

Tesis Doctoral

# Caracterización y función de las corrientes activadas por hiperpolarización en neuronas piramidales de la lámina V de la corteza prefrontal

Pomata, Pablo Ernesto

2006

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Master's and Doctoral Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Pomata, Pablo Ernesto. (2006). Caracterización y función de las corrientes activadas por hiperpolarización en neuronas piramidales de la lámina V de la corteza prefrontal. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis\\_n4066\\_Pomata](http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n4066_Pomata)

Cita tipo Chicago:

Pomata, Pablo Ernesto. "Caracterización y función de las corrientes activadas por hiperpolarización en neuronas piramidales de la lámina V de la corteza prefrontal". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2006.

[http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis\\_n4066\\_Pomata](http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n4066_Pomata)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

**Universidad de Buenos Aires**  
**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**



**CARACTERIZACIÓN Y FUNCIÓN DE LAS CORRIENTES ACTIVADAS POR  
HIPERPOLARIZACIÓN EN NEURONAS PIRAMIDALES DE LA LÁMINA V  
DE LA CORTEZA PREFRONTAL**

Trabajo de Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

**Tesista: Lic. Pablo Ernesto Pomata**

**Director: Dr. Daniel Juan Calvo**

76825

Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular  
(INGEBI)

Julio de 2006

## Caracterización y función de las corrientes activadas por hiperpolarización en neuronas piramidales de la lámina V de la corteza prefrontal

### Resumen

En este trabajo se estudiaron las propiedades y las funciones de las corrientes activadas por hiperpolarización en neuronas piramidales de la lámina V de la corteza prefrontal utilizando la técnica de “patch-clamp” en configuración célula entera en rebanadas agudas de cerebro.

La corriente catiónica activada por hiperpolarización (I<sub>h</sub>) ha sido involucrada en varios roles a nivel celular como el control de la actividad rítmica en células marcapaso cardíacas y neuronas del sistema nervioso central, el mantenimiento del potencial de reposo cerca del umbral de disparo, participación de las propiedades de disparo de potenciales de acción en neuronas sin actividad rítmica, la regulación de la integración sináptica en neuronas piramidales e intervención en algunos tipos de plasticidad sináptica. Las neuronas piramidales de la lámina V de la corteza cerebral reciben gran cantidad de sinapsis y son la principal vía de salida de la información hacia regiones subcorticales, por lo que están en una posición privilegiada para ejercer el control de la información procesada en la corteza cerebral. La corteza prefrontal es una región asociada a funciones cognitivas complejas y al control de comportamientos voluntarios motivados. Se cree que está involucrada en enfermedades neuropsiquiátricas como la esquizofrenia, el déficit de atención con desorden hiperactivo (ADHD), el mal de Parkinson y la adicción a drogas.

Se encontró que estas neuronas expresan dos corrientes activadas por hiperpolarización, una lenta (I<sub>h</sub>) y una rápida (I<sub>kir</sub>, *inward rectifier K<sup>+</sup> current*). Para aislar cada una de estas componentes se utilizó BaCl<sub>2</sub>, un bloqueante de I<sub>kir</sub>, y ZD7288, un bloqueante de I<sub>h</sub>. El BaCl<sub>2</sub> inhibió I<sub>kir</sub> en forma dosis dependiente sin efecto sobre I<sub>h</sub> hasta 200 μM, con un EC<sub>50</sub> de 113,3 ± 2,3 μM. El ZD7288 bloqueó I<sub>h</sub> en forma dosis dependiente con un EC<sub>50</sub> de 1,65 μM ± 0,6. El estudio de las propiedades biofísicas de I<sub>h</sub> mostró que cerca del V<sub>50</sub> su amplitud fue de 219 ± 16 pA y su activación tuvo dos constantes de tiempo, 169 ± 28 ms y 1306 ± 89 ms. El potencial de reversión y el V<sub>50</sub> de I<sub>h</sub> fueron de -83,6 ± 2,4 mV y -17,6 ± 2,4 mV, respectivamente. Se encontró que I<sub>h</sub> en estas neuronas tiene baja sensibilidad a los nucleótidos cíclicos ya que la aplicación de 8Br-cAMP intracelular corrió el V<sub>50</sub> de -83,6 ± 2,3 mV a -77,3 ± 3 mV (p = 0,0024). Sin

embargo ni dopamina ni serotonina tuvieron efecto sobre  $I_h$  en nuestras condiciones. En su conjunto las características de  $I_h$  en neuronas piramidales de la lámina V de corteza prefrontal son similares a las encontradas en hipocampo y corteza somatosensorial de roedores. Estas regiones tienen una alta expresión de la subunidad HCN1 cuyas características son similares a las descritas.

En la segunda parte de este trabajo, para entender el rol de  $I_h$  en estas neuronas, se estudió el efecto del ZD7288 sobre la excitabilidad y la propagación de potenciales de acción por las dendritas. La aplicación de ZD7288  $20\mu\text{M}$  produce una hiperpolarización de  $6,9\text{mV}$  indicando la contribución de  $I_h$  al mantenimiento del potencial de reposo. El bloqueo de  $I_h$  redujo la amplitud de la hiperpolarización post-potencial (AHP) producida luego del disparo en ráfagas en forma dependiente del potencial de reposo. El ZD7288 reduce el AHP a  $-70\text{mV}$  y  $-80\text{mV}$  mientras que no tiene efecto a  $-60\text{mV}$ . Inversamente el AHP a  $-60\text{mV}$  es inhibido por bloqueantes de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  mientras que a  $-80$  el  $\text{Ca}^{2+}$  no contribuye al AHP, indicando que está mediado por  $I_h$ .

Se estudió si la alta densidad de canales HCN reportada en las dendritas de estas neuronas afecta la propagación de potenciales por la dendrita apical usando un colorante sensible a  $\text{Ca}^{2+}$ . Se evocaron potenciales de acción somáticos y al mismo tiempo se midió el transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$  provocado por la apertura de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  voltaje dependiente en el soma y la región proximal de la dendrita apical. La propagación de potenciales de acción hacia las dendritas provocó un mayor aumento de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular cuando  $I_h$  fue bloqueada con ZD7288 o CsCl en aproximadamente un 20%. Este efecto no fue detectado en el soma.

Estos resultados sugieren que  $I_h$  participa activamente en el control de la excitabilidad de las neuronas piramidales regulando el patrón de disparo y la propagación retrógrada de potenciales de acción.

## **Characterization and function of hyperpolarization-activated currents in layer V pyramidal neurons of the frontal cortex**

### **Abstract**

In the present work we performed whole-cell patch-clamp recordings in acute brain slices in order to elucidate the role and the characteristics of hyperpolarization-activated cationic current (I<sub>h</sub>) in layer V pyramidal neurons of mouse frontal cortex.

I<sub>h</sub> is involved in several functions such as regulation of burst firing in pacemaker cells in heart and central neurons, maintaining the resting potential near threshold, contributing to firing patterns in neurons that lack oscillatory firing, control of synaptic integrative properties in pyramidal neurons and regulation of synaptic plasticity. Layer V pyramidal neurons receive profuse synaptic input and are the main output to subcortical nucleus. They are a possible point of control of information flow. The prefrontal cortex is a region involved in high order cognitive functions and goal directed behavior. It is involved in pathophysiology of neuropsychiatric disorder like schizophrenia, attentional deficit hyperactive disorder (ADHD) and Parkinson disease and drug addiction.

Two hyperpolarization-activated currents were identified; an instantaneous component presumable the inward rectifier potassium current (I<sub>kir</sub>), and a slowly activating component, I<sub>h</sub>. Extracellular application of BaCl<sub>2</sub> blocked I<sub>kir</sub> (IC<sub>50</sub> = 113.3 ± 2.3 μM) without reducing I<sub>h</sub> up to concentrations of 200 μM. ZD7288 potently blocked I<sub>h</sub> (IC<sub>50</sub> 1.65 μM ± 0.6). The study of biophysical properties of I<sub>h</sub> showed that near V<sub>50</sub> the amplitude was -219 ± 16 pA. Activation was well fitted by two time constant of 169 ± 28 ms and 1306 ± 89 ms. The V<sub>50</sub> and the extrapolated reversal potential of I<sub>h</sub> were -83.6 ± 2.4 mV and -17.6 ± 2.4 mV, respectively. The application of intracellular 8Br-cAMP at 10 μM induced a shift in the activation curve from -83.6 ± 2.3 mV a -77.3 ± 3 mV (p = 0,0024). However, neither dopamine nor serotonin were able to modulate the amplitude of I<sub>h</sub> in our conditions. The characteristic of I<sub>h</sub> in layer V pyramidal neurons of the prefrontal cortex were similar to those described in pyramidal neurons from hippocampus and somatosensory cortex. These regions are rich in the HCN1 subunit whose characteristics are similar to those described here.

The selective blocker ZD7288 was used to address the role of I<sub>h</sub> in excitability and action potential propagation in dendrites. Applications of ZD7288 20 μM at resting potential induced and hyperpolarization of 6.9 mV indicating the involvement in

maintaining resting potential. ZD7288 also reduced the AHP after a train of action potentials. To corroborate this observation we measured the amplitude of the AHP at different resting potentials. The application of ZD7288 20 $\mu$ M abolished the AHP at -80mV but had no effect at -60mV. The perfusion with Ca<sup>2+</sup> channel blockers reduced AHP amplitude at -60mV but had no effect at -80mV. These results indicate the participation of Ih in the AHP at hyperpolarized potentials.

It was shown Ih participates in the regulation of signals transmitted between the soma and apical dendrites due to the high expression in apical dendrites. To investigate this phenomenon we performed simultaneous somatic whole-cell recordings and Ca<sup>2+</sup> imaging in apical dendrites. We found that blockade of Ih with either ZD7288 20 $\mu$ M or Cs<sup>+</sup> 3mM resulted in an increased dendritic Ca<sup>2+</sup> transients evoked by trains of somatically evoked action potentials. No effect was detected on somatic Ca<sup>2+</sup> levels. These results shows Ih in layer V pyramidal neurons can regulate the firing properties and the backpropagation of action potentials.

## AGRADECIMIENTOS

A Dani, mi jefe, por permitirme trabajar en su laboratorio con total libertad. Por confiar en mí y darme la oportunidad de subir a ese viaje de ida que es el *patch*

A Lucas Pozzo-Miller por su generosidad, por darme un lugar en su laboratorio, su casa y hacer posible parte de los resultados obtenidos en esta tesis

Al Dr. Torres, el director, y a todos los investigadores y trabajadores del INGEBI. Gracias por trabajar todos los días para hacer del INGEBI un buen lugar donde realizar investigación. Sin ellos “el lab” no existiría

Al CONICET por otorgarme la beca para subsistir durante el desarrollo de esta tesis

A Juan, Caro y Santy porque trabajar con ustedes es un verdadero placer. No podía pedir mejores amigos de laboratorio.

A Julián, Paola, Maru y Vivi porque son grandes personas y compañeros de trabajo, por hacer la vida diaria en el lab tan llevadera y entretenida.

A Jime, Jessi, Ceci, Marce, Luciana y Javi por estar siempre listos y predispuestos, y completar el gran equipo de amigos del lab

A Eleo y Belén por el afecto generado en tantos años compartiendo algo más que el laboratorio

A mis amigos, por poder contar con ellos en cualquier momento. Sin ustedes no estaría completo.

A mi familia, a quien lo debo gran parte de este trabajo que también es fruto de su esfuerzo

Y a Ana, mi compañera incondicional durante toda esta etapa y muchas más, no hay palabras que alcancen, por eso, simplemente, gracias!

**A Ana y Tomás**



## ABREVIATURAS

- 8Br-AMPC:** 8-bromo-adenosina monofosfato cíclica
- ACd:** área cingulada dorsal anterior, también Cg1
- ACv:** área cingulada ventral anterior, también Cg2.
- AHP:** hiperpolarización post-potencial
- AHPm:** hiperpolarización post-potencial de duración media
- AMPC:** adenosina monofosfato cíclica
- BAP:** potenciales de acción retropropagados
- BBS:** buffer bicarbonato salino
- CIC:** canales de  $Cl^-$
- Cm:** capacitancia de membrana
- CNBD:** dominio de unión a nucleótidos cíclicos
- CNG:** canales activados por nucleótidos cíclicos
- CPF:** corteza prefrontal
- CPFm:** corteza prefrontal medial
- DAP:** despolarización post-potencial
- DIC:** contraste de interferencia diferencial
- DMSO:** dimetilsulfoxido
- E<sub>Ih</sub>:** potencial de reversión de I<sub>h</sub>
- E<sub>k</sub>:** potencial de reversión del K<sup>+</sup>
- EPSP:** potenciales postsinápticos excitatorios
- F:** fluorescencia
- Fr2:** área frontal 2, también PrCm
- FS:** neurona de disparo rápido.
- HCN:** canales activados por hiperpolarización y nucleótidos cíclicos
- IB:** neurona de disparo en ráfagas
- I<sub>Ba</sub>:** corriente sensible a Ba<sup>2+</sup>
- I<sub>c</sub>:** corriente de cola
- I<sub>ee</sub>:** corriente es el estado estacionario
- I<sub>f</sub>:** corriente catiónica activada por hiperpolarización en tejido cardiaco
- I<sub>h</sub>:** corriente catiónica activada por hiperpolarización
- I<sub>ini</sub>:** corriente inicial

**I<sub>kir</sub>**: corriente mediada por Kir  
**I<sub>k<sub>leak</sub></sub>**: corriente de fuga mediada por canales de K<sup>+</sup>  
**IL**: corteza infralímbica  
**IM**: neurona intermedia  
**I<sub>q</sub>**: lh  
**IR**: infrarrojo  
**I-V**: relación corriente-voltaje  
**I<sub>ZD</sub>**: corriente sensible a ZD7288  
**K<sub>Ca</sub>**: canales de potasio activados por Ca<sup>2+</sup>  
**Kir**: canales de potasio tipo *inward rectifier*  
**K<sub>leak</sub>**: canales de K<sup>+</sup> de fuga  
**MiRP1**: proteína relacionada con Mink.  
**NPLV**: neuronas piramidales de la lamina cinco  
**OGB-1**: oregon green BAPTA-1  
**PL**: corteza prelímbica  
**R<sub>m</sub>**: resistencia de membrana  
**ROB**: neuronas de disparo oscilatorio en ráfagas  
**ROI**: región de interés  
**RS**: neurona de disparo regular.  
**R<sub>s</sub>**: resistencia en serie  
**t<sub>90</sub>**: tiempo necesario para alcanzar el 90% de la amplitud máxima  
**τ<sub>L</sub>**: constante de tiempo lenta  
**τ<sub>R</sub>**: constante de tiempo rápida  
**V-I**: relación voltaje-corriente  
**V<sub>m</sub>**: potencial de membrana  
**V<sub>r</sub>**: potencial de reposo  
**VTA**: área tegmental ventral  
**ZD7288**: 4-(N-etil-N-fenilamino)-1,2-dimetil-6-(metilamino) pirimidina cloruro

## **INTRODUCCION**

Organización general de la corteza cerebral	1
Neuronas piramidales de la lámina V	3
La corteza prefrontal	4
Canales iónicos como determinantes de la actividad neuronal	6
Corrientes activadas por hiperpolarización	7
Características generales de I <sub>h</sub>	8
Estructura de los canales HCN	11
Localización de los canales HCN	13
Propiedades biofísicas de I <sub>h</sub>	14
Cinética	14
Dependencia del voltaje	16
Naturaleza iónica	17
Bloqueantes	18
Regulación de I <sub>h</sub> por nucleótidos cíclicos	19
Roles fisiológicos de I <sub>h</sub>	21
Regulación de la actividad de disparo rítmico	21
Control del potencial de reposo	22
Regulación de la excitabilidad	23
AHP, DAP e I <sub>h</sub> en neuronas	23
Integración sináptica	25
Plasticidad sináptica	27
Los canales de K <sup>+</sup> inward rectifier (Kir)	28
La propagación retrograda de potenciales de acción	29
Implicancias fisiológicas de los BAP	31

<b>OBJETIVOS</b>	34
------------------	----

<b>MATERIALES Y METODOS</b>	35
-----------------------------	----

Animales utilizados	35
Tipo de registros electrofisiológicos realizados	35
Determinación del área de registro	35

Tinción de Nissl	38
Obtención de rebanadas de cerebro para registros electrofisiológicos	39
Identificación morfológica de las NPLV	41
Videomicroscopía infrarroja con contraste de interferencia diferencial	41
Marcación con Neurobiotina	43
Establecimiento y adquisición de registros electrofisiológicos	43
Imágenes funcionales de $Ca^{2+}$	46
Soluciones y drogas	48
<b>RESULTADOS</b>	50
Identificación de las NPLV a registrar	50
Morfología	50
Propiedades de disparo de potenciales de acción	51
Las NPLV poseen al menos dos tipos de corrientes activadas por hiperpolarización,	52
Registros en modo fijación de corriente	52
Registros en modo fijación de voltaje	54
I <sub>kir</sub> es parte del componente rápido de la corriente activada por hiperpolarización	55
I <sub>kir</sub> se evidencia por su bloqueo a bajas concentraciones de $Ba^{2+}$	56
I <sub>h</sub> es sensible a concentraciones altas de $Ba^{2+}$	58
$Ba^{2+}$ despolariza a las NPLV en reposo y aumenta R <sub>m</sub>	60
Estimación de I <sub>kir</sub>	62
I <sub>h</sub> es el componente lento de las corrientes activadas por hiperpolarización	63
ZD7288 inhibe el componente lento en forma dosis-dependiente	64
ZD7288 bloquea I <sub>ini</sub> parcialmente	65
Estimación de I <sub>h</sub> como la corriente sensible a ZD7288	66
I <sub>h</sub> contribuye al potencial de reposo en las NPLV	69
Inhibición de I <sub>h</sub> e I <sub>ini</sub> por aplicación sucesiva de bloqueantes en la misma célula	71
Caracterización de I <sub>h</sub>	72
Cinética de I <sub>h</sub>	72
Dependencia del voltaje de I <sub>h</sub>	74

