neuronal a las señales coherentes sea óptima, y así poder observar lo que fue descrito teóricamente por primera vez por Longtin como resonancia estocástica

neuronal.

Para realizar este estudio desarrollé en el lenguaje de programación C++ una rutina computacional que integré al software RTXI, que me permitió variar de forma automática el valor de σ_e y σ_i (siendo importante recordar, como se indica en la Ecuación 9 de la Sección 3.5.2, que para todos los experimentos desarrollados en este trabajo las desviaciones estándar están relacionadas por una constante de proporcionalidad). El estímulo insertando fue un estímulo del tipo EPSA de conductancia constante, sub-umbral en ausencia de ruido sináptico y con un $\tau = 1$ ms. En la Figura 8 se observan cuatro registros representativos de un experimento en que se varió linealmente σ_i desde 0 a 19.8 nS en 11 series (lo que corresponde a un aumento de 1.8 nS por serie). Para $\sigma_i = 0$, esto es, en ausencia de ruido sináptico, se puede observar que la respuesta neuronal a la señal EPSA es sub-umbral, no evocándose potenciales de acción. A medida que aumenta σ_i se observa mayor cantidad de espigas que están en fase o apareadas temporalmente con el estímulo EPSA. En concomitancia con esto, a medida que σ_i aumenta, también se observan espigas que no están apareadas temporalmente con el estímulo EPSA. Para aislar el efecto del ruido sináptico en la aparición aleatoria de espigas con el mismo período del estímulo EPSA, se realizó el mismo experimento en ausencia de estimulación EPSA y sólo insertando ruido sináptico artificial (Control negativo).

En la Figura 9 A-F se observan los histogramas ISI para tres series cualitativamente re-

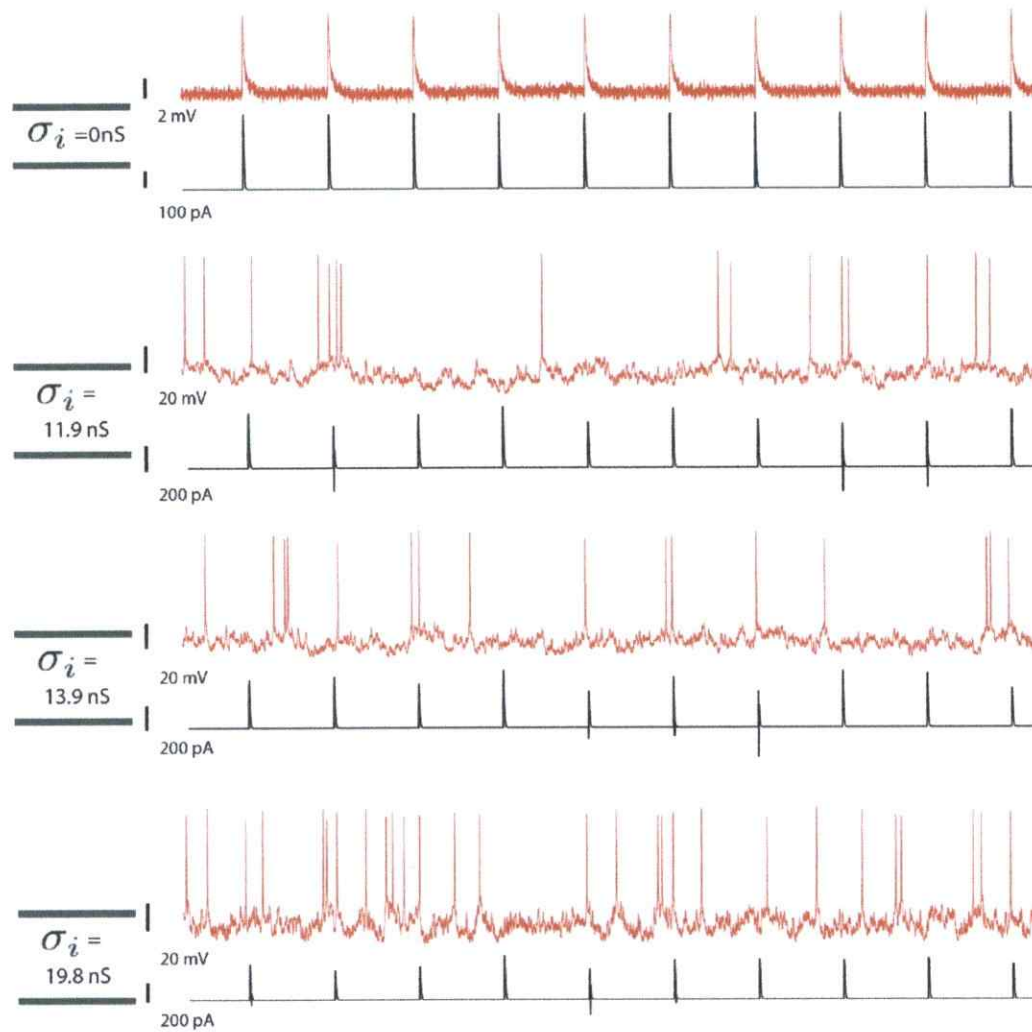


Figura 8: Respuesta a estimulación EPSA para distintas intensidades de ruido sináptico. Cuatro registros de un experimento representativo en dónde se estimuló una neurona piramidal de hipocampo insertando un estímulo EPSA y ruido sináptico artificial. Se varió linealmente la intensidad de σ_i de 0 a 19.8 nS en 11 series de 10s de duración. La frecuencia de la estimulación EPSA fue de 5Hz, con un $\tau = 1ms$ y la magnitud de la conductancia máxima del estímulo EPSA fue 60nS. Los registros mostrados son segmentos de 2s para cuatro series de estimulación, con valores de σ_i de 0nS, 11.9nS, 13.9nS y 19.8nS. Es importante hacer notar que el primer registro mostrado (0nS) esta en una escala distinta para una mejor visualización de los datos.

representativas de valores de σ_i bajo, medio y alto, para la condición con EPSA (A-C barras amarillas) y para la condición sin EPSA (D-F barras moradas). Para valores bajos de σ_i se observa que existe ligeramente mayor proporción de eventos en los tiempos característicos de estimulación y sus armónicos (200ms, 400ms, 600ms) en la condición con EPSA que en la condición sin EPSA (Figura 9 A y D respectivamente). Esta situación parece repetirse para valores medios de σ_i , como se puede ver en las Figuras 9 B y E. Esto ya no se observa para valores altos de σ_i , en donde los histogramas ISI asemejan una ley de potencia (Figuras 9 C y F). Para formalizar cuantitativamente la impresión cualitativa que nos entregan los histogramas ISI, estudiaremos la densidad ISI (ISID), definida en la Sección 3.6.4, como la proporción de los eventos en un histograma ISI que se encuentran en un intervalo dado (± 20 ms), centrado en la frecuencia de estimulación y los dos siguientes armónicos.