Estimación del potencial de reversión de $I_h$	76
Regulación de $I_h$ por nucleótidos cíclicos	78
$I_h$ contribuye a la hiperpolarización post-potencial (AHP)	81
El bloqueo de $I_h$ aumenta la entrada de calcio en las dendritas de las NPLV	89
<b>DISCUSION</b>	96
Las NPLV de corteza prefrontal de ratón	97
Corrientes activadas por hiperpolarización en NPLV	98
Caracterización de $I_{kir}$	99
Contribución de $I_{kir}$ al potencial de reposo	100
Caracterización de $I_h$	101
Sensibilidad a bloqueantes no selectivos	101
Efecto del ZD7288 sobre las corrientes activadas por hiperpolarización	102
Contribución al potencial de reposo	104
Propiedades biofísicas de $I_h$	104
Limitaciones de la técnica de fijación del voltaje	104
Cinética y amplitud	105
Rango de activación y $V_{50}$	107
Potencial de reversión de $I_h$	109
Regulación por nucleótidos cíclicos	109
Contribución de $I_h$ al AHP	111
Efecto de $I_h$ sobre los potenciales propagados en la dendrita apical	113
<b>CONCLUSIONES</b>	116
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	117

# INTRODUCCIÓN

## ORGANIZACIÓN GENERAL DE LA CORTEZA CEREBRAL

El sistema nervioso central consta de seis grandes regiones: la médula espinal, la médula oblongata, el cerebelo, el mesencéfalo, el diencéfalo, y el telencéfalo o hemisferios cerebrales. La corteza cerebral es la capa más externa de los hemisferios cerebrales. Esta alcanza su grado máximo de complejidad y desarrollo en los primates, especialmente en humanos. Tanto desde el punto de vista estructural como filogenético, se distinguen tres tipos básicos de corteza: *isocortex* (neocorteza) el último en aparecer en la evolución del cerebro, *paleocortex* que comprende al cerebro olfatorio y *arquicortex* constituido por la formación del hipocampo. Anatómicamente la corteza cerebral se divide en cuatro lóbulos principales: el lóbulo frontal ubicado en la porción anterior del cerebro, el lóbulo parietal de ubicación dorsal, el lóbulo temporal de ubicación lateral, y el lóbulo occipital que es la parte posterior del cerebro. Los lóbulos se dividen por sulcos prominentes que mantienen una posición relativamente constante en humanos.

Las neuronas de la corteza están dispuestas en seis láminas paralelas. La capa más externa, lámina I, está en contacto con la *pía mater* (meninge); la capa celular más interna, lámina VI, se localiza contiguamente a la sustancia blanca. Estas láminas pueden diferenciarse por su citoarquitectura (tamaño y número de células y densidad de axones mielinizados). La lámina I es prácticamente acelular y está compuesta fundamentalmente por axones que interconectan distintas regiones de la corteza. La lámina II ó capa granular externa generalmente es estrecha y está densamente poblada de neuronas piramidales de somas relativamente pequeños. También se la conoce como capa granular externa. La lámina III es de mayor espesor, en ella abundan las neuronas piramidales de cuerpos celulares grandes. Los axones de las neuronas ubicadas en las láminas II y III proveen la mayor parte de las conexiones de salida a otras regiones corticales. La lámina IV, denominada capa granular interna, está compuesta mayoritariamente por neuronas estrelladas espinosas y carece de neuronas piramidales. Esta capa tiene un espesor bastante variable y recibe principalmente aferencias del tálamo. En algunos casos como en la corteza sensorial primaria la cantidad de fibras de entrada talámicas es grande, es por ello que la lámina IV de ciertas regiones corticales como la corteza visual tiene un espesor mayor que las otras láminas. Contrariamente, en la corteza motora la lámina IV se encuentra muy reducida. La lámina V tiene un espesor considerable y se destaca por la presencia de neuronas piramidales de somas grandes cuya dendrita apical llega hasta la

lámina I. Los axones de estas neuronas proyectan a una amplia variedad de estructuras subcorticales. La lámina VI es la más profunda y posee tipos celulares multiformes. Algunas neuronas de la lámina VI proyectan sus axones hacia el tálamo.

Las células de la corteza cerebral, de acuerdo a su función, pueden dividirse en dos grandes grupos, excitatorias o inhibitorias. Las neuronas excitatorias son glutamatérgicas y representan el 75% de toda la población, tienen espinas dendríticas y según su morfología se agrupan en dos tipos neuronales, estrelladas y piramidales, siendo estas últimas mucho más abundantes. Por su parte, las neuronas inhibitorias representan aproximadamente el 25% de toda la población neuronal. Estas liberan el neurotransmisor GABA, no poseen espinas dendríticas y sus somas no son piramidales. Las neuronas inhibitorias constituyen un grupo heterogéneo de células que puede dividirse en al menos 8 tipos de acuerdo a su morfología y a la colocalización de GABA con otras sustancias (péptidos).

Las neuronas corticales también han sido clasificadas según su patrón de disparo de potenciales de acción describiéndose al menos cuatro grupos, denominados: de disparo regular (RS, por *regular spiking*), de disparo en ráfagas (IB, por *intrinsically bursting*), de disparo oscilatorio en ráfagas (ROB, por *repetitive oscillatory bursting*) y de disparo rápido (FS, por *fast spiking*) (Connors y Gutnick, 1990; Yang y col., 1996). Las neuronas RS se hallan en todas las láminas y son las más abundantes. La mayoría de ellas son neuronas piramidales, pero también pueden ser neuronas estrelladas. Las neuronas RS disparan potenciales de acción simples a una frecuencia inicial alta que va disminuyendo con el tiempo mientras se mantiene el estímulo. Este fenómeno se denomina acomodación y su grado es muy variable de una célula a otra. Luego de cada potencial de acción las neuronas RS presentan una AHP (hiperpolarización post-potencial) prominente que contribuye al fenómeno de acomodación. Las neuronas IB disparan inicialmente ráfagas de dos o más potenciales de acción. Luego del primer potencial de acción estas neuronas generan una DAP (despolarización post-potencial) dependiente de  $Ca^{2+}$  que facilita el disparo de nuevos potenciales de acción. Además, luego de una ráfaga de potenciales de acción presentan un AHP prominente. La AHP luego de cada potencial de acción es de menor amplitud que en células RS. El patrón de disparo de estas neuronas es característico de la lámina V. Morfológicamente se trata de células piramidales grandes con árboles dendríticos muy ramificados. Las neuronas ROB disparan potenciales de acción en ráfagas que se repiten oscilatoria y espontáneamente. Estas células parecen estar poco representadas en registros *in vitro*, y serían



exclusivamente neuronas piramidales de la lámina V. Por su parte las interneuronas inhibitorias gabaérgicas presentan un patrón de disparo del tipo FS caracterizado por la descarga continua de potenciales de acción de corta duración a alta frecuencia sin presentar adaptación. Luego de cada potencial de acción ocurre una AHP de gran amplitud y muy rápida. Si bien este patrón siempre corresponde a interneuronas inhibitorias no todas las interneuronas inhibitorias son FS.

Esta tipificación ha sido realizada en base a experimentos *in vitro* y como toda clasificación posee arbitrariedades. De hecho, existen variantes para cada uno de los patrones de disparo y muchas veces las diferencias no son sencillas de reconocer. Por ejemplo, las neuronas que tienen características intermedias entre RS e IB suelen denominarse IM (*intermediate*). Por otro lado, la clasificación de neuronas por patrón de disparo está siendo actualmente cuestionada ya que existen evidencias de que en algunos casos las neuronas pueden interconvertirse de un patrón a otro, con cambios sutiles de alguna condición del medio, por ejemplo, se ha descripto que las neuronas RS pueden comportarse *in vitro* como IB si se baja la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular (Friedman y Gutnick, 1989). En experimentos *in vivo* se observó que el patrón de disparo puede modificarse con cambios leves del potencial de reposo como los que se observan durante el ciclo de sueño-vigilia (Steriade y col., 2001). Estos autores sugieren que las neuronas piramidales *in vivo* pueden interconvertirse de un tipo a otro dependiendo del potencial de reposo al que se hallan (Steriade, 2004).

### Neuronas piramidales de la lámina V

Las neuronas piramidales de la lámina V (NPLV) poseen una serie de características que sugieren un rol importante para este tipo celular en el flujo de información cortical. Las NPLV proyectan sus axones hacia numerosas regiones subcorticales y representan la principal vía de salida de la información procesada en la corteza cerebral, junto con las neuronas de la lámina VI que proyectan hacia el tálamo. Las proyecciones de las NPLV se dirigen al cuerpo estriado, la médula espinal, el cerebro medio y otras estructuras subcorticales y corticales. Estas neuronas poseen un soma grande y su dendrita apical se extiende desde las láminas profundas hasta la lámina I donde se ramifica. Sus dendritas basales se extienden lateralmente por las láminas profundas, lo que en conjunto con la prominente dendrita apical le confiere la capacidad única de poder establecer contactos sinápticos con neuronas de todas las láminas de la

corteza. Estas características sugieren que las NPLV podrían regular, coordinar y sincronizar la actividad de la corteza cerebral (Gutnik y Mody, 1995). Las NPLV pueden presentar cualquiera de los tres patrones de disparo descritos anteriormente para neuronas piramidales RS, IB o ROB.

## **LA CORTEZA PREFRONTAL**

La corteza prefrontal (CPF) es la porción anterior del lóbulo frontal del cerebro. En humanos tuvo su máximo grado de desarrollo ocupando 1/3 del volumen total de la neocorteza. La CPF es también la región que aparece más tardíamente en la evolución del cerebro de mamíferos y la última en madurar durante el desarrollo ontogénico.

En la corteza frontal de los mamíferos se lleva a cabo la asociación y el procesamiento de información sensorial para la organización de comportamientos voluntarios complejos. Esta capacidad está relacionada con funciones cognitivas localizadas en este área como la memoria de trabajo, atención, selección, planeamiento y control inhibitorio (Miller, 2000; Fuster, 2001). En macacos, se demostró que en la CPF dorsolateral hay neuronas que disparan selectivamente durante la realización de pruebas que evalúan la memoria de trabajo espacial (Fuster y Alexander, 1971; Funahashi y col., 1989). Aunque en ratas no se encontró una región específica donde las neuronas respondan selectivamente durante una tarea que requiera memoria de trabajo, sí se ha mostrado que lesiones en la CPF medial reducen la memoria de trabajo, la organización temporal del comportamiento y la atención (Kolb y col., 1983; Dunnett, 1990; Broersen y col., 1995; Muir y col., 1996; Delatour y Gisquet-Verrier, 2000, 2001).

También se cree que la CPF está involucrada en desórdenes neuropsiquiátricos como la esquizofrenia, la ADHD (attention-deficit hyperactivity disorder), déficits cognitivos del mal de Parkinson y la adicción a drogas. En general las hipótesis incluyen el desbalance algunos de los circuitos catecolaminérgicos que inervan la CPF, como el dopaminérgico mediante el circuito mesocortical originado en el área tegmental ventral (VTA), el serotoninérgico que proviene de neuronas del rafe y el noradrenérgico cuyos somas están en el *locus coeruleus*. (Bardo y col., 1996; Arnsten, 1998; Yang y col., 1999). Se conocen múltiples efectos que estos neurotransmisores ejercen en las neuronas corticales y se ha estudiado bastante la fisiología de neuronas corticales, pero todavía no se sabe como en la CPF se procesa y regula la información en condiciones normales y patológicas (Miller, 2000).

Una comparación de los cerebros de distintas especies de mamíferos arroja numerosas diferencias estructurales y funcionales. Por ejemplo, el volumen del cerebro de los ratones es aproximadamente cien veces menor que en los monos macacos y mil veces menor que el de los humanos. Las homologías anatómicas y funcionales establecidas para diferentes regiones del cerebro de distintas especies han generado ciertas controversias que son materia de debates no totalmente saldados, particularmente en lo que concierne a la organización y función de la CPF de roedores y primates no humanos (dos modelos de estudio en fisiología altamente difundidos). Especialmente se encuentra en discusión la existencia en roedores de una región homóloga a la CPF dorsolateral de primates (Preuss, 1995; Ongur y Price, 2000; Uylings y col., 2003). La respuesta a estas cuestiones no es simple ya que los campos corticales de los roedores son menos evolucionados, diferenciados y segregados que los de primates. Brodman (1909), en un trabajo que sentó las bases de las divisiones citoarquitectónicas de la CPF encontró que los roedores, a diferencia de los primates, no poseen corteza frontal granular (ausencia de lámina IV). Al analizar esta diferencia anatómica definió la CPF como la corteza frontal granular, excluyendo a los roedores por poseer corteza frontal agranular. Sin embargo posteriormente realizó un análisis más pormenorizado involucrando diferentes características anatómicas y funcionales neuronales, como por ejemplo los patrones de conectividad, las propiedades electrofisiológicas, la distribución de neurotransmisores y sus receptores, el desarrollo embriológico y la citoarquitectura, encontrándose argumentos que apoyan una homología efectiva entre la CPF dorsolateral de primates y la CPF medial de roedores (Uylings y col., 2003). Uylings y colaboradores propusieron que la CPF de roedores y primates tiene un número suficiente de similitudes que avalan la utilización de los roedores como modelo de estudio de funciones de la CPF dorsolateral de primates. En roedores la CPF medial sería el sustrato neural de algunas funciones que en primates desempeña la CPF dorsolateral, como la memoria de trabajo. Esta área se subdivide en cinco regiones: el área frontal 2 (Fr2) ó área medial precentral (PrCm), la corteza cingulada 1 (Cg1) ó área cingulada dorsal anterior (ACd), la corteza cingulada 2 (Cg2) o área cingulada ventral anterior (ACv), el área prelímbica (PL) y el área infralímbica (IL) (la redundancia de nombres se debe a que distintos autores usan diferente nomenclatura para regiones equivalentes).

## CANALES IONICOS COMO DETERMINANTES DE LA ACTIVIDAD NEURONAL

Las neuronas son células especializadas en la transmisión de señales. En la corteza cerebral estas se disponen formando redes de comunicación neuronal y la actividad de la red dependerá en gran medida de la actividad eléctrica de las células individuales. Los mecanismos de generación y transmisión de señales en neuronas involucran proteínas integrales de membrana denominadas canales iónicos. Uno de los roles principales de los canales iónicos es controlar el flujo de iones a través de la membrana. La estructura de estas proteínas consta someramente de un dominio de activación que censa un estímulo específico (químico, eléctrico, mecánico, etc.) modulando alostéricamente a otro dominio estructural (que conforma un canal) en el que ocurre la permeación iónica. En otras palabras, el grado de activación del canal se manifiesta por cambios en las probabilidades de apertura y cierre del canal.

Existe una enorme variedad de canales iónicos. Estos fueron clasificados en familias que exhiben diferentes características (Hille, 2001). Debido a las diversas propiedades biofísicas mostradas por estos canales, a las amplias posibilidades de modulación de su actividad y a los distintos patrones de distribución subcelular, el repertorio de canales iónicos expresados en una célula dada configura las denominadas propiedades intrínsecas de una neurona. Estas son por ejemplo el potencial de reposo, el umbral de disparo, la resistencia de membrana, las constantes de tiempo, las características de los potenciales de acción, la presencia de pospotenciales, etc, y son propias de cada tipo neuronal. Todas ellas finalmente determinan patrones específicos de actividad y las propiedades excitables, y en definitiva moldean las propiedades fisiológicas neuronales (Connors, 1994). Otro mecanismo de control de la actividad neuronal es la maquinaria sináptica, de la que los canales iónicos también son un componente fundamental.

La actividad de los canales iónicos (*gating*) puede ser controlada por una gran cantidad de transmisores y mensajeros celulares. En algunos casos directamente (ej: canales activados por ligando) y en otros indirectamente a través de proteínas adaptadoras (receptores acoplados a proteínas G). Todas estas características le otorgan al sistema nervioso una dinámica de procesamiento que aún no se comprende completamente, en parte, por el desconocimiento de numerosos factores que controlan la excitabilidad neuronal y de su influencia en el procesamiento de señales. En este sentido

el estudio de las corrientes activadas por hiperpolarización desarrollado en esta tesis, es una contribución al estudio de las propiedades fisiológicas de las neuronas piramidales de la lámina V de la corteza prefrontal.

## CORRIENTES ACTIVADAS POR HIPERPOLARIZACIÓN

Se han descrito tres tipos de corrientes iónicas activadas por hiperpolarización (CAH), una de  $K^+$  mediada por canales Kir, otra de  $Cl^-$  mediada por canales CIC y una tercera catiónica mixta ( $Na^+$  y  $K^+$ ) llamada Ih. Todas producen una rectificación entrante o anómala con pulsos de voltaje hiperpolarizantes. El término rectificación significa cambio de la conductancia con el voltaje y es utilizado como una descripción empírica de las corrientes iónicas de membrana. Cuando el cambio de conductancia ocurre en el sentido hiperpolarizante se la llama rectificación entrante o anómala. Esta denominación se utilizó por primera vez para describir una mayor conductancia entrante que saliente de iones  $K^+$  en el músculo esquelético (Katz, 1949) que llamó rectificación anómala por ser opuesta a la rectificación saliente observada en los canales de  $K^+$  *delayed rectifier*. Actualmente se sabe que la rectificación anómala clásica descrita por Katz está mediada por canales de  $K^+$  tipo *inward rectifier* (Kir) que se expresan en numerosos tipos celulares y evolutivamente forman un subfamilia dentro de la superfamilia de canales de  $K^+$  (Doupnik y col., 1995). Estos canales son tratados en una sección aparte.