El cálculo del ISID para la condición con EPSA (línea amarilla continua) y sin EPSA (línea morada continua) se muestra en la Figura 9 G, donde se grafica el valor de ISID con respecto a la intensidad del ruido σ_i correspondiente a cada serie. Para valores de σ_i de 10 nS, ISID es notoriamente mayor en la condición con EPSA que en la condición sin EPSA. Esto se invierte para valores de σ_i mayores a 14nS en donde ISID en la condición sin EPSA es en general mayor que con EPSA. Estos resultados muestran que para valores de σ_i entre 10nS y 14nS, 13% a 23% de los ISI son del orden del período de estimulación

o sus armónicos, mientras que en ausencia de estimulación EPSA, esto ocurre sólo para el 10-13 % de los ISI. Además, estos resultados muestran que para valores de σ_i mayores a 14nS, menos del 10 % de los ISI están en el orden del periodo de estimulación o sus armónicos, para las dos condiciones experimentales. Todos estos resultados sugieren que en el intervalo de intensidad de ruido σ_i de 10 nS, la actividad neuronal es más susceptible a estar apareada temporalmente con el estímulo EPSA que cuando no hay estimulación EPSA, y además, que esta coincidencia temporal disminuye al aumentar σ_i .

En virtud del análisis anterior quise corroborar el grado de coincidencia temporal que existe entre la estimulación EPSA y las espigas que se encuentran en el ISID de la Figura 9 G . Para estudiar esto, calculé una variación de la relación señal/ruido (SNR*) utilizada en estudios computacionales sobre resonancia estocástica neuronal (Rudolph y Destexhe, 2001) y explicada con detalle en la Sección 3.6.5. SNR* estima la probabilidad de ocurrencia de una espiga en un intervalo determinado de tiempo después del comienzo del estímulo (20ms para este análisis) normalizado por la desviación estándar del potencial de membrana. Como control negativo calculé SNR* en ausencia de EPSA. La Figura 9 H muestra SNR* en función de la intensidad del ruido sináptico σ_i . Se observa claramente que SNR* para la condición con EPSA siempre es mayor que su control negativo (sin EPSA). Estos resultados muestran que para un mismo nivel de ruido sináptico σ_i y ruido en el potencial de membrana σ_v , en general siempre existe mayor probabilidad de que

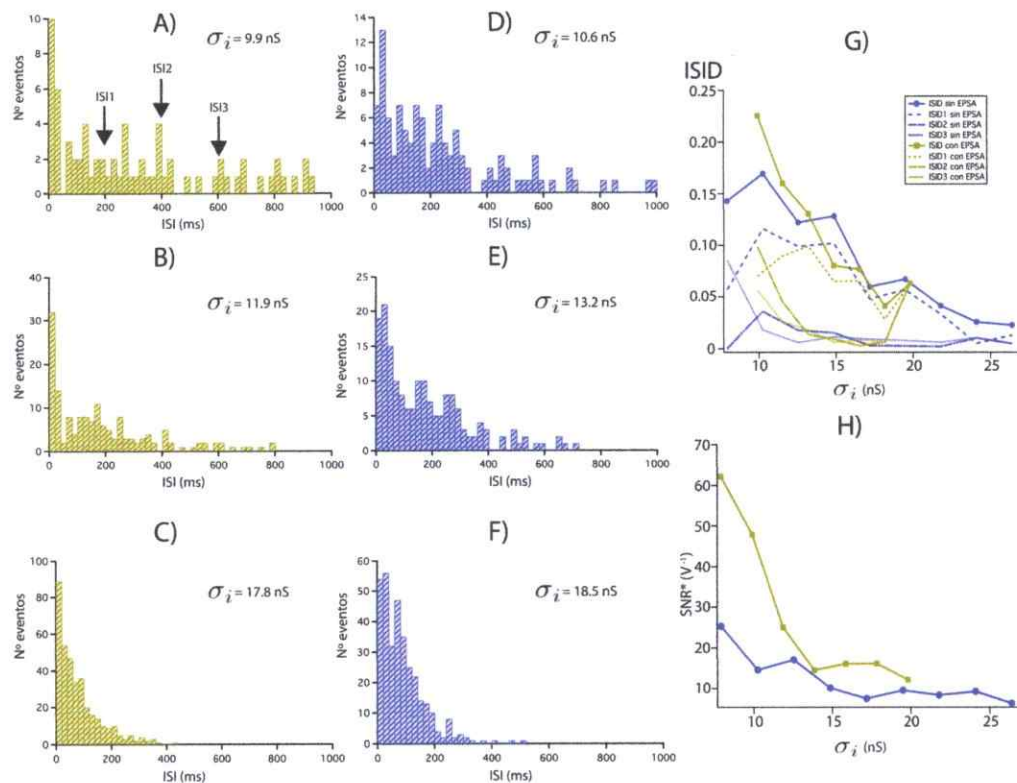


Figura 9: Efecto de σ_i en la respuesta neuronal a un estímulo EPSC. Experimento representativo. A-C) Se muestran en color amarillo tres histogramas de ISI de las 11 series de estimulación EPSC, correspondientes a tres valores de σ_i representativos de ruido bajo (9.9nS), medio (11.9nS) y alto (17.8nS). D-F) En color morado los histogramas ISI de 11 series en ausencia de estimulación EPSC, correspondientes a tres valores de σ_i representativos de ruido bajo (10.6nS), medio (13.2nS) y alto (18.5nS). En todos los histogramas el ancho de cada intervalo fue 20ms. Es importante hacer notar que la escala del eje ordenado es distinta en cada histograma para visualizar mejor la forma cualitativa de estos. El Panel G) muestra en líneas continuas el valor de ISID, y en líneas segmentadas los valores de ISID1, ISID2 y ISID3 versus la intensidad del ruido sináptico σ_i insertado. Esto para la condición con EPSC (amarillo) y sin EPSC (morado). H) Valores de SNR* en función del ruido sináptico artificial σ_i , para la condición con EPSC (amarillo) y sin EPSC (morado).

haya al menos una espiga después de 20ms de estimulación (condición con EPSC) que la probabilidad de encontrar una espiga sólo debido al ruido sináptico (sin EPSC). Intere-

santemente, entre 8nS y 14nS se encuentra la mayor diferencia entre ambas condiciones, y en la condición con EPSA SNR* puede llegar hasta casi triplicar a la condición sin EP- SA. Este intervalo coincide casi completamente con el intervalo en dónde ISID es mayor con EPSA que sin EPSA. Esto sugiere que las espigas contadas para el ISID deben ser en su mayoría evocadas hasta 20ms después del estímulo. Por otro lado, los valores de SNR* entre 14nS y 20nS tienen comparativamente poca diferencia en las dos condicio- nes experimentales, mostrando con esto que cuando la intensidad del ruido sináptico σ_i aumenta más allá de cierto valor, la respuesta neuronal al EPSA es similar que sin EP- SA. Esto se condice con los resultados del gráfico 9 G para valores mayores que 14nS, y los Histogramas ISI de ruido alto en las dos condiciones experimentales (Figura 9 C y F).

Todos estos resultados sugieren que *in vivo* existe un intervalo de intensidad de ruido sináptico en dónde es más probable que las descargas por parte de la neurona tengan la misma frecuencia (o armónicos) de la señal sináptica coherente, en comparación a si sólo recibiera el bombardeo sináptico descorrelacionado. Y además, que para intensidades ma- yores del bombardeo sináptico, la respuesta neuronal al estímulo coherente será indistin- guible de la situación en que sólo existe el bombardeo sináptico.

4.5. Restitución del régimen de disparo después del bloqueo farmacológico de los canales de sodio usando la técnica de *dynamic clamp*

Con el objetivo de probar el funcionamiento de conductancias dependientes de potencial en el sistema experimental y con propósitos exploratorios¹, desarrollé en el lenguaje de programación C++ una rutina computacional que integré al software RTXI para insertar conductancias dependientes de potencial de sodio y potasio tipo Hodgkin y Huxley modificadas (Richardson, 2003).

En la Figura 10 se muestran los resultados de un experimento representativo en dónde se prueba la inserción de conductancias activas en una neurona piramidal de hipocampo. En este experimento se sometía una neurona a un protocolo de escalones de corriente en tres condiciones experimentales: Control, con el bloqueador de canales de sodio tetrodotoxina (TTX) y con TTX+*dynamic clamp*. En la condición TTX+*dynamic clamp* se insertaron conductancias dependientes de potencial tipo Hodgkin y Huxley modificadas (Richardson, 2003). En la parte superior de la Figura 10 se puede observar que, como es de esperar, al bloquear farmacológicamente los canales de sodio, la neurona pierde la capacidad de descargar potenciales de acción frente al estímulo depolarizante. Pero, como

¹Con esto me refiero a investigar los límites y prestaciones del software RTXI y desarrollar mi capacidad de implementar modelos teóricos en éste.

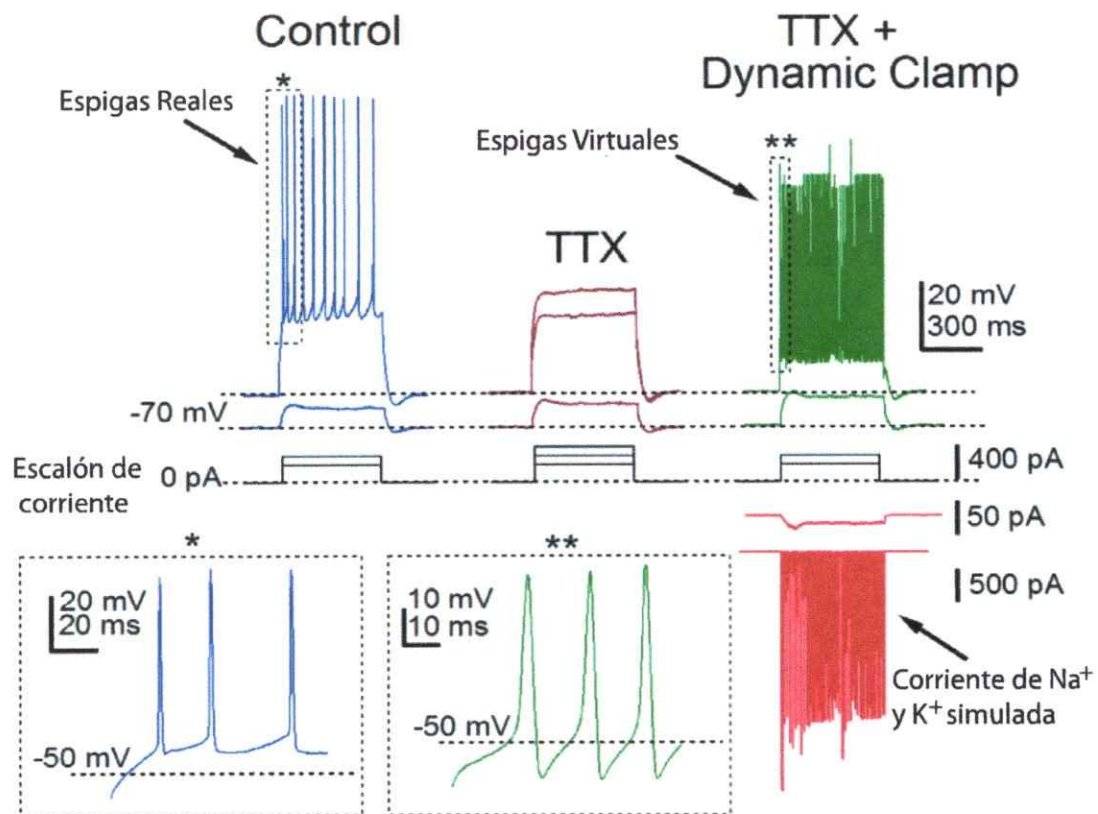


Figura 10: Recuperación del régimen de disparo después del bloqueo farmacológico de los canales de sodio, usando la técnica dynamic clamp. En la parte superior de la figura se muestra los registros del potencial de membrana de neuronas piramidales de hipocampo, al ser sometidas a un protocolo de escalones de corrientes despolarizante para tres condiciones experimentales: Control (azul), con TTX (vino tinto) y con TTX e insertando vía *dynamic clamp* conductancias de sodio y de potasio (verde); condición TTX+*dynamic clamp*. Los escalones de corriente que fueron inyectados se muestran en trazos negros debajo de los registros. En el recuadro inferior izquierdo, se muestra un detalle de las espigas en la condición Control. En el recuadro inferior del medio, se muestra un detalle de las espigas en la condición TTX+*dynamic clamp*. En la parte inferior derecha se muestra la corriente total inyectada por el sistema *dynamic clamp*.

se ve en la parte superior derecha de la Figura 10 en trazo verde, esta capacidad es restituida en la condición TTX+*dynamic clamp*. Esto muestra que el sistema experimental es

capaz de insertar exitosamente conductancias dependientes de potencial que restauren la capacidad de descargar espigas en la neurona.