Los canales CIC que median corrientes de  $Cl^-$  forman una familia de la que se conocen varios miembros que responden a distintos estímulos pero los CIC-2 son activados por hiperpolarización. En mamíferos estos canales se expresan en una variedad importante de células no neuronales como músculo, epitelios y células gliales pero también en varios tipos neuronales como neuronas simpáticas (Clark y col., 1998), bastones de la retina (Enz y col., 1999), neuronas piramidales del hipocampo (Smith y col., 1995; Sik y col., 2000) y neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra (Sik y col., 2000). En corteza cerebral ha sido detectado mediante inmunohistoquímica (Smith y col., 1995) pero no hay evidencias funcionales. La activación de CIC tiene componentes lentos y rápidos y contribuiría a estabilizar el potencial de reposo hiperpolarizar el potencial de membrana (Hille, 2001).

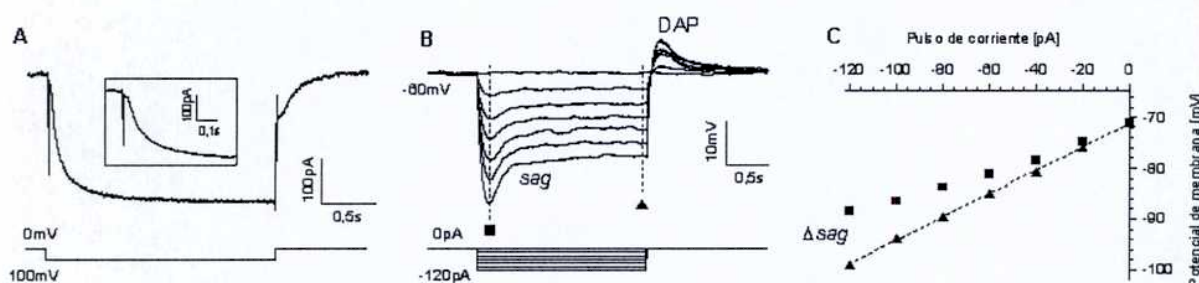
Ih se evidenció por primera vez en motoneuronas luego de un pulso de corriente hiperpolarizante sostenido donde se observó una despolarización de aparición lenta del potencial de membrana (Araki y col., 1961; Ito y Oshima, 1965) (figura 1B). Las

características de esta rectificación entrante se diferenciaban de la rectificación anómala clásica descrita por Katz en que presentaba una cinética de activación lenta y estaba mediada por dos iones,  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ . La corriente que la mediaba se describió a mediados de los 70' en células sinoatriales del corazón de conejo (Noma y Irisawa, 1976) y actualmente se la conoce como corriente catiónica activada por hiperpolarización (Ih). Tanto Ih como I<sub>kir</sub> (la corriente mediada por canales Kir) se expresan en muchos tipos diferentes de neuronas por lo tanto no es extraño que se hayan encontrado varios tipos celulares donde se coexpresan, como las neuronas de la amígdala basolateral (Womble y Moises, 1993), las neuronas piramidales CA1 de hipocampo (Gasparini y DiFrancesco, 1999) y las neuronas del área postrema (Funahashi y col., 2003). No obstante en algunas poblaciones de neuronas se las ha encontrado segregadas, como las motoneuronas hipoglosales (Bayliss y col., 1994), neuronas del núcleo motor dorsal del vago (Travagli y Gillis, 1994) y neuronas del núcleo trigeminal mesencefálico (Khakh y Henderson, 1998). También en la corteza cerebral se ha observado que en ciertas regiones las NPLV coexpresan Ih e I<sub>kir</sub> mientras otras no. En las NPLV de la corteza somatosensorial (Spain y col., 1987) y la corteza visual (Solomon y Nerbonne, 1993b) se ha encontrado Ih pero no I<sub>kir</sub>, mientras que en la corteza frontal se han encontrado evidencias de que las neuronas piramidales expresan ambas corrientes (Tanaka y col., 1991). La expresión diferencial de corrientes activadas por hiperpolarización en NPLV de distintas regiones de la corteza cerebral indica que neuronas aparentemente homólogas poseen conductancias intrínsecas diferentes que pueden conferirles capacidades de procesamiento específicas de cada región.

### **Características generales de Ih**

Como se mencionó anteriormente Ih se activa por hiperpolarizaciones del potencial de membrana respecto del reposo produciendo una corriente catiónica entrante de activación lenta que no presenta inactivación (figura 1A). Su particular mecanismo se hace evidente, en registros del potencial de membrana, como una despolarización lenta llamada *sag* (figura 1B). Este fenómeno de *sag* (del inglés: comba) es una marca distintiva de las células que poseen Ih y determina un comportamiento no óhmico de la relación voltaje-corriente (V-I) en el sentido hiperpolarizante es decir una rectificación anómala (figura 1C).

Se ha descrito que  $I_h$  participa en diversas funciones fisiológicas en varios tipos de células. Por ejemplo, en bastones fotorreceptores de retina se encontró, que  $I_h$  está involucrada en la recuperación de la hiperpolarización inducida por la luz y es sensible a  $\text{Cs}^+$  extracelular (Fain y col., 1978; Bader y col., 1979). En fibras de Purkinje cardíacas se encontró una corriente con las mismas características a la que se denominó  $I_f$  por *funny current*. En el corazón  $I_f$  determina oscilaciones espontáneas del potencial de membrana junto con la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  "t" (Brown y DiFrancesco, 1980; DiFrancesco, 1981) contribuyendo a la generación del ritmo cardíaco. Actualmente se conoce vulgarmente a la corriente catiónica activada por hiperpolarización como  $I_h$  o  $I_f$ , según se encuentre en el sistema nervioso o en el corazón, respectivamente y por el importante rol que cumple en la determinación del ritmo de disparo de espigas en células del corazón y en algunas neuronas oscilantes también se las denominó corrientes marcapasos (*pacemaker*).



**Figura 1: la corriente catiónica activada por hiperpolarización ( $I_h$ ) y su efecto sobre el potencial de membrana.** **A**, corriente evocada por un pulso de voltaje hiperpolarizante de  $-50\text{mV}$  a  $-100\text{mV}$ . Recuadro: ampliación del inicio de corriente donde se observa un retraso que le da la forma sigmoidea característica. **B**, cambios del potencial de membrana superpuestos (arriba) en respuesta a una serie de pulsos hiperpolarizantes de  $0\text{pA}$  a  $-120\text{pA}$  (abajo). La repolarización durante el pulso de corriente (*sag*) es característica de la activación de  $I_h$ . **C**, relación voltaje-corriente ( $V-I$ ) calculada a los tiempos indicados en B en el mínimo del potencial (■) y en el estado estacionario luego del *sag* (▲). Se aprecia la desviación de la linealidad que denota una rectificación entrante o anómala. [registros obtenidos de una neurona piramidal de la lámina V durante este trabajo]

La primera descripción de una corriente tipo  $I_h$  en el sistema nervioso central se realizó en las células CA1 de hipocampo donde se la denominó  $I_q$ , por *queer current* (del inglés: corriente rara) (Halliwell y Adams, 1982). Tiempo después se demostró que  $I_h$  está involucrada en la actividad rítmica de neuronas tálamo-corticales (McCormick y Pape, 1990a) y controla la actividad oscilatoria espontánea en neuronas de la oliva

inferior e interneuronas hipocampales (Maccaferri y McBain, 1996; Bal y McCormick, 1997).

Pero  $I_h$  también se encuentra en muchas otras células que no generan oscilaciones rítmicas y allí su función no es tan clara. Las primeras descripciones de  $I_h$  en neuronas ya mostraron que esta corriente participa en el mantenimiento del potencial de reposo evitando hiperpolarizaciones excesivas, e incluso puede llevar el potencial de membrana a valores cercanos al umbral de disparo. A fines de los 90', luego del perfeccionamiento de técnicas electrofisiológicas que posibilitaron la realización de registros en dendritas, se encontró la importancia que  $I_h$  tiene en algunas neuronas para las propiedades intrínsecas dendríticas. En neuronas piramidales del hipocampo se vio que la densidad de canales  $I_h$  aumenta varias veces a medida que la dendrita apical se aleja del soma (Magee, 1998). Este gradiente de expresión de los canales que median  $I_h$  permite a las neuronas compensar el efecto del filtrado dendrítico sobre los potenciales postsinápticos excitatorios, cambiando significativamente las propiedades integradoras de estas neuronas respecto de lo predicho por los modelos pasivos (Magee, 1999). En los últimos años también se propuso la participación de  $I_h$  en fenómenos de plasticidad sináptica en hipocampo, aunque esto es aún hoy motivo de controversia (Chevalleyre y Castillo, 2002; Mellor y col., 2002).

Una de las características más importantes de  $I_h$  es su regulación por nucleótidos cíclicos (DiFrancesco y Tortora, 1991). Se ha demostrado que la unión de AMPc al canal de  $I_h$  facilita su activación por voltaje y que en varios tipos de neuronas los neurotransmisores que cambian los niveles intracelulares de AMPc pueden regular la actividad de  $I_h$  (Pape y McCormick, 1989; Gasparini y DiFrancesco, 1999).

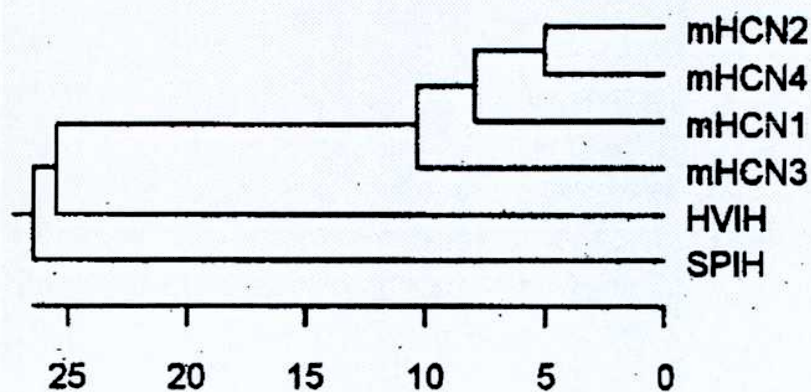
Por último cabe destacar que hubo varios factores que limitaron el estudio  $I_h$  hasta mediados de la década del 90'; siendo uno de los más importantes la falta de bloqueantes selectivos. Hasta la aparición de nuevos bloqueantes orgánicos la característica farmacológica de  $I_h$  era su sensibilidad al  $Cs^+$  extracelular, sin embargo este ión también bloquea canales de  $K^+$  (Hille, 2001). Otro factor que reinstaló el estudio de una corriente descrita hace 30 años fue el clonado de los canales que median  $I_h$ . Recientemente se encontró una familia de genes que codifican canales catiónicos activados por hiperpolarización y nucleótidos cíclicos llamados HCN, con las características generales de  $I_h$  (Santoro y col., 1998). Recientemente, en neuronas CA1 de hipocampo, se realizó una identificación de eventos de canal único mediados por canales de características compatibles con los que median  $I_h$ . Estos estudios arrojaron



para estos canales valores de conductancia de 10pS (Simeone y col., 2005), 10 veces mayor a lo observado en los primeros registros realizado en células sinoatriales cardíacas (DiFrancesco y Tortora, 1991). Ambos estudios confirmaron la sensibilidad al AMPc y a bloqueantes.

### Estructura de los canales HCN

Hasta el momento se identificaron cuatro genes que codifican para canales iónicos que median  $I_h$  en mamíferos denominados HCN (del inglés: *hyperpolarization-activated cyclic nucleotide gated*) (Santoro y col., 1997; Ludwig y col., 1998; Santoro y col., 1998). Cada gen codifica para una proteína transmembranal que por su secuencia de aminoácidos se determinó que formaban una nueva familia de canales iónicos perteneciente a la superfamilia de canales de  $K^+$ . También se identificaron genes relacionados en esperma de erizo de mar (spHCN) y en antena de insectos (hvHCN). En la figura 2 se muestran las relaciones filogenéticas de los genes HCN secuenciados hasta el momento. El nematodo *Caenorhabditis elegans* aparentemente carece de estos genes.

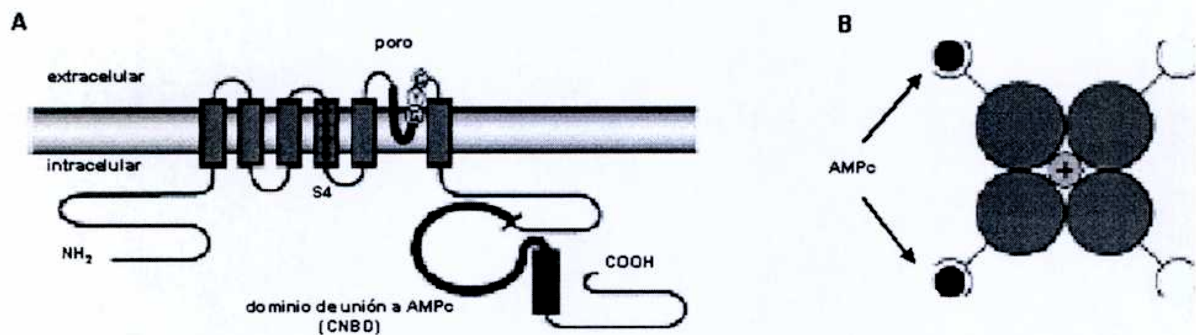


**Figura 2: Relación evolutiva de las subunidades HCN.** Árbol filogenético obtenido de la secuencia de aminoácidos de las de las isoformas conocidas de subunidades HCN de mamíferos (mHCN1-4), de la proteína de insectos (HVIH o hvHCN) y la de erizo de mar (SPIH o spHCN). [tomado de Santoro y Tibbs 1999]

Cada subunidad de los canales HCN tiene una estructura de 6 hélices transmembrana con un segmento cargado positivamente que actúa como sensor de voltaje (S4), y una región P formando el poro del canal con la secuencia aminoacídica

GYG característica de la superfamilia de canales de  $K^+$  dependientes de voltaje (figura 3A). Sin embargo, en la región del poro lindante a GYG la secuencia de los canales HCN diverge del resto de los miembros de la familia, lo que explicaría su permeabilidad a ambos iones ( $Na^+$  y  $K^+$ ). Además poseen un dominio intracitoplasmático de unión a nucleótidos cíclicos (CNBD) homólogo al de otras proteínas que unen nucleótidos cíclicos como las proteínas quinasas A y C (PKA y PKC), y los canales iónicos activados por nucleótidos cíclicos (CNG) de fotorreceptores y neuronas olfatorias. Los CNG también pertenecen a la superfamilia de canales de  $K^+$  pero a diferencia de los HCN son insensibles al voltaje y solo se activan por nucleótidos cíclicos.

Las cuatro subunidades (HCN1-4) se han expresado en sistemas heterólogos y forman canales homoméricos funcionales (Ludwig y col., 1998; Santoro y col., 1998) (Moosmang y col., 2001). Todas las subunidades se activan por hiperpolarización y producen corriente catiónicas de  $Na^+/K^+$  modulables por AMPc. Sin embargo mediante la expresión de cada subunidad por separado se recuperan canales con importantes diferencias en la cinética, la dependencia del voltaje y la sensibilidad a AMPc. Notoriamente, la isoforma HCN1 posee una cinética varias veces más rápida y una baja sensibilidad al AMPc comparado con las otras tres (Santoro y col., 2000; Chen y col., 2001).



**Figura 3: esquema de una subunidad HCN y su ensamblado para formar un canal.** A, topología de una subunidad HCN genérica donde se muestra el dominio de unión a nucleótidos cíclicos (CNBD) del lado intracelular, el poro con los residuos distintivos de canales de  $K^+$  (GYG) y el segmento sensor de voltaje S4. B, esquema del supuesto ensamblado tetramérico de subunidades formando un canal. [tomado de Robinson y Siegelbaum 2003]

Se cree que los canales HCN, al igual que el resto de los miembros de la superfamilia de canales de  $K^+$  dependientes del voltaje, se ensamblarían en tetrámeros.

La co-expresión de canales HCN1 y HCN2 resulta en la generación de una Ih con características intermedias a las observadas expresando las mismas subunidades por separado. Estas propiedades intermedias no se explican por la suma lineal de cada una de las subpoblaciones de subunidades, lo que sugiere la formación de nuevos canales heterométricos (Chen y col., 2001; Ulens y Tytgat, 2001a). Las propiedades de los canales HCN1/2 son muy similares a las registradas en células piramidales CA1 de hipocampo donde normalmente se expresan ambas subunidades. Sin embargo la estequiometría de los canales nativos es algo que se desconoce hasta el momento.

Existen evidencias de que HCN1 y HCN2 interactúan con proteínas accesorias. Por ejemplo, MiRP (*Mink related protein* o KCNE) es una proteína de un solo segmento transmembrana que interactúa con HCN2 y algunos canales de K<sup>+</sup> (Lewis y col., 2004) cambiando propiedades y niveles de expresión. Cuando HCN1 y HCN2 fueron coexpresados con MiRP1 aumentó su expresión y la cinética de activación se hizo más rápida (Yu y col., 2001; Qu y col., 2004). Ambas proteínas también se expresan en células sinoatriales del corazón (Yu y col., 2001) sugiriendo que MiRP1 podría ser una subunidad β de los canales HCN. Sin embargo, más allá de lo observado en sistemas de expresión heterólogos, no hay evidencias de que la interacción de ambas proteínas tenga relevancia fisiológica para la actividad de los canales HCN.