En la parte inferior izquierda de la Figura 10 se muestra un detalle de las espigas evocadas en la condición Control (azul) y en la condición TTX+*dynamic clamp* (trazo verde). Se puede observar que el curso temporal de las espigas de la condición TTX+*dynamic clamp* es bastante diferente a la condición Control, siendo estas últimas más cortas, con un máximo mayor y con más tiempo entre espiga (por sólo nombrar algunas de las características distintas). Esto sugiere que el modelo usado (Richardson, 2003) reproduce de manera inexacta la dinámica de las corrientes de sodio y potasio de las neuronas piramidales de hipocampo. En la parte inferior derecha de la Figura 10, se muestra en rojo la corriente total inyectada por el sistema de *dynamic clamp*, para dos escalones de corrientes que se muestran en la parte superior a esta Figura. Como se observa, la corriente inyectada por el *dynamic clamp* sigue el curso temporal de las espigas evocadas (gráfico superior derecha en trazo verde) lo que ilustra el nuevo paradigma que involucra este tipo de estimulación dinámica.

Así, estos resultados muestran que fue posible insertar exitosamente conductancias dependientes del potencial en neuronas, usando la técnica *dynamic clamp* implementada, y usando esta técnica, restituir el régimen de disparo de potenciales de acción de membrana, después del bloqueo farmacológico de los canales de sodio con TTX. Mediante un ajuste

adecuado de los parámetros de las corrientes insertadas, esperamos obtener resultados que reproduzcan mas fielmente estos experimentos.

5. Discusión

5.1. La inserción de conductancias pasivas excitatorias e inhibitorias reduce la resistencia de entrada R_{in} neuronal

Insertando conductancias mediante la técnica *dynamic clamp*, en este trabajo se ha logrado disminuir la resistencia de neuronas piramidales de hipocampo hasta valores observados en registros *in vivo* (entre un 25% a un 50% de la resistencia medida *in vitro*), recreando así *in vitro* una característica esencial del estado de alta conductancia. Es importante tener claro que debido a las limitaciones de la técnica de *dynamic clamp*, el aumento de la conductancia es local y ocurre en las vecindades de la pipeta de registro, en este caso el soma. Por lo tanto, no es posible recrear los cambios espaciales en las propiedades eléctricas de la neurona, que se observan en el estado de alta conductancia (disminución de la constante de espacio, disminución local de la constante de tiempo, cambio en la velocidad de propagación del potencial de acción, etc), que como se discutió en la Introducción, pueden producir un cambio cualitativo en las propiedades de integración de señales por parte de la neurona. Recientes estudios muestran que tanto las dendritas (Stuart y col., 2007) como el axón (Kole y col., 2008) pueden tener dinámicas eléctricas independientes del soma en una misma neurona, por lo que éstos podrían realizar distintas e independientes computaciones con la información de las señales sinápticas. Esto es importante de

tener en cuenta cuando se obtienen resultados con el *dynamic clamp* acerca del efecto del aumento de conductancia en las propiedades de integración y procesamiento de señales sinápticas, ya que esta técnica tiene el sesgo de cambiar la conductancia localmente y no en la neurona como un sistema extendido.

Al usar dos métodos independientes de estimación del cambio de la resistencia de la neurona, se obtuvo un valor similar, con una diferencia de un 10% entre los dos métodos. Uno de los métodos ocupa la expresión analítica de la Ecuación (2) para estimar la disminución de la resistencia en la condición CP, y es totalmente independiente de los registros en la condición CP, y el otro método es el ajuste lineal de la curva del cambio de voltaje versus la intensidad del pulso (ver Sección 3.4). Esto corrobora el buen funcionamiento del método, ya que la conductancia que el sistema de *dynamic clamp* dice insertar, es efectivamente la que se obtiene en el análisis de los registros.

5.2. Recreación *in vitro* de las principales características electrofisiológicas del estado de alta conductancia observado *in vivo*

Se han podido recrear las principales características del estado de alta conductancia, que son: la disminución de la resistencia de entrada entre un 25%-50%, un potencial de membrana despolarizado con un valor promedio de aproximado de -60mV y aumento de la desviación estándar del potencial de membrana en un rango de $\sigma_V=2-6$ mV. Además, se

recreó cualitativamente bien la densidad del espectro de potencia del potencial de membrana en ausencia de espigas, que ha sido observada en registros *in vivo*, simulaciones biofísicamente detalladas y experimentos previos usando *dynamic clamp* (Destexhe y col., 2003).

La razón entre las conductancias sinápticas excitatorias e inhibitorias artificiales insertadas con la técnica *dynamic clamp* y la conductancia intrínseca de la neurona, define el valor del potencial de reposo según la Ecuación 3 (Sección 3.5.1). Es sabido que en la neocorteza (*in vivo*), se mantiene un balance entre las sinapsis excitatorias e inhibitorias, y este balance puede variar dependiendo del estado conductual del animal (Haider y McCormick, 2009). Por lo tanto, el potencial de reposo de la neurona *in vivo* depende de la razón entre las sinapsis excitatorias e inhibitorias activas que ésta recibe y su promedio varía en el tiempo según el comportamiento del animal. Esto no se puede reproducir con el modelo fenomenológico de estado de alta conductancia implementado con el *dynamic clamp* debido a su construcción, en dónde el promedio de las conductancias excitatoria e inhibitoria son parámetros fijos.

Es importante notar que el ruido de corriente producido por la inserción conductancias estocásticas con el sistema de *dynamic clamp* y el ruido de corriente inyectado con la técnica *current clamp* son de naturaleza muy distinta, y tienen efectos cualitativamente diferentes en la dinámica de una neurona. La corriente inyectada por el *dynamic clamp*

en EACA depende de la conductancia, la cual es una variable estocástica en el tiempo, y del potencial de membrana, que es una variable dinámica de la neurona. Por lo tanto, el ruido de conductancias es un ruido de carácter multiplicativo, ya que la corriente inyectada por el *dynamic clamp* es el producto de una variable estocástica (la conductancia), y una variable dinámica del sistema (el potencial de membrana). A diferencia de esto, el ruido de corriente inyectado con la técnica *current clamp* no depende del potencial de membrana ni de ninguna variable dinámica de la neurona, por lo tanto este tipo de ruido es *ciego* al estado eléctrico de la neurona, al contrario del ruido de conductancia. A este tipo de ruido se le llama ruido aditivo, ya que es independiente de las variables dinámicas del sistema. Debido al carácter aditivo del ruido de corriente inyectada en *current clamp*, este tipo de ruido no produce cambios en las propiedades intrínsecas de la neurona, ya que las propiedades intrínsecas no dependen de la corriente inyectada. Al contrario de esto, el ruido de conductancia produce que fluctúen de manera estocástica parámetros biofísicos y electrofisiológicos que dependen de la conductancia de la neurona, como la constante de tiempo de la membrana, el umbral de disparo o la frecuencia de preferencia (para neuronas resonantes), y debido a que el ruido es de conductancia, también fluctúa de manera estocástica el potencial de reposo de la neurona. Esto tiene como consecuencia que, a diferencia del ruido eléctrico inyectado con la técnica *current clamp*, el ruido de conductancia produce variaciones estocásticas en las propiedades electrofisiológicas en el

tiempo, y con esto también varían de manera estocástica las propiedades de integración y procesamiento de señales sinápticas, ya que estas propiedades son muy dependientes de la conductancia total de la neurona (Prescott y col., 2008; Prescott y Sejnowski, 2008).