### **Localización de los canales HCN**

Las cuatro isoformas de canales HCN se expresan en el sistema nervioso central de mamíferos y presentan diferentes abundancias relativas según la región. Se detectó una importante marcación con anticuerpos anti-HCN1 en neuronas piramidales de corteza e hipocampo, con mayor intensidad en la dendrita apical lejana (Santoro y col., 1997). Recientemente se estudió la inmunoreactividad de las cuatro subunidades en cerebro de rata (Notomi y Shigemoto, 2004) y se confirmó que era igual a los patrones de expresión de los ARN mensajeros descritos previamente (Moosmang y col., 1999; Santoro y col., 2000). La expresión de HCN1 está principalmente restringida a neocorteza, hipocampo, colículo superior, área postrema, núcleo coclear y cerebelo. HCN2 tiene una distribución más amplia en el sistema nervioso central y presenta una importante superposición con HCN1. Mediante técnicas de inmunomarcación doble con oro se encontró que HCN1 y HCN2 colocalizan en dendritas lejanas de las neuronas piramidales de la lámina V en la neocorteza, marcando intensamente las ramificaciones de la dendrita apical en la lámina

I, y en las dendritas apicales de las neuronas CA1 del hipocampo. Esto confirma una distribución intracelular asimétrica con alta densidad de canales HCN1 y HCN2 en la dendrita apical (Lorincz y col., 2002; Notomi y Shigemoto, 2004), sugiriendo que estas subunidades formarían canales heteroméricos *in vivo*. La expresión de HCN3 en cerebro estaría restringida a regiones subcorticales como hipotálamo, bulbo olfatorio, núcleos del rafe, caudado-putamen y otros, generalmente con baja intensidad. HCN4 también tiene una distribución subcortical con marca en el tálamo, la sustancia nigra y otras regiones. Estas distribuciones sugieren que HCN1 solo coexpresa con HCN2 y es complementaria a la expresión de HCN3 y HCN4.

Es interesante destacar que en células CA1 de hipocampo y piramidales de corteza donde se expresan HCN1 y HCN2,  $I_h$  tiene una activación rápida (Maccaferri y col., 1993; Berger y col., 2001), mientras que en el células relevo del tálamo donde se expresa predominantemente la subunidad HCN4 con HCN2,  $I_h$  tiene una activación sensiblemente más lenta (McCormick y Pape, 1990b). De hecho está descrita una fuerte asociación entre la expresión de ARNm de HCN1 en células piramidales de corteza e hipocampo con una constante de activación del  $\sim 100$ ms, y la ausencia del ARNm de esta subunidad en neuronas dopaminérgicas del cerebro medio y talamocorticales que tienen constantes más lentas (Franz y col., 2000; Santoro y col., 2000). Esto sugiere que la heterogeneidad funcional de  $I_h$  se explicaría en parte con la expresión diferencial de subunidades HCN.

## **Propiedades biofísicas de $I_h$**

### *Cinética*

$I_h$  comienza a activarse a potenciales de membrana entre  $-50$  y  $-70$ mV. La velocidad de activación y la amplitud aumentan con el grado de la hiperpolarización necesitando desde algunos cientos de milisegundos hasta varios segundos para llegar su activación máxima.  $I_h$  no presenta inactivación, por lo que mantiene niveles constantes de amplitud durante la duración del estímulo. La activación de  $I_h$  es compleja, tiene un retraso de unos pocos milisegundos y luego se desarrolla lentamente hasta el estado estacionario dando una cinética de activación de curso temporal sigmoideo característica (ver recuadro en figura 1A). Este retraso en la activación es dependiente del tiempo, haciéndose menor con pulsos más hiperpolarizantes. Luego del retraso, la activación se

Ih se ajusta bien a una o dos ecuaciones exponenciales, dependiendo del tipo celular (Santoro y Tibbs, 1999). Como se mencionó arriba las constantes de tiempo varían acorde a las subunidades expresadas en cada tipo celular. En células relevo del tálamo que expresan HCN4 puede tomar varios segundos llegar al estado estacionario mientras que en hipocampo o corteza cerebral que expresan HCN1 las constantes de tiempo van de decenas hasta cientos de milisegundos (Santoro y col., 2000). En las células en que la activación de Ih ajusta a dos exponenciales la constante rápida está en el orden de las decenas a cientos de milisegundos y la lenta va de cientos de milisegundos a segundos (Solomon y Nerbonne, 1993a). Normalmente las constantes de tiempo son fuertemente dependientes del voltaje y de la temperatura. Mientras que a temperatura ambiente la constante de activación es de unos 270ms para un voltaje cercano al  $V_{50}$ , a 35°C se acelera a 100ms. Para un pulso de voltaje más hiperpolarizado (-150mV) Ih llega a activarse en menos de 20ms (Magee, 1998; Williams y Stuart, 2000).

La deactivación de Ih se manifiesta como una corriente saliente que se relaja lentamente al finalizar el pulso hiperpolarizante (figura 1A). La cinética de las corrientes de cola es más difícil de caracterizar debido a que son más susceptibles a la contaminación con otras corrientes. Sin embargo, se encontró que la deactivación de Ih ajustó bien a una exponencial simple y que también dependen del voltaje ya que a mayores despolarizaciones la deactivación de estas corrientes es más rápida (Bayliss y col., 1994; Williams y Stuart, 2000).

Hasta ahora se habló de Ih como una corriente cuya activación depende del voltaje y del tiempo. Sin embargo, en sistemas de expresión heterólogos se ha observado que el canal HCN2 recombinante también mediaría una corriente instantánea e independiente del voltaje, además del componente lento y dependiente del voltaje (Proenza y col., 2002). La presencia de este componente instantáneo, que revierte al mismo potencial que Ih y es sensible al bloqueante selectivo ZD7288 (Proenza y Yellen, 2006), estaría regulada por la subunidad accesoria MiRP1 cuando se sobreexpresa junto con HCN2 en células CHO (Proenza y col., 2002), pero no cuando ambas proteínas se sobreexpresan en otros sistemas como ovocitos de *Xenopus* o miocitos (Yu y col., 2001; Qu y col., 2004). En estas dos últimas células la expresión MiRP1 no modifica el componente instantáneo, sino que aumenta la velocidad de activación del HCN1 o HCN2, por lo tanto el componente instantáneo podría ser muy dependiente del tipo celular. Existen evidencias de la existencia de un componente instantáneo importante en células sinoatriales del corazón (Hagiwara y col., 1992) donde también se expresa la

subunidad HCN2 y MiRP1. En sistema nervioso hay evidencias de la expresión proteínas MiRP y su interacción con canales de  $K^+$  (McCrossan y Abbott, 2004), pero hasta ahora no hay reportes que avalen su interacción con subunidades HCN neuronales, ni la existencia de un componente instantáneo en neuronas.

### *Dependencia del voltaje*

La dependencia del voltaje de  $I_h$  se puede evaluar a través de la relación corriente-voltaje de las corrientes de cola. Las curvas de activación de  $I_h$  obtenidas de esta forma generalmente son sigmoideas y ajustan a una ecuación de Boltzman. De esta manera se obtiene el voltaje al cual se activa el 50% de los canales ( $V_{50}$ ) y la pendiente ( $m$ ) que indica cuan pronunciada es la dependencia del voltaje. Los valores de ambos parámetros son bastantes variables entre células. El  $V_{50}$  normalmente oscila entre -75 y -95mV, aunque hay casos más extremos. La pendiente de la curva obtenida en distintas células oscila entre 4 y 13, lo que indica una importante dependencia del voltaje comparable con la de los canales activados por despolarización, es decir que pequeños cambios en la polarización de la membrana activan una cantidad significativa de canales. De las curvas de activación también se desprende que usualmente  $I_h$  comienza a activarse entre -45 y -60mV y tiene su conductancia máxima a potenciales de -110mV o más negativos (Pape, 1996; Santoro y Tibbs, 1999).

Se ha visto que al igual que los canales activados por despolarización, los canales HCN tienen también un segmento transmembrana cargado positivamente que correspondería al sensor de voltaje. Este segmento es la única región del canal que cuenta con la carga suficiente para determinar la dependencia del voltaje que presentan estos canales. Esto abrió un interrogante acerca del mecanismo responsable de activación de los HCN. El movimiento del segmento S4 en los HCN durante la hiperpolarización es similar al observado en canales de  $K^+$ , ya que este segmento sería accesible del lado extracelular con despolarización y del lado intracelular con hiperpolarización (Mannikko y col., 2002; Vemana y col., 2004). La diferencia en el mecanismo de activación entre canales HCN y  $K^+$  estaría dada por un nuevo mecanismo de acoplamiento entre el sensor de voltaje y la compuerta (Bell y col., 2004) que todavía no fue dilucidado. Al igual que en los canales de  $K^+$  dependientes de voltaje se mostró que la compuerta está orientada hacia el compartimiento intracelular (Shin y col., 2001).

## *Naturaleza iónica*

Los canales HCN permiten el paso tanto de iones  $\text{Na}^+$  como  $\text{K}^+$ , sin embargo esto no implica una falta de selectividad ya que por ejemplo el  $\text{Li}^+$ , un ión muy similar al  $\text{Na}^+$  que no es discriminado por los clásicos canales de  $\text{Na}^+$ , no es capaz de permear por los HCN. La permeabilidad relativa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  es 0,2-0,4 lo que determina un potencial de reversión entre -50 y -20mV, positivo respecto del potencial de reposo de la mayoría de las células (Pape, 1996). Por este motivo la activación de  $I_h$  genera una corriente entrante llevada principalmente por iones  $\text{Na}^+$  que despolariza el potencial de membrana. Los cambios en la concentración de cualquiera de los iones permeantes afecta fuertemente la  $I_h$ . La disminución en la cantidad de  $\text{Na}^+$  extracelular reduce su amplitud según lo esperado por el cambio en potencial de reversión (Spain y col., 1987). Por otro lado, los cambios de la concentración de  $\text{K}^+$  extracelular afectan  $I_h$  de una forma que no se explican solamente por un corrimiento del potencial de reversión. Una leve reducción de la concentración de  $\text{K}^+$  extracelular inhibe drásticamente la amplitud de  $I_h$ . Contrariamente, un incremento del  $\text{K}^+$  extracelular induce un aumento desmesurado de  $I_h$ . Este efecto fue probado en neuronas de la corteza visual de rata donde un aumento del  $\text{K}^+$  extracelular de 1mM produce un aumento del 20% en la conductancia de  $I_h$  (Solomon y Nerbonne, 1993b). En el rango de potenciales de membrana fisiológicos el  $\text{Na}^+$  es necesario siendo el ión que transporta la carga entrante, mientras que el  $\text{K}^+$  se requiere para que el canal conduzca y ejercería un efecto regulatorio (Pape, 1996). Los canales  $I_h$  tendrían en el exterior del poro un sitio de alta afinidad para los iones permeantes y un sitio regulatorio para el  $\text{K}^+$ . En bastones fotorreceptores de salamandra, mediante el análisis del bloqueo ejercido por varios iones, se determinó que  $I_h$  poseería al menos tres sitios de unión a iones uno de alta afinidad para  $\text{Na}^+$  y dos de alta afinidad para  $\text{K}^+$  (Wollmuth, 1995), uno de los cuales sería el sitio regulatorio del  $\text{K}^+$ . Se postuló que la alta sensibilidad de los canales  $I_h$  al  $\text{K}^+$  extracelular puede ser un mecanismo de regulación en condiciones donde este ión cambie su concentración, como la isquemia o la actividad epiléptica, cuando se incrementa notablemente la concentración de  $\text{K}^+$  (Robinson y Siegelbaum, 2003).

Los iones  $\text{Cl}^-$  no participan de la conducción de  $I_h$ , sin embargo son necesarios como reguladores positivos. En motoneuronas se observó que una reducción del  $\text{Cl}^-$  extracelular cambiaba la curva de activación levemente hacia la izquierda, lo contrario de lo esperado para un corrimiento del potencial de reversión del  $\text{Cl}^-$ . Cuando el  $\text{Cl}^-$  fue

reemplazado por otro contraíón  $I_h$  se inhibió reversiblemente (Takahashi, 1990). Los canales HCN son los únicos canales que permean  $Na^+$  y  $K^+$  cuya conducción depende de la presencia de  $Cl^-$  extracelular. Es posible que el  $Cl^-$  tenga un rol en la estabilización de los cationes que permean el canal (Pape, 1996).

### *Bloqueantes*

La caracterización de  $I_h$  muchas veces se vio dificultada porque su rango de activación se superpone con el de otras corrientes iónicas, de tal manera que los bloqueantes han sido una herramienta muy importante para estudiar esta corriente. Las principales corrientes que dificultan el estudio de  $I_h$  son la corriente de sodio persistente ( $I_{Nap}$ ) que se activa con despolarización subumbral, las corrientes de  $K^+$  tipo A y tipo M ( $I_M$ ), que se activan por despolarización leve del reposo, las corrientes de  $Cl^-$  activadas por hiperpolarización y  $I_{kir}$  que se activa cerca del potencial de reversión del  $K^+$ .  $I_h$  ha sido distinguida de estas corrientes por su alta sensibilidad a  $Cs^+$  externo (1-5mM), pero este catión inorgánico también bloquea  $I_{kir}$  y canales de  $K^+$  tipo *delayed rectifier* (Hille, 2001). Sin embargo  $I_h$  es relativamente insensible al  $Ba^{2+}$ , bloqueante de canales de  $K^+$  que a bajas concentraciones (en el orden micromolar) inhibe selectivamente a los canales  $K_{ir}$  y a los canales de  $K^+$  que median una corriente de fuga independiente del voltaje ( $K_{leak}$  o KCNK) (Coetzee y col., 1999). Sin embargo el  $Ba^{2+}$  a concentraciones mayores (del orden milimolar) también puede tener un efecto inhibitorio sobre  $I_h$  (van Welie y col., 2005). Durante largo tiempo  $Cs^+$  y  $Ba^{2+}$  fueron las únicas herramientas farmacológicas para discriminar  $I_h$  e  $I_{kir}$  y evaluar el rol fisiológico de  $I_h$  en varios tipos de células (Pape, 1996).

Más recientemente se han encontrado compuestos orgánicos con actividad bradicárdica que bloquean selectivamente  $I_h$ . Ellos son el ZD7288 (4-(N-etil-N-fenilamino)-1,2-dimetil-6-(metilamino) piridin cloruro) (BoSmith y col., 1993), el UL-FS49 o zetebadina (DiFrancesco, 1994) y el S-16257 o ivabradina (Bois y col., 1996), siendo el ZD7288 el más utilizado en sistema nervioso (Harris y col., 1994; Pape, 1994; Gasparini y DiFrancesco, 1997). El ZD7288 es un bloqueante irreversible de acción relativamente lenta. El tiempo de bloqueo depende de la concentración, pero usualmente son necesarios más de 10min de aplicación para alcanzar el efecto máximo. Es un bloqueante que requiere del canal abierto y tendría efecto sobre la región interna del poro del canal. El bloqueo es dependiente del voltaje, desfavoreciendo su efecto la



hiperpolarización fuerte (Shin y col., 2001). El ZD7288 es utilizado en concentraciones de 1 a 100 $\mu$ M con IC<sub>50</sub> en el rango micromolar bajo. En células CA1 de hipocampo se reportó una IC<sub>50</sub> de 10 $\mu$ M (Gasparini y DiFrancesco, 1997). Sin embargo existe controversia sobre su selectividad ya que se describió que el ZD7288 afectaría la transmisión sináptica de forma independiente de Ih (Chevalleyre y Castillo, 2002).

Ih es insensible a la aplicación extracelular de tetrodotoxina (TTX), que bloquea canales de Na<sup>+</sup> y de tetraetilamonio (TEA) y 4-aminopiridina (4-AP), bloqueantes de canales de K<sup>+</sup>. Sin embargo el TEA tiene un efecto inhibitorio sobre Ih cuando es aplicado intracelularmente (Budde y col., 1994). Está ampliamente probado que iones divalentes como el Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> y Co<sup>2+</sup> no bloquean Ih (Pape, 1996) con excepción del Sr<sup>2+</sup> (Ono y col., 1994). Algunos anestésicos volátiles y locales también inhiben Ih. El halotano corre la curva de activación hacia la izquierda y reduce la amplitud máxima de Ih en motoneuronas (Sirois y col., 1998). El QX314, un derivado de la lidocaína que es utilizado intracelularmente para inhibir canales de Na<sup>+</sup>, bloquea Ih en todo el rango de activación en células CA1 de hipocampo (Perkins y Wong, 1995).

### **Regulación de Ih por nucleótidos cíclicos**

El AMPc se une a los canales HCN aumentando la dependencia de voltaje a través de un corrimiento de la curva de activación de Ih a valores más positivos y en forma independiente de fosforilación (DiFrancesco y Tortora, 1991) (Pedarzani y Storm, 1995). Esto hace que para un determinado estímulo hiperpolarizante la activación máxima de Ih ocurra más rápidamente en presencia de AMPc. Este mecanismo provee un modo en que Ih puede ser regulada por neurotransmisores que estimulen o inhiban a la adenilato ciclasa. El AMPc se une al canal HCN en un lazo intracitoplasmático del carboxilo terminal de 120 aminoácidos llamado dominio de unión a nucleótidos cíclicos (CNBD). En experimentos con canales HCN mutantes expresados en ovocitos donde el CNBD fue deletado, se determinó que el dominio CNBD ejerce una inhibición constitutiva que puede ser removida por la unión del AMPc. Los canales mutantes que no poseen CNBD son insensibles al AMPc y tienen la curva de activación corrida hacia la derecha mimetizando concentraciones saturantes de AMPc. Entonces las diferencias de sensibilidad al AMPc observadas entre las subunidades HCN1 y HCN2 estarían determinadas por el grado de inhibición que el CNBD ejerce en forma constitutiva a cada

canal (Wainger y col., 2001). Los canales HCN1 homoméricos expresados en sistemas heterólogos son poco sensibles al AMPc, mostrando un corrimiento de la curva de activación de aproximadamente 5mV hacia la derecha, mientras los HCN2 son más sensibles ya que su curva de activación se corre unos 20mV. Al coexpresarlos se vio una regulación intermedia que no se corresponde con la suma lineal de los efectos observados en cada subunidad por separado (Chen y col., 2001).

En distintos tipos de neuronas se ha observado una modulación de  $I_h$  inducida por neurotransmisores que regulan los niveles citoplasmáticos de AMPc. Por ejemplo en neuronas talámicas, tanto la activación de receptores  $\beta$ -adrenérgicos con noradrenalina, como la aplicación de serotonina, lleva a un aumento en la activación de  $I_h$  (McCormick y Pape, 1990a), mientras que la activación de receptores GABA<sub>B</sub> lleva a una disminución (Frere y Luthi, 2004). En neuronas CA1 de hipocampo se observó que la serotonina corrió la activación de  $I_h$  hacia la derecha facilitando la activación (Gasparini y DiFrancesco, 1999) a través de receptores 5-HT<sub>4</sub> y 5-HT<sub>7</sub>, pero cuando se activaron los 5-HT<sub>1A</sub> se observó una inhibición de  $I_h$  (Bickmeyer y col., 2002). En neuronas piramidales de la corteza cerebral la serotonina induce un modesto aumento de  $I_h$  a través de receptores 5-HT<sub>2A</sub> pero solo entre los 5 y 15 días postnatales posiblemente debido a una disminución en la expresión de ese receptor en el desarrollo (Zhang, 2003).  $I_h$  también puede ser regulada por la unión de GMPc, aunque la afinidad es un orden de magnitud menor que la del AMPc (DiFrancesco y Tortora, 1991). Existen evidencias de que el óxido nítrico, que estimula la guanilato ciclasa, regula  $I_h$  en neuronas talamocorticales (Pape y Mager, 1992). Los análogos del AMPc como el 8Br-AMPc son potentes activadores de  $I_h$ . En neuronas talamocorticales se mostró que 10 $\mu$ M de 8Br-AMPc tienen el mismo efecto que 1mM de AMPc aplicado intracelularmente corriendo la curva de activación 12mV hacia la derecha (Luthi y McCormick, 1999).

Si bien abundan ejemplos de receptores acoplados a proteínas G que regulan  $I_h$  en varios tipos de neuronas, son pocos los que reportaron algún efecto sobre  $I_h$  en el caso de las neuronas piramidales de corteza cerebral (Spain, 1994; Zhang, 2003).

## **Roles fisiológicos de I<sub>h</sub>**

Actualmente se sabe que I<sub>h</sub> está involucrada en cinco funciones generales que se desarrollan a continuación:

- regulación de la actividad de disparo rítmico
- contribución al potencial de reposo
- participación de las propiedades de disparo y la excitabilidad
- control de la integración sináptica
- participación en fenómenos de plasticidad sináptica.

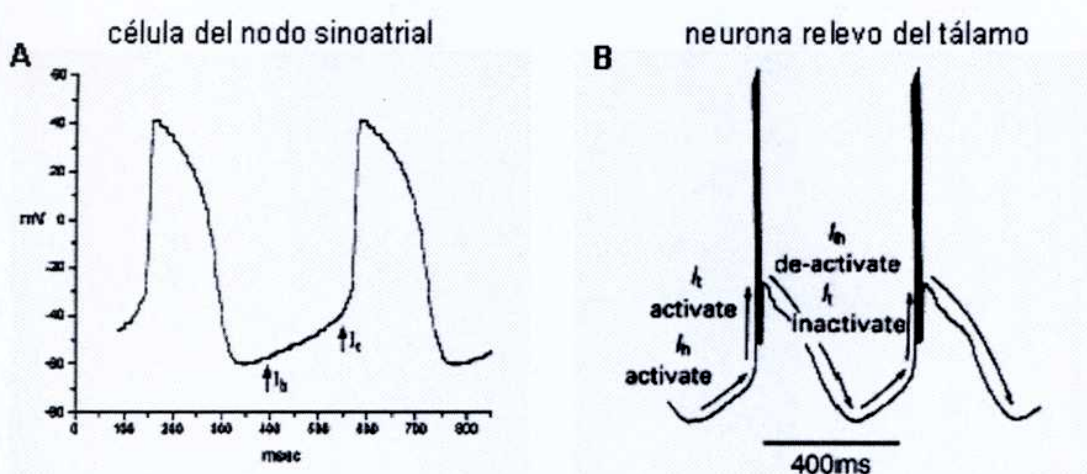
### *Regulación de la actividad de disparo rítmico*

El control de la actividad rítmica es sin duda el rol más conocido por ser la corriente marcapasos en las fibras de Purkinje cardíacas y las neuronas talamocorticales. En ambos casos I<sub>h</sub> actúa en conjunto con corrientes de Ca<sup>2+</sup> “t” para determinar la frecuencia de disparo de potenciales de acción. Durante la fase de repolarización de los potenciales de acción ocurre una hiperpolarización (AHP) que activa I<sub>h</sub>, que lentamente repolariza el potencial de membrana hasta alcanzar nuevamente el umbral de los canales de Ca<sup>2+</sup> generando una mayor despolarización que inicia un nuevo ciclo de potenciales de acción (figura 4).

Aunque I<sub>h</sub> no controla todo el mecanismo de ritmogénesis, contribuye a la AHP y despolarización subsiguiente determinando el potencial de membrana alrededor del cual fluctúa la célula (McCormick y Pape, 1990a). En el corazón la acción de la noradrenalina o la acetilcolina sobre I<sub>h</sub> pueden acelerar o reducir el ritmo cardíaco (DiFrancesco, 1993). En neuronas talamocorticales I<sub>h</sub> puede ser regulada por noradrenalina y serotonina, pero existen mecanismos adicionales que también controlan el ritmo de disparo de estas neuronas (Pape, 1996).

I<sub>h</sub> también regula el ritmo de disparo en diferentes neuronas que tienen actividad espontánea, como las neuronas de la oliva inferior del tallo encefálico (Bal y McCormick, 1997), las interneuronas del *stratum oriens* del hipocampo (Maccaferri y McBain, 1996) y las neuronas gabaérgicas del globo pálido (Chan y col., 2004). Sin embargo hay otras neuronas con actividad espontánea donde I<sub>h</sub> no contribuye significativamente al control de la actividad de disparo rítmica, como en las neuronas del

núcleo respiratorio del tallo encefálico que controlan el ritmo respiratorio (Mironov y col., 2000) o las neuronas cerebelares del Purkinje (Raman y Bean, 1999).



**Figura 4: rol de I<sub>h</sub> como corriente marcapaso.** A, potenciales de acción de Ca<sup>2+</sup> en un miocito del nodo sinoatrial del corazón. B, potenciales de acción Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> en una neurona relevo talámica. En ambos casos la activación de I<sub>h</sub> durante la fase de hiperpolarización produce una despolarización que activa canales de Ca<sup>2+</sup> (I<sub>t</sub>) que llevan a disparar los potenciales de acción. Durante el potencial de acción I<sub>h</sub> se deactiva y la corriente de Ca<sup>2+</sup> (I<sub>t</sub>) se inactiva produciendo una hiperpolarización que reinicia el ciclo. [tomado de Robinson y Siegelbaum 2003]

### Control del potencial de reposo

I<sub>h</sub> puede contribuir activamente al mantenimiento del potencial de reposo ya que generalmente el rango activación de I<sub>h</sub> se superpone con el del potenciales de reposo en la mayoría de las células (-50mV a -70mV). En distintas preparaciones, el uso de bloqueantes como Cs<sup>+</sup> o agentes bradicárdicos selectivos indujo hiperpolarización y aumento de la resistencia de entrada sugiriendo que la activación parcial pero constante de I<sub>h</sub> mantiene el potencial de reposo en valores más despolarizados (Spain y col., 1987; McCormick y Pape, 1990b; Maccaferri y col., 1993; Pape, 1994; Travagli y Gillis, 1994; Zidichouski y Jhamandas, 1999; Funahashi y col., 2003; Doan y col., 2004). I<sub>h</sub> también puede activarse frente a estímulos hiperpolarizantes pronunciados, como los que se observan luego de ráfagas de potenciales postsinápticos inhibitorios, llevando el potencial de membrana a valores más positivos.

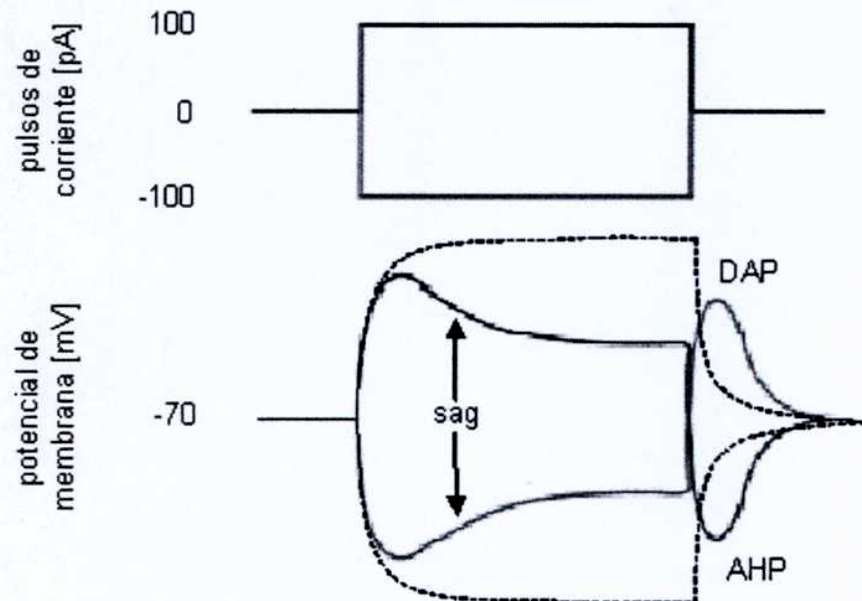
## *Regulación de la excitabilidad*

En una célula que no posee conductancias activadas por voltaje, el cambio de potencial de membrana en respuesta a la inyección de un pulso rectangular de corriente se desarrolla con un curso temporal de tipo exponencial gobernado por las propiedades pasivas de la membrana (líneas discontinuas de la figura 5). Si la célula expresa canales HCN que se encuentran parcialmente activos en el potencial de reposo, la activación o desactivación de  $I_h$  por un pulso hiperpolarizante o despolarizante distorsionará los cambios de potencial pasivos porque se modifica la resistencia de membrana y la constante de tiempo a medida que los canales se abren o se cierran. Como se mencionó anteriormente cuando el pulso es hiperpolarizante la activación de  $I_h$  provoca un *sag* despolarizante. Al se cierre del pulso, como la membrana tomó un potencial más despolarizado por el *sag*, se produce un *overshot* o despolarización pospotencial (DAP) (figura 5, trazo rojo). Si el pulso es despolarizante  $I_h$  se desactiva (estaba parcialmente activada al potencial de reposo) y produce un *sag* hiperpolarizante. Al cierre del pulso despolarizante,  $I_h$  se vuelve a activar produciendo un *undershot* o hiperpolarización pospotencial (AHP) debido a que el *sag* hiperpolarizante fijó un potencial menor, y porque durante la desactivación de  $I_h$  la membrana adquirió una resistencia mayor (por el propio cierre de canales HCN) que produce una mayor deflexión de potencial para el mismo pulso.

### *AHP, DAP e $I_h$ en neuronas*

Las DAP y las AHP son despolarizaciones o hiperpolarizaciones del potencial de membrana que pueden tener lugar en células excitables luego del disparo de potenciales de acción, y regulan la excitabilidad de la célula por períodos de unos pocos milisegundos a varios segundos (Hille, 2001). La DAP clásica, observada luego de un potencial de acción, despolariza la membrana por varios milisegundos durante los cuales la célula se hace más excitable y aumenta la chance de disparar nuevos potenciales de acción. Este fenómeno es generalmente mediado por corrientes de  $Ca^{2+}$  pero, como se explicó anteriormente, puede también estar mediado por  $I_h$  (Pape, 1996). El DAP generado por la activación de  $I_h$  puede contribuir a alcanzar el umbral de disparo de potenciales de acción al activar canales de  $Ca^{2+}$  de bajo umbral, como se reportó en neuronas del núcleo supraquiasmático (Akasu y col., 1993). El DAP inducido por  $I_h$

también puede aumentar la frecuencia de disparo al inicio de un pulso despolarizante en neuronas piramidales de la lámina V (Spain y col., 1991).



**Figura 5: la activación o deactivación de  $I_h$  produce AHPs o DAPs.** Esquema hipotético de como  $I_h$  puede contribuir a la formación de pospotenciales. Los pulsos de corriente (trazos superiores) hiperpolarizante (rojo) o despolarizante (azul) provocan la activación o deactivación de  $I_h$  que se encontraba parcialmente activada en el potencial de reposo. El cambio en el estado de activación de  $I_h$  en uno u otro sentido provoca un *sag* (trazos inferiores). Al término del pulso hiperpolarizante se produce una despolarización pospotencial (DAP) (rojo). Al término de pulso despolarizante se produce una hiperpolarización pospotencial (AHP) (azul). Las líneas entrecortadas son la respuesta pasiva de la membrana (si no hubiese corrientes activadas por voltaje) [tomado y modificado de Robinson y Siegelbaum 2003].

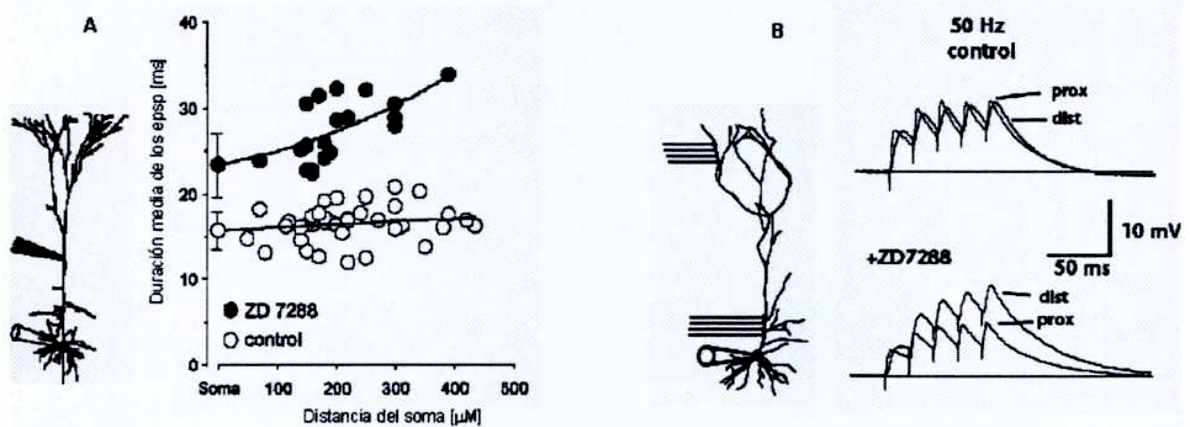
La AHP clásica es aquella que se debe a la hiperpolarización que ocurre por entrada de  $K^+$ , inducida por  $Ca^{2+}$ , con posterioridad a la descarga de uno o más potenciales de acción (MacDermott y Weight, 1982). Sin embargo los canales que median la AHP en neuronas piramidales de hipocampo y corteza cerebral no están totalmente identificados (Villalobos y col., 2004; Gu y col., 2005). Fenomenológicamente las AHP se han clasificado en tres tipos, según su duración: rápida (1-5ms), media (50-200ms) y larga (>1s) (Sah y Faber, 2002). La AHP rápida (AHPf) se puede observar luego de un potencial de acción, participa en su repolarización y esta mediada por canales  $K_{Ca}$  dependientes del voltaje de gran conductancia (BK). La AHP lenta (AHPs) se produce luego de un tren de potenciales de acción y también es

dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, aunque los canales que median la corriente no están identificados (Sah y Faber, 2002; Bond y col., 2004; Villalobos y col., 2004). La AHPs participa en la adaptación de la frecuencia de disparo y puede ser modulada por noradrenalina, acetilcolina, serotonina y otros neurotransmisores. La AHP media (AHPm) en general también es dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular y se ha reportado que estaría mediada por canales  $\text{K}_{\text{Ca}}$  de baja conductancia independientes del voltaje (SK) tanto en neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo como de la neocorteza (Stocker y col., 1999; Bond y col., 2004; Villalobos y col., 2004). Sin embargo otros grupos reportaron que en neuronas piramidales CA1 la AHPm puede ser independiente del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular y estaría mediada por la corriente de  $\text{K}^+$  inhibida por muscarina,  $I_{\text{M}}$ , o  $I_{\text{h}}$  (Storm, 1989; Maccaferri y col., 1993). En estas células la AHPm, a diferencia de la rápida y la lenta, no se comporta como una conductancia pura de  $\text{K}^+$  ya que muchas veces su amplitud no se reduce a potenciales cercanos al  $E_{\text{K}}$  sino que permanece constante. La AHPm a potenciales hiperpolarizados no pudo ser bloqueada por TEA,  $\text{Cd}^{2+}$ , o bloqueantes selectivos de canales  $\text{K}_{\text{Ca}}$  pero sí por  $\text{Cs}^+$  extracelular indicando la participación de  $I_{\text{h}}$ . En estos trabajos se sugiere que  $I_{\text{h}}$  contribuye principalmente a la fase de repolarización de la AHP. En las neuronas piramidales de la lámina V de corteza somatosensorial de gato Crill y colaboradores realizaron una descripción electrofisiológica de  $I_{\text{h}}$  (Spain y col., 1987) y modelaron matemáticamente sus parámetros para determinar su participación en la excitabilidad (Schwindt y col., 1988). Mediante estos modelos predijeron que  $I_{\text{h}}$  determinaba el curso temporal la fase de repolarización de la AHPm, especialmente a potenciales hiperpolarizados donde  $I_{\text{h}}$  esta más activada. También se observó la contribución de  $I_{\text{h}}$  al AHPm en neuronas tálamo-corticales (McCormick y Pape, 1990b), donde se observó que tanto  $I_{\text{h}}$  como la AHPm se inhibieron con  $\text{Cs}^+$  extracelular.