5.3. En el estado de alta conductancia artificial (EACA) cambia cualitativamente la respuesta neuronal a estímulos

Los experimentos de la Sección 4.3 mostrados en la Figura 6 y 7 A) sugieren que las neuronas *in vivo*, en donde la red neuronal esta activa, tienen un comportamiento cualitativamente distinto a cuando están *in vitro*, teniendo una respuesta fundamentalmente probabilística a los estímulos a diferencia de la respuesta esencialmente determinista observada *in vitro*. Interesantemente, estos resultados habían sido predichos por estudios computacionales (Hô y Destexhe, 2000). Los resultados en las Figuras 6 y 7, y también la bibliografía mencionada, muestran que las conductancias pasivas y el ruido de conductancias tienen efectos independientes en la curva de probabilidad de disparo. El aumento de la conductancia al insertar conductancias pasivas produce que, como lo predice la ley de Ohm, se necesite más corriente con respecto a la condición control para producir la misma diferencia de potencial en una neurona. Por lo tanto, al aumentar la conductancia pasiva de una neurona, se necesita una mayor intensidad de corriente de estimulación para evocar potenciales de acción. Esta disminución de la excitabilidad se manifiesta con corrimiento de

la curva de probabilidad de disparo hacia la derecha, sin afectar la ganancia. Por otro lado, el ruido de conductancia, debido a su característica estocástica, produce que una neurona responda de manera estocástica a los estímulos, existiendo una probabilidad de disparo asociada a un estímulo de una intensidad determinada, lo que produce una disminución de la pendiente en la curva de probabilidad de disparo, pero no cambia la conductancia de estimulación media de la curva ($\Delta G_{Max,1/2} \sim 0$). Así, las conductancias pasivas tienen el efecto de mover la curva de probabilidad hacia intensidades de estímulo mayores, y el ruido de conductancia tiene el efecto de disminuir la ganancia, siendo estos efectos independientes. Es interesante tomar en cuenta que *in vivo* cambia tanto el promedio de la conductancia (Steriade y col., 2001), que corresponde a las conductancias pasivas en EACA implementado (ver Sección 3.5.2), como la intensidad de las fluctuaciones (Haider y McCormick, 2009). Por lo tanto, la curva de probabilidad de disparo *in vivo* debe ser una curva dinámica, en que cambia tanto el promedio de intensidad de estímulo como la ganancia, dependiendo del comportamiento del animal .

Al calcular la entropía de información de Shannon se corroboró el carácter probabilístico de la condición experimental EACA, que tiene considerablemente mayor entropía que las condiciones control y CP, y por lo tanto, mayor incertidumbre. Una interpretación interesante de estos resultados se puede obtener en el contexto de la mecánica estadística, dónde se hace hincapié que fenómenos que tienen mayor entropía de información tie-

nen mayor cantidad de estados posibles (Pathria, 1972). La condición EACA tiene, por lo tanto, una mayor cantidad de estados posibles. Esto se puede interpretar de la siguiente manera: una neurona *in vitro* sólo puede dar cuenta de dos tipos de estímulos, los que están bajo un estrecho rango de estimulación, que tienen cero probabilidad de evocar espigas, y los que están sobre este umbral, que tienen probabilidad igual a 1 de evocar espigas. En estas condiciones, si se quisiera inferir la intensidad del estímulo viendo la actividad de potenciales de acción la neurona, sólo podría decidir si éste está sobre o debajo del umbral de estimulación. Por otro lado como muestran estos experimentos, en el estado de alta conductancia artificial semejante a la condición *in vivo*, un estímulo dado puede evocar o no potenciales de acción con una cierta probabilidad de ocurrencia. Así, al hacer una estadística de los potenciales de acción y encontrar la probabilidad de disparo para un determinado intervalo de tiempo, es posible inferir unívocamente la intensidad del estímulo, si ésta está en el intervalo en donde la probabilidad de disparo es distinta a 0 o a 1. Entonces, en esta condición, es posible diferenciar distintas intensidades de estímulos asociadas a distintas probabilidades de respuesta, y en efecto las células cuentan con mecanismos que les permiten sentir la actividad (e.j. CMKII actúa como detector de frecuencias de disparo). Por lo tanto, estos resultados muestran que en condiciones semejantes a condiciones *in vivo*, además de poseer más incertidumbre que en la condición *in vitro* en su probabilidad de disparo, una neurona es capaz de representar más información de las

intensidades de estímulo en su tren de espigas.

Como se menciona en la Sección 4.3, los resultados que se muestran en la curva 7 D) sugieren que la excitabilidad neuronal puede ser modulada por la relación entre conductancia promedio que posee la neurona debido a la red activa con respecto a su conductancia intrínseca (condición control). Interesantemente, este experimento preliminar sugiere que una neurona con un valor alto de conductancia intrínseca o baja resistencia (por ejemplo neuronas grandes) puede ser menos afectada en la disminución de su excitabilidad con respecto a una neurona con menos conductancia intrínseca o mayor resistencia (neurona más pequeña) cuando la red neuronal le inserte la misma cantidad de conductancia promedio a las dos.

5.4. Buscando resonancia estocástica en estado de alta conductancia artificial (EACA)

Con los datos experimentales obtenidos en este trabajo no se puede decidir si existe o no resonancia estocástica en las neuronas piramidales hipocampales debido a que la cantidad de experimentos hechos (2 experimentos) y la poca resolución de valores de σ_{gi} para el máximo de SNR*. Sin embargo este no era el objetivo de este trabajo, sino desarrollar las técnicas experimentales para poder estudiar fenómenos de este tipo. Aun así, se encontró que existe un efecto de la intensidad del ruido sináptico en la respuesta

neuronal a estímulos coherentes sub-umbrales para un cierto intervalo del ruido sináptico artificial. Se observó que estímulos de conductancia coherentes con efectos sub-umbrales en la condición control, tenían cierta probabilidad de evocar espigas en presencia de ruido sináptico artificial, y producían un cambio perceptible en la probabilidad de disparo a frecuencia cercanas a la frecuencia de estimulación o armónicos de ésta. Todo esto sugiere que el ruido sináptico en condiciones *in vivo* (estado de alta conductancia) tiene el efecto de amplificar señales sinápticas débiles, produciendo que éstas puedan ser representadas en trenes de potenciales de acción por parte de la neurona.

En este contexto, sería interesante estudiar con más detalle el intervalo dónde la intensidad del ruido tiene un máximo en SNR*, y con esto encontrar la firma cualitativa del fenómeno de resonancia estocástica, ya que en los experimentos hechos no se tiene la resolución adecuada de valores de σ_{g_i} para establecer el máximo. Por otro lado, otro estudio interesante de realizar es cuantificar el efecto de la frecuencia de la señal en el SNR* en presencia de ruido sináptico artificial, y en conjunto con esto explorar cómo neuronas con distintas propiedades intrínsecas representan en trenes de potenciales de acción señales sinápticas coherentes de distintas frecuencias en EACA.

5.5. Restitución del régimen de disparo después del bloqueo farmacológico de los canales de sodio usando la técnica *dynamic clamp*

Aunque debiese ser posible restituir el disparo de potenciales de acción de membrana después de la aplicación de TTX insertando sólo conductancias de sodio dependientes de potencial (Milescu y col., 2008), en estos experimentos exploratorios fue posible evocar sólo espigas únicas, pero no evocar el disparo sostenido de potenciales de acción. Lo último se logró al insertar además conductancias de potasio dependientes del potencial. Esto sugiere fuertemente que el modelo usado (Richardson, 2003) reproduce de manera insuficiente la dinámica de la corriente de sodio de las neuronas piramidales de hipocampo. Por lo tanto, para reproducir la dinámica de esta corriente se debe cambiar los parámetros del modelo o cambiar el modelo que reproduce las conductancias de sodio responsables del potencial de acción en las neuronas piramidales de hipocampo. Una aproximación interesante de implementar es la hecha por Milescu y col. en 2008, que usando la técnica *dynamic clamp* encuentra los parámetros de un modelo biofísico de conductancia de muchos estados en tiempo real.

En todo caso, es importante recalcar que estos resultados preliminares muestran que es posible inyectar conductancias dependientes de potencial con la técnica de *dynamic clamp* implementada.

6. Conclusión

En este trabajo se logró implementar exitosamente la técnica *dynamic clamp* y desarrollar un conjunto de procedimientos experimentales (ver Apéndice B) para recrear y estudiar *in vitro*, el estado de alta conductancia (Destexhe y col., 2003) observado *in vivo*. Con esto se logró recrear las principales características del estado de alta conductancia que han sido observados en registros *in vivo*.

Los estudios hechos en este trabajo sugieren que en condiciones *in vivo* la excitabilidad de las neuronas dependería de al menos dos factores: las fluctuaciones debido a la descorrelación de los inputs sinápticos provenientes de la red activa y la relación entre la conductancia promedio debido a la red activa con respecto a la conductancia intrínseca de la neurona. Interesantemente, estos estudios también sugieren que en condiciones en que la red neuronal está activa y existen fluctuaciones del potencial de membrana, una neurona es capaz de representar más información de las intensidades de un estímulo en su tren de espigas. Los estudios hechos en este trabajo también sugieren que el ruido sináptico del estado de alta conductancia tiene el efecto de amplificar señales sinápticas débiles, implicando que estas puedan ser representadas en trenes de potenciales de acción por parte de la neurona. Todas estas conclusiones fueron obtenidas a partir de experimentos exploratorios que tenían como objetivo probar la técnica de *dynamic clamp* implementada y los protocolos experimentales desarrollados. Se necesitan más y mejores experimentos para

afirmar estas conclusiones con mayor robustez.

Así, la implementación de la técnica *dynamic clamp* y el desarrollo de protocolos de estimulación de *dynamic clamp* para estudiar el ruido sináptico y para insertar conductancias activas, además de mostrar resultados preliminares interesantes y de relevancia en neurofisiología, abren una nueva gama de posibilidades de nuevas investigaciones en el laboratorio de Fisiología Celular.

Referencias

- Abbott, L. F. (2008). Theoretical neuroscience rising. *Neuron*, 60(3):489–495.
- Baranyi, A., Szente, M. B., and Woody, C. D. (1993). Electrophysiological characterization of different types of neurons recorded in vivo in the motor cortex of the cat. II. Membrane parameters, action potentials, current-induced voltage responses and electrotonic structures. *Journal of Neurophysiology*, 69(6):1865–1879.
- Bernander, O., Douglas, R. J., Martin, K. A., and Koch, C. (1991). Synaptic background activity influences spatiotemporal integration in single pyramidal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(24):11569–11573.
- Berthier, N. and Woody, C. D. (1988). In vivo properties of neurons of the precruciate cortex of cats. *Brain research bulletin*, 21(3):385–393.
- Bindman, L. J., Meyer, T., and Prince, C. A. (1988). Comparison of the electrical properties of neocortical neurones in slices in vitro and in the anaesthetized rat. *Experimental brain research. Experimentelle Hirnforschung. Expérimentation cérébrale*, 69(3):489–496.
- Brette, R., Piwkowska, Z., Monier, C., Rudolph-Lilith, M., Fournier, J., Levy, M., Frégnac,

- Y., Bal, T., and Destexhe, A. (2008). High-resolution intracellular recordings using a real-time computational model of the electrode. *Neuron*, 59(3):379–391.
- Casado, J. (1997). Noise-induced coherence in an excitable system. *Physics Letters A*, 235(5):489–492.
- Cover, T. M. and Thomas, J. A. (1991). *Elements of Information Theory*. Wiley-Interscience, 99th edition.
- Davie, J., Kole, M., Letzkus, J., and Rancz, E. (2006). Dendritic patch-clamp recording. *Nature protocols*.
- Destexhe, A. and Bal, T., editors (2010). *Dynamic-Clamp: From Principles to Applications (Springer Series in Computational Neuroscience)*. Springer, softcover reprint of hardcover 1st ed. 2009 edition.
- Destexhe, A. and Paré, D. (1999). Impact of network activity on the integrative properties of neocortical pyramidal neurons in vivo. *Journal of neurophysiology*, 81(4):1531–1547.
- Destexhe, A., Rudolph, M., Fellous, J. M., and Sejnowski, T. J. (2001). Fluctuating synaptic conductances recreate in-vivo-like activity in neocortical neurons. *Neuroscience*, 107(1):13–24.