### *Integración sináptica*

Mediante registros de *patch-clamp* en configuración *cell-attached* realizados a lo largo del eje somatodendrítico de células piramidales CA1 del hipocampo se demostró que la densidad de  $I_{\text{h}}$  aumentaba en la dendrita apical al alejarse del soma (Magee, 1998). En la corteza somatosensorial de roedores se obtuvieron resultados similares (Williams y Stuart, 2000; Berger y col., 2001). La densidad de corriente observada en el

soma fue baja ( $3\text{pA}/\mu\text{m}^2$ ), pero aumentaba en forma lineal con la distancia sobre la dendrita apical hasta los  $350\mu\text{m}$  a aproximadamente  $9\text{pA}$  cada  $100\mu\text{m}$  (Williams y Stuart, 2000). En registros realizados en la dendrita apical hasta los  $800\mu\text{m}$  del soma se observó que la densidad de corriente aumenta exponencialmente a partir de los  $400\mu\text{m}$ , llegando a  $40\text{pA}/\mu\text{m}^2$  (Berger y col., 2001), unas 13 veces más que el soma. La alta densidad de canales HCN1 en dendritas lejanas de las neuronas piramidales también se observó mediante técnicas inmunohistoquímicas (Lorincz y col., 2002).



**Figura 6: efecto de los bloqueantes de  $I_h$  sobre la duración de los EPSP** A, EPSP registrados en el soma de una NPLV de corteza somatosensorial (izquierda), evocados en la dendrita apical a distintas del soma en condiciones control (○) o en presencia del bloqueante de  $I_h$  ZD7288 (●). El bloqueo de  $I_h$  aumentó el ancho medio de los EPSP especialmente los provenientes de dendritas más lejanas. [tomado de Williams y Stuart 2000]. B, trenes de EPSP evocados en dendritas cercanas o en dendritas lejanas de neuronas piramidales de la región CA1 de hipocampo. Los registros en el soma en condiciones control (arriba) o con ZD7288 (abajo) muestran que el bloqueo de  $I_h$  provocó una mayor sumación temporal en los EPSP provenientes de las descritas lejanas. [tomado de Magee 1999].

Magee (1999) describió que la alta densidad de canales HCN dendríticos activos en el potencial de reposo regula el curso temporal de los potenciales postsinápticos excitatorios (EPSP), contrarrestando el ensanchamiento producido por filtrado en el árbol dendrítico. De acuerdo a la teoría de cable, los EPSP provenientes de dendritas lejanas llegarían al soma con un curso temporal más lento que los provenientes de la región proximal. Sin embargo, cuando se midieron en condiciones normales los EPSP provenientes de diferentes localizaciones de dendríticas de neuronas piramidales, se encontró que no había diferencias de curso temporal (figura 6A, ○). Este efecto se



denomina normalización temporal de los EPSP respecto de la localización, y se demostró mediante el empleo de dos inhibidores de  $I_h$ ,  $Cs^+$  (Magee, 1998) o ZD7288 (Magee, 1999; Williams y Stuart, 2000). Los EPSP provenientes de dendritas lejanas medidos en el soma en presencia de estos bloqueantes tuvieron una mayor duración que los originados en dendritas cercanas (figura 6A, ●), por lo tanto  $I_h$  en condiciones normales reduciría la duración de los EPSP. Como consecuencia de esto, el ensanchamiento de los EPSP en presencia de bloqueantes de  $I_h$  produce una mayor sumación temporal cuando son evocados a alta frecuencia (figura 6B). De esta forma  $I_h$  reduciría la ventana de tiempo en la cual deben coincidir los potenciales sinápticos distales para alcanzar el umbral necesario para evocar potenciales regenerativos en las dendritas (Schiller y col., 1997). Este fenómeno se explica porque la presencia de un gradiente de densidad de  $I_h$  del soma a las dendritas cambia las propiedades intrínsecas de este compartimiento celular, generando una conductancia de fuga que reduce la constante de tiempo y acelera el decaimiento de los EPSP. La duración de los EPSP sería suficiente para provocar la deactivación de  $I_h$ , que semeja la activación de una “corriente” saliente que reduce la duración media de los EPSP en un grado tal que contrarresta el filtrado por efecto cable de las dendritas (Magee, 2000).

Es posible que otros potenciales transmitidos por el árbol dendrítico también se vean regulados por esta presencia asimétrica de canales HCN en las neuronas piramidales. Un ejemplo de ello serían los potenciales de acción originados en el soma y propagados hacia el árbol dendrítico (BAP). Sin embargo el efecto de  $I_h$  sobre los BAP prácticamente no ha sido estudiado, solo se reportó que al bloquear  $I_h$  con  $Cs^+$  extracelular los potenciales de acción que llegan a las dendritas se ensanchan levemente (Magee, 1998).

### *Plasticidad sináptica*

Se ha demostrado la presencia de  $I_h$  en terminales presinápticos de células *Basket* del cerebelo (Southan y col., 2000), el Calyx de Held (Cuttle y col., 2001) y la la unión neuromuscular del *crayfish* (Beaumont y Zucker, 2000), sugiriendo que jugaría un rol en la transmisión sináptica, aunque hasta el momento las evidencias son contradictorias.

En la unión neuromuscular del *crayfish* la facilitación de largo plazo en respuesta a serotonina depende del aumento en la producción de AMPc. Zucker y colaboradores describieron la presencia de  $I_h$  en terminales axónicos motores de *crayfish* y mostraron

que la serotonina puede regular Ih vía la producción de AMPc (Beaumont y Zucker, 2000). Esta modulación de Ih provoca un aumento de la facilitación sináptica sensible a Cs<sup>+</sup> ó ZD7288. Además, la activación de Ih independiente de serotonina también produce facilitación. Aunque Ih es necesaria para la facilitación sináptica de largo plazo en *crayfish*, los bloqueantes de la polimerización de actina la previenen, abriendo la posibilidad para una interacción entre Ih y el citoesqueleto (Beaumont y col., 2002).

En el hipocampo, en las sinapsis que hacen las fibras musgosas (del inglés *mossy fibers*) sobre las neuronas piramidales de la región CA3, se puede inducir LTP dependiente de AMPc. Algunos estudios sugieren que esta LTP estaría mediada por Ih, dado que no pudo ser inducida en presencia de los bloqueantes orgánicos ZD7288 o DK-AH (Mellor y col., 2002; Huang y Hsu, 2003). Sin embargo estos resultados fueron muy cuestionados posteriormente debido a que estos bloqueantes producirían una inhibición de la transmisión sináptica en forma independiente del bloqueo de Ih (Chevalleyre y Castillo, 2002), probablemente bloqueando directamente los receptores de glutamato postsinápticos (Chen, 2004).

### **Los canales de K<sup>+</sup> *inward rectifier* (Kir)**

Los canales de K<sup>+</sup> tipo *inward rectifier* (Kir) son una familia dentro de la superfamilia de canales de K<sup>+</sup> y hasta el momento se conocen 7 subtipos.

Los Kir1 (ROMK) muestran rectificación leve y se expresan en riñón y cerebro. Participan del transporte de K<sup>+</sup> transepitelial en riñón. Los canales Kir2 son los más representativos de la familia y se han clonado 4 subtipos. Todos presentan una marcada rectificación entrante y poseen varios sitios de fosforilación citoplasmáticos. Estos se expresan ubicuamente en corazón y cerebro donde participan del control del potencial de reposo y la excitabilidad. Los canales del tipo Kir3 también presentan una fuerte rectificación pero son activados directamente por proteínas G y median respuestas a neurotransmisores y hormonas en cerebro, corazón y células secretorias. Se conocen 4 subunidades de Kir3. Los canales Kir6 o K<sub>ATP</sub> son canales regulados por ATP y se asocian a la subunidad regulatoria SUR (receptor de sulfonilurea). Estos canales son importantes en la secreción de insulina, en la respuesta a la isquemia cerebral y cardíaca, y en el control del tono del músculo liso vascular. El rol fisiológico de los canales Kir4, Kir5 y Kir7 no ha sido descripto. Tampoco está claro aún si los canales Kir4 constituyen una subfamilia de los Kir1 o se trata de un grupo independiente. Los canales Kir7 tienen

propiedades bastante diferentes al resto de los miembros de esta familia, como por ejemplo una baja conductancia, baja sensibilidad al  $Ba^{2+}$  y baja dependencia del  $K^+$  (Nichols, 1997; Coetzee y col., 1999; Reinmann, 1999).

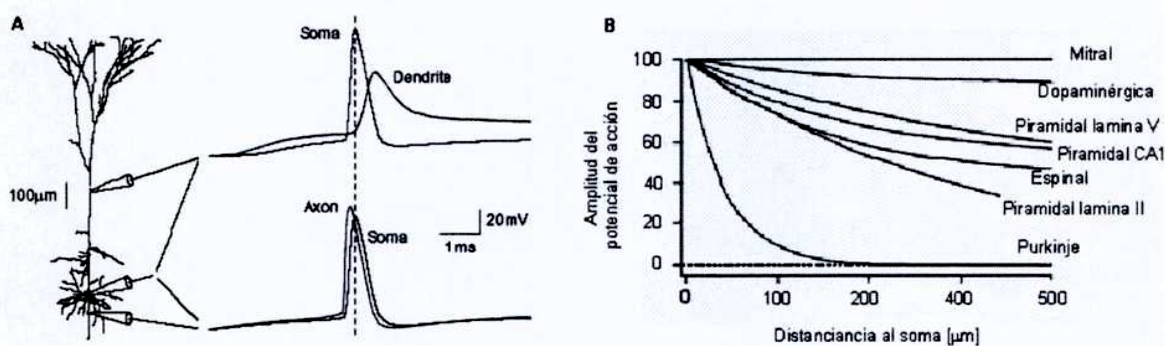
Los genes que codifican para canales Kir fueron clonados previamente a los HCN (Kubo y col., 1993). A diferencia de otros miembros de la superfamilia de canales de  $K^+$  cada subunidad consiste de dos segmentos transmembrana que para formar un canal funcional se asociarían en un tetrámero. En el poro conservan la secuencia distintiva de los canales de  $K^+$ , GYG. Se sabe que la dependencia del voltaje de los canales Kir no es intrínseca de su estructura ya que no posee un dominio sensor de voltaje. La rectificación entrante observada en I<sub>kir</sub> es subyacente a algunos cationes intracelulares como  $Mg^{2+}$  y poliaminas ya que son estos los que bloquean el poro del canal a potenciales despolarizados evitando la salida de iones  $K^+$ . Se cree que las poliaminas actuarían como un dominio de inactivación del canal de una manera análoga al modelo de la bola y la cadena propuesto para canales de  $K^+$  activados por despolarización (Bichet y col., 2003).

Las corrientes mediadas por estos canales (I<sub>kir</sub>) poseen un rango de activación similar a I<sub>h</sub> pero se diferencia en varios aspectos, biofísicos y farmacológicos. I<sub>kir</sub> tiene una cinética de activación muy rápida, en el orden de los varios milisegundos, aunque también puede presentar un componente más lento. Esta es una corriente mediada exclusivamente por iones  $K^+$  por lo que su potencial de reversión se encuentra normalmente entre los -80 y -100mV y su activación aumenta significativamente a potenciales negativos al potencial de reversión del  $K^+$ . Su rango de voltajes de activación depende de la concentración de extracelular  $K^+$  de acuerdo a lo esperado por los cambios en el potencial de reversión del  $K^+$ . Farmacológicamente, pueden ser inhibidos selectivamente por bajas concentraciones de  $Ba^{2+}$ , pero también son sensibles al  $Cs^+$  y TEA aplicados al medio extracelular (Coetzee y col., 1999).

## LA PROPAGACION RETROGRADA DE POTENCIALES DE ACCION

En las neuronas piramidales el sitio principal de iniciación de los potenciales de acción está localizado en el cono axónico, una región del axón muy cercana al soma. Luego de su generación los potenciales de acción pueden propagarse activamente, no solo a lo largo del axón, sino también a lo largo de las dendritas, en un fenómeno llamado retropropagación (*backpropagating action potentials* ó BAP) (Stuart y col., 1997) (figura 7A). A diferencia del axón, en donde la propagación es totalmente

regenerativa, en las dendritas de las células piramidales el avance de un BAP es parcialmente regenerativo. En ausencia de canales dependientes de voltaje el grado de penetración de los BAP en el árbol dendrítico dependería exclusivamente de propiedades pasivas tales como resistencia de membrana, capacitancia de membrana y resistencia axial. En esas condiciones, la amplitud de un potencial propagado por las dendritas decaería rápidamente y su curso temporal se ensancharía, de acuerdo a las propiedades de cable (Rall, 1967). La morfología del árbol dendrítico también influye sobre los BAP, por ejemplo reduciendo la probabilidad de propagarse exitosamente en los puntos de ramificación (Spruston y col., 1995). Sin embargo las dendritas no son por lo general estructuras pasivas en términos de propagación y generación de señales sino que poseen canales dependientes del voltaje que pueden moldear el curso temporal de los potenciales transmitidos (Magee, 2000). Los principales responsables de la propagación regenerativa de los BAP son los canales de  $\text{Na}^+$  dependientes de voltaje (Stuart y col., 1997). Esto se demostró registrando en células que poseen distintas densidades de canales de  $\text{Na}^+$  en sus dendritas.



**Figura 7: La propagación retrógrada de potenciales de acción.** A, registros en múltiples sitios de una misma neurona permitieron estudiar con precisión la propagación de los potenciales de acción en distintos compartimientos celulares. Se puede ver temporalmente que el potencial de acción se inicia en el axón luego llega al soma y finalmente a la dendrita, este último atenuado. B, amplitud de los BAP en función de la distancia del soma en varios tipos de neuronas. [tomado de Stuart y col. 1997]

En células piramidales, donde la dendrita apical posee alta densidad de canales de  $\text{Na}^+$ , la aplicación de TTX reduce la amplitud de los BAP (Stuart y Sakmann, 1994), mientras que en neuronas del Purkinje que tienen baja densidad de canales de  $\text{Na}^+$ , la aplicación de TTX no tiene efecto sobre los BAP (Stuart y Hausser, 1994), mostrando

que la penetración de los BAP varía de acuerdo a los niveles de expresión de canales de  $\text{Na}^+$  (figura 7B). Otras conductancias presentes en dendritas pueden influenciar la propagación de BAP y EPSP, por ejemplo la activación de canales de  $\text{K}^+$  dendríticos que reducen la efectividad de la propagación. Inclusive la propia frecuencia y número de potenciales de acción disparados incrementan la penetración de los BAP en dendritas (Larkum y col., 1999b).

### *Implicancias fisiológicas de los BAP*

El estudio de los BAP se profundizó a partir del desarrollo de técnicas para el registro electrofisiológico en procesos neuronales pequeños que permitieron medir en forma directa y simultáneamente el potencial propagado en varios puntos del árbol dendrítico (Stuart y col., 1993) (figura 7A). Actualmente existen otras técnicas que permiten monitorear cambios en el potencial de membrana utilizando colorantes fluorescentes. Los colorantes sensibles al voltaje son una forma muy directa de medir los cambios de potencial pero son poco utilizados debido a su baja relación señal/ruido y alta toxicidad. Otra desventaja en el empleo de estos colorantes es que como están asociados a membranas a veces no tienen una distribución celular uniforme. Los colorantes sensibles a cambios en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  han sido los más utilizados para monitorear la propagación de potenciales de acción. Los indicadores fluorescentes de  $\text{Ca}^{2+}$  tienen la ventaja de proveer una alta relación señal/ruido, probablemente mayor que cualquier otro indicador fluorescente, pero no poseen la resolución temporal de los colorantes sensibles a voltaje y solo proporcionan una medición indirecta de la despolarización ya que miden la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales activados por el potencial de acción. De modo tal que las mediciones van a estar influenciadas por el tipo y la distribución de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes del voltaje, la liberación de los reservorios intracelulares y la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  por receptores ionotrópicos. Por lo tanto la calibración de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  en función de la despolarización es prácticamente imposible (Waters y col., 2005). Estos problemas son particularmente importantes en las dendritas lejanas donde la ausencia de señal puede deberse a que el BAP no llegó o no alcanzó el umbral de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , a que no hay canales de  $\text{Ca}^{2+}$  o que la señal es muy baja en estructuras muy pequeñas.