- Destexhe, A., Rudolph, M., and Paré, D. (2003). The high-conductance state of neocortical neurons in vivo. *Nature Reviews Neuroscience*, 4(9):739–751.
- Dorval, A. D. (2005). Channel Noise is Essential for Perithreshold Oscillations in Entorhinal Stellate Neurons. *Journal of Neuroscience*, 25(43):10025–10028.
- Dorval, A. D., Christini, D. J., and White, J. A. (2001). Real-Time Linux Dynamic Clamp: A Fast and Flexible Way to Construct Virtual Ion Channels in Living Cells. *Annals of Biomedical Engineering*, 29(10):897–907.
- Economo, M. N., Fernandez, F. R., and White, J. A. (2010). Dynamic Clamp: Alteration of Response Properties and Creation of Virtual Realities in Neurophysiology. *Journal of Neuroscience*, 30(7):2407–2413.
- Elson, R., Selverston, A., Huerta, R., Rulkov, N., Rabinovich, M., and Abarbanel, H. (1998). Synchronous Behavior of Two Coupled Biological Neurons. *Physical Review Letters*, 81(25):5692–5695.
- Engel, A. K., Fries, P., and Singer, W. (2001). Dynamic predictions: oscillations and synchrony in top-down processing. *Nature reviews. Neuroscience*, 2(10):704–716.
- Ermentrout, G. B. and Terman, D. H. (2010). *Mathematical Foundations of Neuroscience*. Springer, 1st edition. edition.

- Evarts, E. V. (1964). Temporal Patterns of Discharge of Pyramidal Tract Neurons During Sleep and Waking in Monkey. *Journal of neurophysiology*, 27:152–171.
- Fellous, J.-M., Rudolph, M., Destexhe, A., and Sejnowski, T. J. (2003). Synaptic background noise controls the input/output characteristics of single cells in an in vitro model of in vivo activity. *Neuroscience*, 122(3):811–829.
- Fernandez, F. and White, J. A. (2010). Gain Control in CA1 Pyramidal Cells Using Changes in Somatic Conductance. *the Journal of Neuroscience*.
- Fernández, J. F. and Criado, C. (1999). Algorithm for normal random numbers. *Physical review. E, Statistical physics, plasmas, fluids, and related interdisciplinary topics*, 60(3):3361–3365.
- Gammaitoni, L., Hänggi, P., Jung, P., and Marchesoni, F. (1998). Stochastic resonance. *Reviews of Modern Physics*, 70(1):223–287.
- Gillespie, D. (1996). The mathematics of Brownian motion and Johnson noise. *American Journal of Physics*.
- Goaillard, J.-M. and Marder, E. (2006). Dynamic clamp analyses of cardiac, endocrine, and neural function. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 21:197–207.
- Gurney, K. N. (2001). Information processing in dendrites I. Input pattern generalisa-

- tion. *Neural networks : the official journal of the International Neural Network Society*, 14(8):991–1004.
- Haider, B. and McCormick, D. A. (2009). Rapid Neocortical Dynamics: Cellular and Network Mechanisms. *Neuron*, 62(2):171–189.
- Hô, N. and Destexhe, A. (2000). Synaptic background activity enhances the responsiveness of neocortical pyramidal neurons. *Journal of Neurophysiology*, 84(3):1488–1496.
- Hughes, S. W., Cope, D. W., and Crunelli, V. (1998). Dynamic clamp study of I_h modulation of burst firing and delta oscillations in thalamocortical neurons in vitro. *Neuroscience*, 87(3):541–550.
- Idoux, E. and Mertz, J. (2011). Control of local intracellular calcium concentration with dynamic-clamp controlled 2-photon uncaging. *PloS one*, 6(12):e28685.
- Izhikevich, E. M. (2010). *Dynamical Systems in Neuroscience: The Geometry of Excitability and Bursting*. The MIT Press.
- Kispersky, T. J., Economo, M. N., Randeria, P., and White, J. A. (2011). GenNet: A Platform for Hybrid Network Experiments. *Frontiers in neuroinformatics*, 5:11.
- Kole, M. H. P., Ilshner, S. U., Kampa, B. M., Williams, S. R., Ruben, P. C., and Stuart,

- G. J. (2008). Action potential generation requires a high sodium channel density in the axon initial segment. *Nature neuroscience*, 11(2):178–186.
- Laing, C. and Lord, G. J., editors (2009). *Stochastic Methods in Neuroscience*. Oxford University Press, USA, 1 edition.
- Latorre, R. (1996). *Biofísica y fisiología celular*. Universidad de Sevilla.
- Longtin, A. (1993). Stochastic resonance in neuron models. *Journal of Statistical Physics*, 70(1-2):309–327.
- Ma, M. and Koester, J. (1996). The role of K⁺ currents in frequency-dependent spike broadening in Aplysia R20 neurons: a dynamic-clamp analysis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 16(13):4089–4101.
- Marks, R. J. I. (2012). *Introduction to Shannon Sampling and Interpolation Theory*. Springer Verlag.
- Matsumura, M., Cope, T., and Fetz, E. E. (1988). Sustained excitatory synaptic input to motor cortex neurons in awake animals revealed by intracellular recording of membrane potentials. *Experimental brain research. Experimentelle Hirnforschung. Expérimentation cérébrale*, 70(3):463–469.
- Milescu, L. S., Yamanishi, T., Ptak, K., Mogri, M. Z., and Smith, J. C. (2008). Real-

- time kinetic modeling of voltage-gated ion channels using dynamic clamp. *Biophysical journal*, 95(1):66–87.
- Neher, E. (1992). [6] Correction for liquid junction potentials in patch clamp experiments. pages 123–131. Elsevier.
- Paré, D., Shink, E., Gaudreau, H., Destexhe, A., and Lang, E. J. (1998). Impact of spontaneous synaptic activity on the resting properties of cat neocortical pyramidal neurons In vivo. *Journal of neurophysiology*, 79(3):1450–1460.
- Pathria, P. K. (1972). *Statistical Mechanics*. Butterworth-Heinemann.
- Prescott, S. A., Ratte, S., De Koninck, Y., and Sejnowski, T. J. (2008). Pyramidal Neurons Switch From Integrators In Vitro to Resonators Under In Vivo-Like Conditions. *Journal of Neurophysiology*, 100(6):3030–3042.
- Prescott, S. A. and Sejnowski, T. J. (2008). Spike-Rate Coding and Spike-Time Coding Are Affected Oppositely by Different Adaptation Mechanisms. *Journal of Neuroscience*, 28(50):13649–13661.
- Prinz, A. A., Abbott, L. F., and Marder, E. (2004). The dynamic clamp comes of age. *Trends in neurosciences*, 27(4):218–224.
- Rall, W. (1967). Distinguishing theoretical synaptic potentials computed for diffe-

- rent soma-dendritic distributions of synaptic input. *Journal of Neurophysiology*, 30(5):1138–1168.
- Richardson, M. J. E. (2003). From Subthreshold to Firing-Rate Resonance. *Journal of Neurophysiology*, 89(5):2538–2554.
- Robinson, H. P. and Kawai, N. (1993). Injection of digitally synthesized synaptic conductance transients to measure the integrative properties of neurons. *Journal of neuroscience methods*, 49(3):157–165.
- Rolls, E. T. and Deco, G. (2010). *The Noisy Brain: Stochastic Dynamics as a Principle of Brain Function*. Oxford University Press, USA, 1 edition.
- Rudolph, M. (2003). Gain modulation and frequency locking under conductance noise. *Neurocomputing*.
- Rudolph, M. and Destexhe, A. (2001). Do neocortical pyramidal neurons display stochastic resonance? *Journal of computational neuroscience*, 11(1):19–42.
- Rudolph, M. and Destexhe, A. (2003). A fast-conducting, stochastic integrative mode for neocortical neurons in vivo. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 23(6):2466–2476.
- Sharp, A. A., O’Neil, M. B., Abbott, L. F., and Marder, E. (1993a). Dynamic

- clamp: computer-generated conductances in real neurons. *Journal of neurophysiology*, 69(3):992–995.
- Sharp, A. A., O’Neil, M. B., Abbott, L. F., and Marder, E. (1993b). The dynamic clamp: artificial conductances in biological neurons. *Trends in neurosciences*, 16(10):389–394.
- Sharp, A. A., Skinner, F. K., and Marder, E. (1996). Mechanisms of oscillation in dynamic clamp constructed two-cell half-center circuits. *Journal of neurophysiology*, 76(2):867–883.
- Shu, Y., Hasenstaub, A., Badoual, M., Bal, T., and McCormick, D. A. (2003). Barrages of synaptic activity control the gain and sensitivity of cortical neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 23(32):10388–10401.
- Steriade, M., Timofeev, I., and Grenier, F. (2001). Natural waking and sleep states: a view from inside neocortical neurons. *Journal of Neurophysiology*, 85(5):1969–1985.
- Stuart, G., Spruston, N., and Hausser, M., editors (2007). *Dendrites*. Oxford University Press, USA, 2 edition.
- Uhlenbeck, G. and Ornstein, L. (1930). On the Theory of the Brownian Motion. *Physical Review*, 36(5):823–841.
- Varela, F., Lachaux, J.-P., Rodriguez, E., and Martinerie, J. (2001). The brainweb: Phase

- synchronization and large-scale integration. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(4):229–239.
- Wei, D. S., Mei, Y. A., Bagal, A., Kao, J. P., Thompson, S. M., and Tang, C. M. (2001). Compartmentalized and binary behavior of terminal dendrites in hippocampal pyramidal neurons. *Science (New York, N.Y.)*, 293(5538):2272–2275.
- Wiesenfeld, K. (1995). Stochastic resonance and the benefits of noise: from ice ages to crayfish and SQUIDS. *Nature*.
- Woody, C. D. and Gruen, E. (1978). Characterization of electrophysiological properties of intracellularly recorded neurons in the neocortex of awake cats: a comparison of the response to injected current in spike overshoot and undershoot neurons. *Brain research*, 158(2):343–357.

A. Descripción matemática de las conductancias activas tipo Sodio y Potasio insertadas usando la técnica *dynamic clamp*

Las corriente inyectada con el sistema *dynamic clamp* en la condición TTX+*dynamic clamp* fue:

$$I_{DClamp} = I_{CC} + g_{Na}m(t)^3h(t)(V - V_{Na}) + g_Kn(t)^4(V - V_K) \quad (23)$$

Dónde las variables dinámicas $m(t)$, $h(t)$ y $n(t)$ fueron obtenidas resolviendo las ecuaciones diferenciales ordinarias de primer orden que describen su dinámica. Esto realizado a las velocidades de registro descritas en la sección 3.3.2 en tiempo real durante el experimento. Las ecuaciones son:

$$\dot{m} = \frac{m_{\infty}(V) - m}{\tau_m(V)} \quad (24)$$

$$\dot{h} = \frac{h_{\infty}(V) - h}{\tau_h(V)} \quad (25)$$

$$\dot{n} = \frac{n_{\infty}(V) - n}{\tau_n(V)} \quad (26)$$

En dónde:

$$m_{\infty}(v) = \frac{\alpha_m(V)}{\alpha_m(V) + \beta_m(V)} \quad (27)$$

$$h_{\infty}(v) = \frac{\alpha_h(V)}{\alpha_h(V) + \beta_h(V)} \quad (28)$$

$$n_{\infty}(v) = \frac{\alpha_n(V)}{\alpha_n(V) + \beta_n(V)} \quad (29)$$

$$\tau_m(v) = \frac{1}{\alpha_m(V) + \beta_m(V)} \quad (30)$$

$$\tau_h(v) = \frac{1}{\alpha_h(V) + \beta_h(V)} \quad (31)$$

$$\tau_n(v) = \frac{1}{\alpha_n(V) + \beta_n(V)} \quad (32)$$

Y por último:

$$\alpha_m(V) = \frac{-0,1(V+32)}{e^{-0,1(V+32)} - 1} \quad (33)$$

$$\beta_m(V) = 4e^{-(V+57)/18} \quad (34)$$

$$\alpha_h(V) = 0,07e^{-(V+46)/20} \quad (35)$$

$$\beta_h(V) = \frac{1}{1 + e^{-0,1(V+16)}} \quad (36)$$

$$\alpha_n(V) = \frac{-0,01(V+36)}{e^{-0,1(V+36)} - 1} \quad (37)$$

$$\beta_n(V) = 0,125e^{-(V+46)/80} \quad (38)$$

En los experimentos mostrados en este trabajo se usaron valores para los potenciales de inversión y conductancias máximas de: $V_{Na} = 50\text{mV}$, $V_K = -77\text{mV}$, $g_{Na} = 30\text{nS}$ y $g_K = 15\text{nS}$. El código de los protocolos desarrollados en C++ e integrado al software RTX1, correspondientes a las corrientes tipo Sodio y tipo Potasio, se encuentra en el CD adjuntado al documento escrito de este seminario de título.

B. Codigos de los protocolos de estimulación desarrollados y que fueron integrados al software RTX1

En este apéndice son adjuntados en un CD los códigos en de los protocolos de estimulación dinámica desarrollados por mi en C++, y que luego fueron integrados al software RTX1. Lo que esta presente en el CD son los archivos .cpp, los archivos de definiciones .h y el archivo Makefile necesarios para integrar el protocolo en el software RTX1. Espero que estos protocolos estén pronto disponibles de disposición libre en la pagina web del software RTX1. Aun así, desde ahora estos son de libre uso y están protegidos por una licencia GNU (General Public License).