El hecho que los BAP se produzcan activamente en algunos tipos de neuronas y no en otros sugiere que podrían ser funcionalmente importantes en aquellas donde se

presenten. Se cree que los BAP funcionarían como una señal retrógrada que indicaría al árbol dendrítico la actividad neuronal en la vía axónica de salida. En las neuronas piramidales de la lámina V existe un sitio de iniciación de potenciales regenerativos de  $\text{Ca}^{2+}$  en la dendritas apicales lejanas (Schiller y col., 1997). Estos potenciales de acción cálcicos pueden iniciar ráfagas de potenciales de acción somáticos (de  $\text{Na}^+$ ) (Larkum y col., 1999a). Los BAP pueden constituir un mecanismo de interacción entre los dos sitios de iniciación de potenciales de acción ya que la llegada de los BAP al sitio de iniciación dendrítico en coincidencia con EPSP facilita la formación de potenciales regenerativos de  $\text{Ca}^{2+}$  y estos a su vez repercuten en el sitio de iniciación somático. Este mecanismo es conocido como BAC *firing* (back-propagation activated calcium spike firing) (Larkum y col., 1999a). Los trenes de BAP pueden evocar potenciales regenerativos de  $\text{Ca}^{2+}$  dendríticos, independientemente del la actividad sináptica, si son inducidos a la frecuencia adecuada (Larkum y col., 1999b). Cada neurona posee una frecuencia crítica a partir de la cual los trenes de BAP son propagados más eficientemente y llegan al umbral del sitio de iniciación dendrítico. El hecho de que la generación de potenciales dendríticos no dependa de la amplitud de los BAP, sino de la frecuencia, indica que lo más importante es el tiempo de despolarización, más que la amplitud (Larkum y col., 1999b). La frecuencia crítica es muy variable entre distintas neuronas y se encuentra entre 60 y 100Hz, aunque puede llegar a ser de 200Hz. En neuronas piramidales de corteza somatosensorial se encontró que la presencia de  $I_h$  hace necesaria una mayor frecuencia crítica para evocar potenciales de acción de  $\text{Ca}^{2+}$  en la dendrita apical (Berger y col., 2003), ya que la aplicación de ZD7288 reduce la frecuencia crítica al 68% del control. Debajo de esta frecuencia los BAP también inducen un aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, pero solo en el tramo cercano de las dendritas. Este aumento no se debe a la actividad regenerativa de las dendritas sino a la activación de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  durante la despolarización provocada por los BAP (Spruston y col., 1995; Larkum y col., 1999b).

Se cree que los BAP estarían involucrados en los cambios de largo plazo de la eficacia sináptica. El efecto de los BAP sobre la plasticidad sináptica depende de la coincidencia de eventos de la pre- y postsinápsis en una ventana de tiempo estrecha de algunos milisegundos. Dependiendo del orden preciso de ocurrencia de los EPSP presinápticos y los BAP postsinápticos, la eficacia de esas sinapsis puede aumentar o disminuir produciendo los fenómenos de LTP o LTD (Markram y col., 1997; Bi y Poo, 1998; Linden, 1999). En general el LTP depende del aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  postsináptico a

través de receptores NMDA. Esto sugiere que los BAP podrían contribuir a la despolarización necesaria para la liberación del bloqueo de los receptores NMDA por  $Mg^{2+}$ . A favor de esta hipótesis se ha descrito que en espinas dendríticas se produce un aumento no lineal de la entrada de  $Ca^{2+}$  inducido por la coincidencia de EPSP y BAP en células CA1 de hipocampo (Yuste y Denk, 1995) y en neuronas corticales de la lámina V (Koester y Sakmann, 1998).

Otra potencial función de los BAP involucra el aumento transitorio del  $Ca^{2+}$  y la liberación de neurotransmisores en las dendritas. Este mecanismo actuaría en interneuronas de la corteza cerebral donde los BAP pueden provocar la liberación de GABA sobre las terminales axónicas de las células piramidales (Zilberter y col., 1999; Kaiser y col., 2001). En neuronas piramidales existen evidencias de que los BAP podrían controlar la liberación de glutamato o canabinol de sus dendritas (Zilberter, 2000; Sjostrom y col., 2003).

# **OBJETIVOS**



## **OBJETIVOS**

### **General:**

Estudiar las corrientes activadas por hiperpolarización en las neuronas piramidales de la lámina V de la CPF.

### **Particulares:**

1. Separar y describir las distintas corrientes activadas por hiperpolarización presentes en este tipo neuronal.
2. Analizar sus propiedades farmacológicas y biofísicas.
3. Investigar su influencia sobre la excitabilidad neuronal y sus posibles roles fisiológicos.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

Se utilizaron ratones de la cepa exocriada CF1 de 15 a 20 días de edad. Todos los animales fueron provistos por el bioterio central de la FCEyN (UBA) salvo los utilizados en los experimentos de imágenes de  $Ca^{2+}$  que fueron obtenidos de laboratorios Jackson (USA). Los ratones fueron anestesiados con Metofano o Halotano y sacrificados por decapitación en el momento de la disección. Cada animal tuvo un trato humanitario haciendo todo lo posible para minimizar el stress y el dolor.

### **Tipo de registros electrofisiológicos realizados**

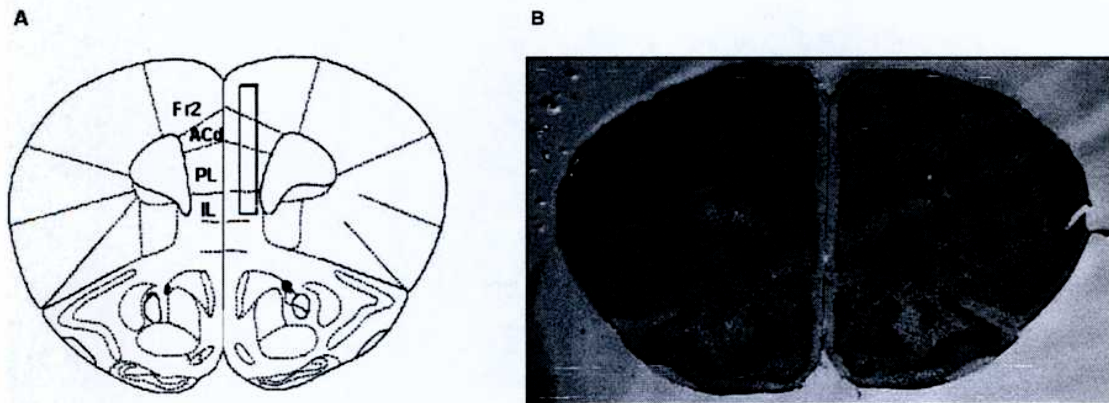
Se realizaron registros intracelulares de neuronas piramidales de la lámina V (NPLV) de la corteza prefrontal medial (CPFm) en rebanadas agudas de 300 $\mu$ m de espesor, mediante la técnica de *patch-clamp* somático en su configuración de célula entera (Edwards y col., 1989). Esta técnica consiste en medir y controlar los cambios de corriente y voltaje a través de un solo electrodo o pipeta de *patch*, ya sea en modo fijación de voltaje (*voltage-clamp*) o fijación de corriente (*current-clamp*). Presenta una serie de ventajas y desventajas respecto de los registros con dos microelectrodos. Las dos principales ventajas son que al ser una sola pipeta se pueden registrar células pequeñas, y en forma estable con bajos niveles de ruido. La principal desventaja es que induce errores de medición debidos a la resistencia del electrodo, porque debe censar y controlar las dos variables, corriente y voltaje. Sin embargo se pueden tomar algunos recaudos para minimizar esta resistencia y cuidar de que sea constante para que los errores no varíen durante el registro. Además esta técnica facilita el registro de células en rebanadas de cerebro, un sistema en el que las neuronas conservan su organización y parte de sus neuritas y conexiones intercelulares. Las rebanadas agudas de cerebro son un sistema intermedio entre los limitados y frágiles registros in vivo, y los realizados en células disociadas o en cultivo que tienen que ser sometidas a tratamientos mucho más drásticos.

### **Determinación del área de registro**

La CPFm de roedores se subdivide en cinco regiones, el área frontal 2 (Fr2), el área cingulada dorsal anterior (ACd), el área cingulada ventral anterior (ACv), el área

prelímica (PL) y el área infralímica (IL) (Uylings y col., 2003). En la figura 8 se muestra el diagrama de un corte coronal de la CPF (Franklin, 1996) y un corte coronal equivalente en ratones CF1 de 18 días indicando el área en que se realizaron registros electrofisiológicos. Se registraron neuronas ubicadas en las áreas Fr2, ACd, PL e IL indistintamente. Estas áreas están asociadas con funciones características de la corteza dorsolateral de primates (Uylings y col., 2003). El área ACv, también considerada parte de la CPF, está situada más caudal y no se encuentra dentro del área de registros.

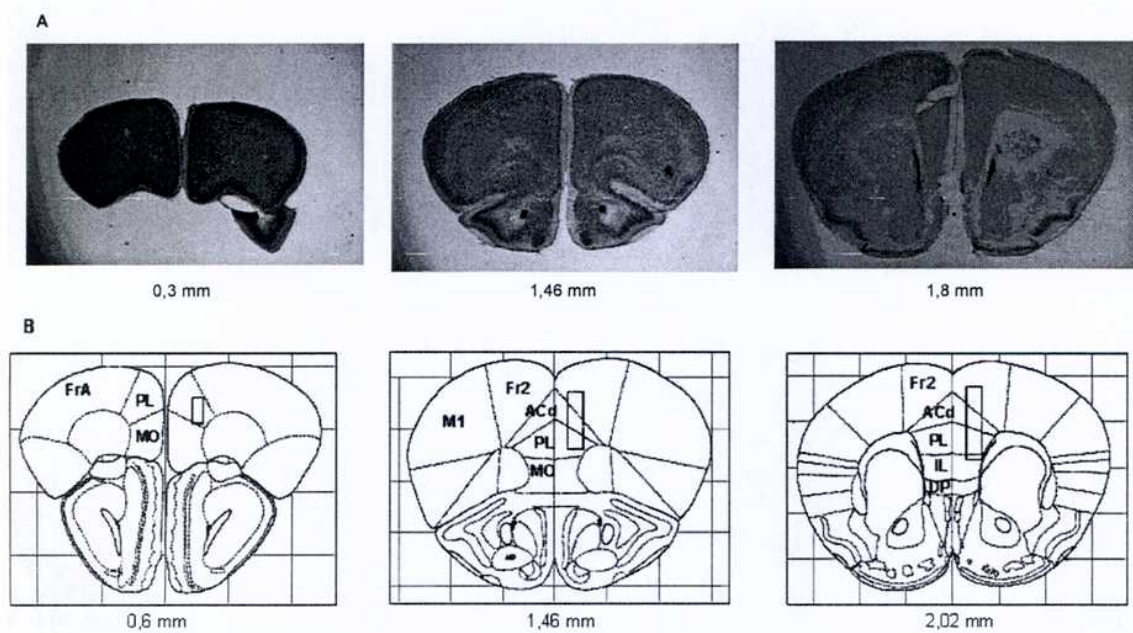
Los ratones utilizados en el trabajo son de una cepa y una edad distintas a los utilizados en el atlas de referencia (Franklin, 1996). La cepa CF1 que se utilizó en este trabajo es una de las de mayor tamaño, mientras que la C57BL/J6, usada en el atlas de referencia, es de tamaño medio. Por lo tanto, para determinar la región tridimensional del cerebro donde se encuentran los somas de las NPLV de las regiones de interés, fue necesario ajustar las dimensiones obtenidas del atlas a las de los cortes de cerebro de los ratones utilizados. Para ello se compararon los esquemas y las imágenes del atlas con las áreas de interés de los cortes realizados en dos ratones CF1 de 18 días.



**Figura 8:** rebanada coronal de la CPFm con el esquema de una sección homóloga del atlas. **A**, esquema indicando la anatomía de la corteza prefrontal medial (CPFm) en un corte coronal de ratones C57BL/J6 adultos ubicado a 1,58mm del polo frontal. [tomado y modificado de Paxinos y Franklin 2001]. Fr2, área frontal 2; ACd, área cingulada dorsal anterior; PL, área prelímica; IL, área infralímica. **B**, fotografía de un corte coronal del lóbulo frontal de un ratón CF1 de 18 días revelado con tinción de Nissl ubicado a 1,4mm del polo frontal correspondiente al diagrama de la figura A. Los recuadros indican el área de registros, donde se localizan los somas de las neuronas piramidales de la lámina V.

Las secciones coronales utilizadas en este estudio fueron las que incluyen el área PL, que según el atlas de cerebro de ratón (Franklin, 1996) se halla entre 2,96 y 1,42mm del bregma. Se utilizó como punto de referencia la distancia desde el polo frontal en vez del bregma, ya que este es el punto de referencia durante la obtención de los cortes en el vibrátomo. De acuerdo al atlas el polo frontal se ubica a 3,56mm del bregma, por lo tanto las secciones que incluirían el área PL se ubican entre los 0,6 y 2,14mm desde el polo frontal.

Con el objetivo de determinar la región equivalente en ratones CF1 jóvenes, se realizaron cortes coronales seriados de 100 $\mu$ m de espesor del lóbulo frontal de 2 ratones de 18 días. Los cortes se tiñeron con violeta de cresilo (tinción de Nissl), la misma coloración utilizada en el atlas de referencia. Por comparación se determinó que las secciones coronales con las áreas de interés en ratones CF1 de 18 días están aproximadamente entre los 0,3 y 1,8mm del polo frontal (figura 9).



**Figura 9: cortes utilizados para registros y sus diagramas equivalentes. A,** fotografías representativas de cortes coronales las regiones de la CPFm utilizadas para registrar, desde la región más anterior (izquierda) hasta la más posterior (derecha) con sus distancias desde el polo frontal. **B,** diagramas equivalentes a los cortes mostrados en A con sus distancias del polo frontal [tomado y modificado de Paxinos y Franklin, 2001]. Los recuadros son las áreas de registro. MO: corteza orbital medial, PL, corteza prelímbica, FrA: corteza frontal asociativa, M1: corteza motora primaria, ACd: corteza cingular anterior, Fr2: área frontal 2, DP: corteza dorsal peduncular.

La extensión de la región del cerebro de ratones CF1 que contiene las áreas de registro coincidió con las obtenidas a partir del atlas de ratones C57BL/J6 adultos (1,5mm en ambas cepas). En principio se esperaba que esta región sea menor en los ratones utilizados en este trabajo, pero el mayor tamaño de los ratones de la cepa CF1 estaría compensando la diferencia debido a la edad entre ambas cepas de ratones. Esta sección de 1,5mm, en teoría permite obtener hasta 5 rebanadas de 300 $\mu$ m de espesor por cada cerebro. Sin embargo, solo 3 ó 4 rebanadas se encontraban en condiciones de ser usadas ya que generalmente la primera y la segunda rebanada no tenían células aceptables para registrar (ver obtención de las rebanadas).

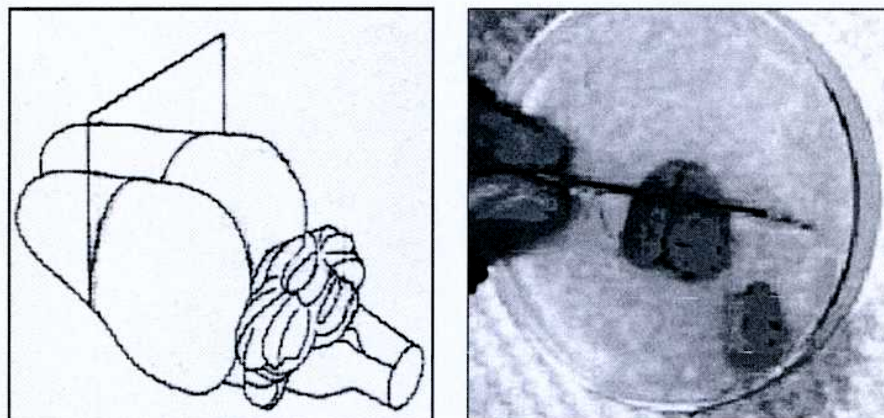
### **Tinción de Nissl**

La coloración con violeta de cresilo denominada tinción de Nissl permite visualizar los cuerpos celulares de color violeta oscuro y el resto del tejido incoloro o claro. Esta tinción fue la usada en el atlas de cerebro de ratón que sirvió de referencia para analizar los cortes utilizados en este trabajo.

Los cerebros de dos ratones CF1 de 18 días fueron fijados en formalina por 24hs. El lóbulo frontal de cada uno fue cortado en secciones coronales seriadas de 100  $\mu$ m usando el mismo vibrátomo (Vibratome 1000 plus) que se utilizó para obtener las rebanadas agudas de cerebro para registrar. Luego los cortes fueron montados en portaobjetos con gelatina 1% (Sigma-Aldrich) y secados a temperatura ambiente durante 24hs. Una vez secos y adheridos al portaobjetos se los hidrató en inmersiones sucesivas en alcohol 100% (10min), alcohol 95% (5min), alcohol 70% (5min), alcohol 50% (5min) y dos veces en agua destilada (5min). Por último se los tiñó con una solución de violeta de cresilo 0,1% de 30 a 60s hasta obtener la intensidad de coloración deseada. Los cortes se enjuagaron en agua destilada y luego se deshidrataron en pasos sucesivos de alcohol 50% (5min), alcohol 70% (5min), alcohol 95% (5min), dos veces en alcohol 100% (5min) y dos veces en xileno (5min). Finalmente fueron montados en bálsamo de Canadá (Permount, Fisher Scientific) y secados a temperatura ambiente durante 48 a 72hs. Por último las rebanadas de cerebro se observaron al microscopio y se digitalizaron las imágenes (figura 8 y 9).

### Obtención de rebanadas de cerebro para registros electrofisiológicos

Se disecó rápidamente el cerebro entero de un ratón anestesiado y decapitado y se colocó en una solución salina, buffer bicarbonato de corte (BBS: NaCl 125mM, KCl 2,5mM, CaCl<sub>2</sub> 0,5mM, MgCl<sub>2</sub> 2,5mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,25mM, NaHCO<sub>3</sub> 26mM y glucosa 10mM), a 0°C y equilibrado con carbógeno (CO<sub>2</sub> 5%/O<sub>2</sub> 95%). Este buffer a diferencia del utilizado para los registros tiene menor relación (Ca<sup>2+</sup>0,5/Mg<sup>2+</sup>2,5). Este procedimiento se realizó en menos de 1min desde el momento del sacrificio para minimizar el daño celular por hipoxia. Aproximadamente 1min después de la disección, una vez que el cerebro se enfrió, se realizó manualmente un corte coronal del tercio anterior de la neocorteza con el que se separó el lóbulo frontal, obteniéndose una pirámide cuyo vértice es el polo frontal (figura 10).

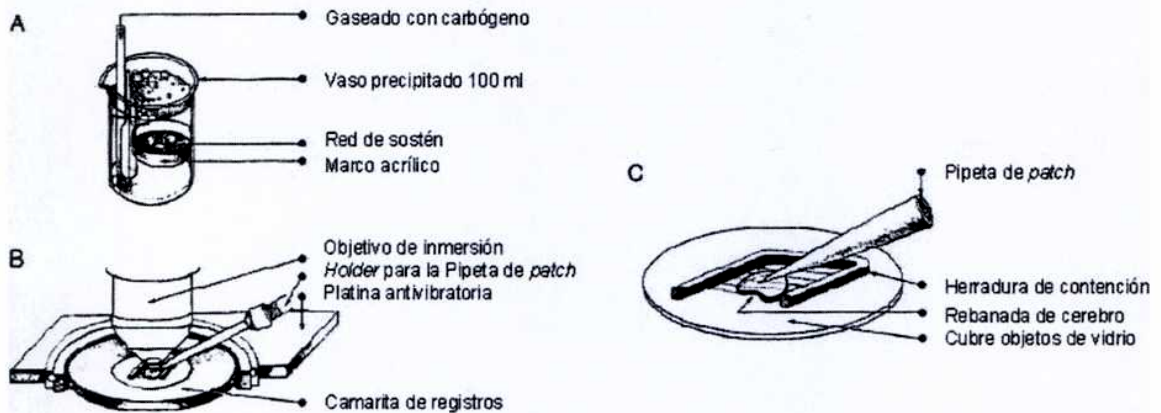


**Figura 10: disección del lóbulo frontal.** Izquierda, diagrama de un cerebro de ratón donde se señala el plano de corte. Derecha, fotografía de la disección del lóbulo frontal.

Esta pirámide se adhirió a la platina de inmersión del vibrátomo (Vibratome 1000 plus, St. Louis, USA) con un pegamento a base de cianocrilato (La Gotita, Poxipol). Inmediatamente se cubrió con BBS de corte carbo-oxigenado y se realizaron cortes coronales de 300  $\mu$ m, desde los 300  $\mu$ m a los 1800  $\mu$ m tomando como referencia el polo frontal.

Las rebanadas se transfirieron de un recipiente que contenía BBS normal (Ca<sup>2+</sup>2/Mg<sup>2+</sup>1) con burbujeo constante de carbógeno a temperatura ambiente (20-23°C) y se incubaron en este recipiente por al menos 90min. (figura 11A). Durante este tiempo de

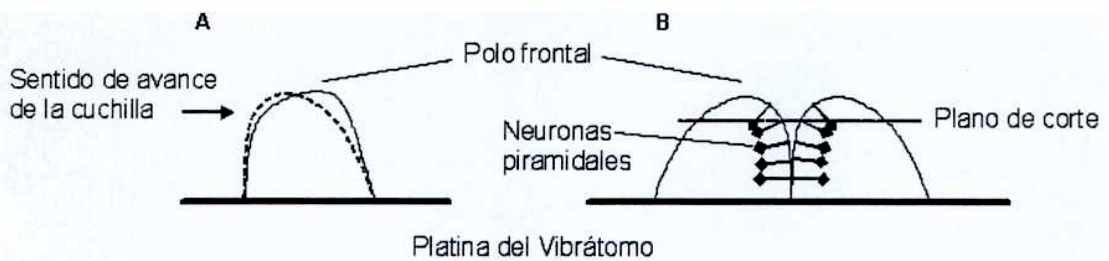
recuperación muchas de las células dañadas de forma irreversible mueren y no se ven posteriormente en el microscopio facilitando la visión de las neuronas saludables. Luego cada rebanada se coloca en la cámara de registro del microscopio donde quedan sumergidas en BBS normal carbo-oxigenado circulando por gravedad a una velocidad de 1-2ml/min durante todo el curso del experimento (figura 11B y C).



**Figura 11: diagrama del dispositivo de incubación y la cámara de registros.** A, vaso de incubación donde las rebanadas se mantuvieron hasta el momento del registro. B y C, izquierda: cámara de registros montada en un microscopio directo con objetivo de inmersión. Derecha: detalle de la rebanada sostenida con una herradura con hilos de *nylon* y una pipeta de *patch*. [tomado y modificado de “Single channel recording”, Sakmann y Neher 1995].

Como se mencionó arriba, generalmente en la primera y la segunda rebanada no se encuentran células saludables para realizar los registros. Esto puede deberse a que corresponden a la parte más distante de la base de la pirámide de tejido que se pegó en el vibrátomo, y por lo tanto esa parte es menos resistente al avance de la cuchilla. A medida que avanza la cuchilla provoca la torsión del tejido obteniéndose un corte desparejo (figura 12A). Otra causa podría ser la orientación radial de las dendritas apicales de las neuronas piramidales. La dendrita apical de estas neuronas es perpendicular a la superficie de manera que a medida que los somas se encuentran más cerca del polo frontal, las dendritas se orientan cada vez más transversales a la dirección de corte. El resultado es que la dendrita apical de las neuronas de las rebanadas más frontales resultan dañadas porque se les corta una parte importante de la dendrita apical (figura 12B).





**Figura 12: inconvenientes en la obtención de las rebanadas más frontales.** La primera y la segunda rebanada cortadas en el vibrátomo en general tuvieron menor cantidad de neuronas piramidales para registrar por dos motivos: **A**, la parte más frontal de tejido es la más susceptible a la deformación por la cuchilla produciendo cortes desparejos y dañando las neuronas cercanas a la superficie. **B**, la orientación radial de las dendritas apicales lleva a que sean seccionadas en los cortes más próximos al polo frontal.

### Identificación morfológica de las NPLV

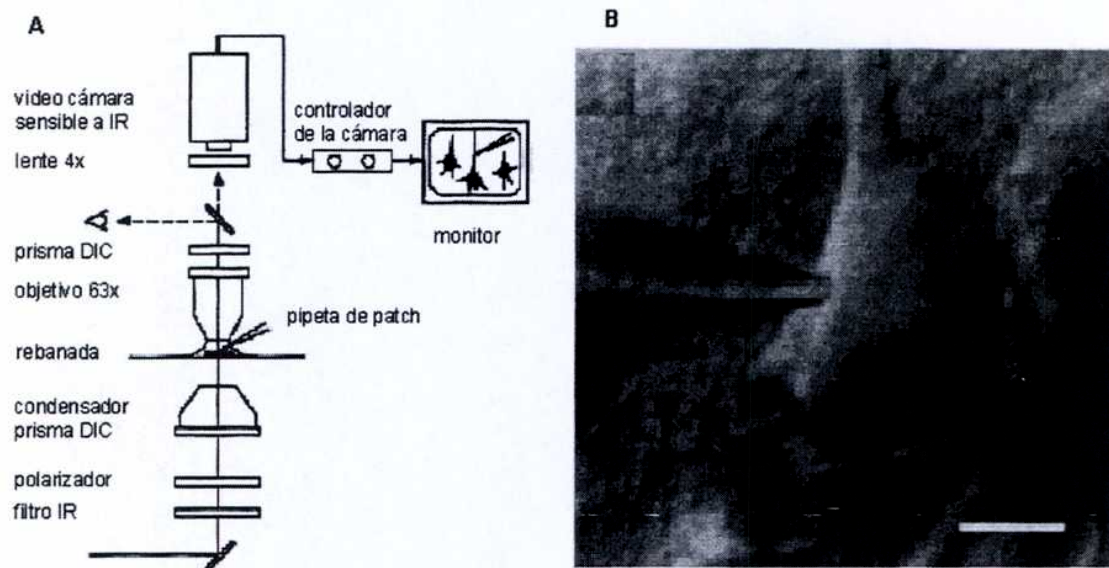
La gran variedad de tipos celulares presentes en la neocorteza y su ubicación dispersa dentro de las láminas hizo necesario implementar criterios de identificación morfológicos y electrofisiológicos, para poder caracterizar las neuronas de interés en forma inequívoca.

#### *Videomicroscopía infrarroja con contraste de interferencia diferencial*

El microscopio directo Axioscope FS (Carl Zeiss, Alemania), está provisto de un objetivo 63x de inmersión en agua, con óptica de contraste de interferencia diferencial (DIC) y una cámara de video con detección en el espectro infrarrojo (Newvicom, Hamamatsu Photonics, Japan). Este sistema de video-microscopía infrarroja permite tener una buena visualización de los somas neuronales y sus prolongaciones cercanas, lo que facilita la identificación de las neuronas y las maniobras de acercamiento necesarias para establecer los registros (figura 13). Esto redundará en una mayor eficiencia del establecimiento y mantenimiento de los registros de las neuronas en rodajas de tejido (Stuart y col., 1993).

Neuronas piramidales grandes similares a las observadas en la lámina V también pueden encontrarse en las láminas III y VI. Estas dos láminas son identificadas más fácilmente que la lámina V. La lámina III se reconoce porque en ella se encuentran las primeras neuronas piramidales grandes que se ven cuando se recorre la rebanada desde la

pia mater hacia las láminas profundas. La lámina V de la corteza frontal de roedores se halla debajo de la III ya que los roedores carecen de lámina IV. Sin embargo, como en rebanadas agudas de corteza no es posible observar un límite preciso entre las láminas III y V, se identificó la lámina V por la proximidad con la lámina VI, la que sí puede ser identificada y diferenciada de la lámina V. La lámina VI se reconoce porque limita por el lado interno con estructuras subcorticales como el cuerpo estriado y la sustancia blanca y porque posee un gran número de células multiformes. Las neuronas piramidales de la lámina V son las que están lindantes a las células multiformes de la lámina VI.



**Figura 13: Sistema de video-microscopía IR-DIC.** A, esquema del sistema de video-microscopía infrarroja (IR) con óptica de contraste de interferencia diferencial (DIC). B, Neurona piramidal fotografiada con este sistema. [tomado y modificado de "Single channel recording", Sakmann y Neher 1995]

Las células seleccionadas e identificadas mediante el procedimiento descrito se caracterizan por tener un soma piramidal grande localizado en la lámina V y una porción visible de la dendrita apical orientada hacia la superficie medial que separa los hemisferios. Sus somas tienen apariencia redondeada sin perder la forma piramidal. Presentan una superficie homogénea y un contorno suave sin demasiado contraste. Se descartaron neuronas hinchadas, con mucho contraste, con superficies irregulares, con un núcleo visible, vacuoladas o que no tuvieran forma piramidal.

### *Marcación con Neurobiotina*

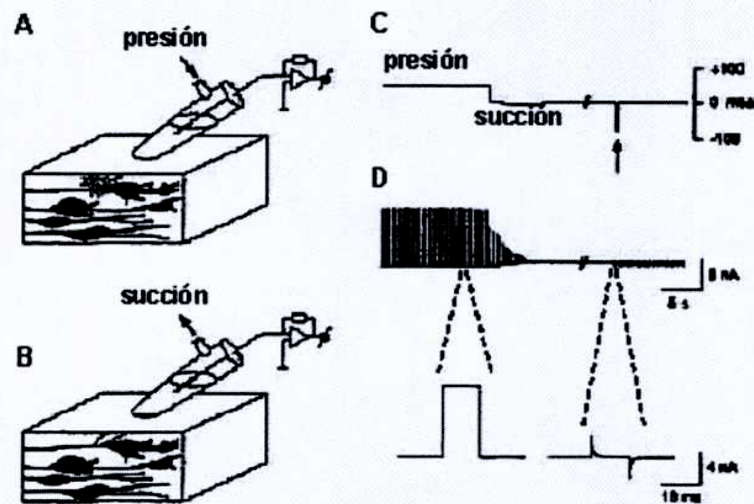
Con el objetivo de confirmar la eficiencia en la elección de las células se confirmó la morfología de 20 neuronas con una marcación con Neurobiotina. La Neurobiotina (Vector Laboratories, Burlingame, USA) se agregó en la solución de pipeta a una concentración entre 0,15 y 0,2%. Se la dejó difundir al menos 30min al interior de la célula durante el curso de los registros electrofisiológicos. Una vez terminado el experimento se retiró la pipeta suavemente tratando de no dañar la célula y se incubó la rebanada durante 2hs en formalina (Fisher Scientific) a temperatura ambiente para fijar el tejido. Por último la rodaja de tejido se lavó exhaustivamente con PBS (pH 7,3) y se guardó en un vial a 4°C hasta el momento del revelado.

La rebanada de cerebro previamente fijada se incubó con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% en PBS durante una hora para bloquear la actividad de la peroxidasa endógena. El agua oxigenada se lavó con abundante KPBS (PBS con K<sup>+</sup>) y se la incubó la rodaja con tritón X-100 0,4% (Sigma-Aldrich) por 2hs para permeabilizarla. El detergente se enjuagó con KPBS y se incubó la rebanada de cerebro con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC Vectastain, Vector Laboratories) por dos horas. Luego de varios lavados con KPBS se reveló con diaminobencidina 0,05% (Sigma-Aldrich) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,003% en KPBS. Una vez alcanzada la intensidad de color adecuada, controlada en el microscopio, los cortes se montaron en un porta objetos con gelatina 1% y se secaron a temperatura ambiente durante 1 o 2 días. Luego fueron pasados por alcohol 95% (5 min.), alcohol 100% (2 x 5 min.) y xileno (2 x 5min) para finalmente cubrirlos con bálsamo de Canadá (Permount, Fisher Scientific) y un cubreobjetos. Los preparados se secaron a temperatura ambiente para su observación al microscopio.

### **Establecimiento y adquisición de los registros electrofisiológicos**

Para aproximarse hasta las neuronas dentro del tejido se utilizó la técnica de *blow and seal* (soplar y sellar). Esta técnica consiste en atravesar el tejido directamente con la pipeta, bajando de a poco con un micromanipulador hasta alcanzar la célula blanco, y mientras se sostiene una presión interna positiva que evita que se tape (figura 14A). Una vez que la pipeta está sobre la membrana celular se libera la presión positiva y se ejerce una suave succión que provoca presión interna negativa mientras se monitorea la formación del sello (figura 14 B y C). La presión negativa facilita la invaginación de la

membrana celular en la punta de la pipeta y la formación del sello de alta resistencia que debe llegar a ser de al menos  $1\text{ G}\Omega$ . Una vez establecido el sello se dan uno o más pulsos de succión cortos para romper la membrana que quedó dentro de la pipeta y pasar a la configuración célula entera en la cual se realizaron todos los registros (Figura 14 C). En esta configuración la pipeta tiene continuidad eléctrica y espacial con el interior de la célula lo que permite que en pocos minutos la solución de pipeta reemplaza al citoplasma por difusión.



**Figura 14:** establecimiento de los registros. **A**, esquema donde se muestra la pipeta atravesando el tejido mientras se aplica presión en su interior. **B**, la pipeta alcanza la neurona elegida para registrar, se libera la presión y se aplica una ligera succión hasta obtener un sello de alta resistencia. **C**, cambios de presión en la pipeta durante el ingreso a la rebanada, el contacto con la célula y la formación del sello. La flecha indica la succión corta y fuerte para acceder al interior de la célula (*break-in*). **D**, arriba: monitoreo de la resistencia del sello mediante la aplicación de pequeños pulsos de voltaje, usualmente 5 a 50Hz. Nótese que los cambios de amplitud de la corriente ocurren en paralelo con cambios de presión. Abajo: ampliación de pulsos de monitoreo, cuando la pipeta está en la solución (izquierda) y una vez que se accedió a la configuración célula entera (derecha). La amplitud del pulso indica la resistencia y la forma la configuración. [tomado y modificado de "Single channel recording", Sakmann y Neher 1995].

Las pipetas de registro se obtuvieron a partir de vidrios capilares de borosilicato de 1,5mm diámetro externo y 1,12mm diámetro interno (WPI, New Haven, USA). Los capilares se estiraron en un *puller* (Sutter P-30, Novato, USA) en el momento del experimento. Las pipetas utilizadas tuvieron una resistencia medida en el BBS de entre 2 y  $4\text{ M}\Omega$ . Antes de establecer cada registro se llevó a cero el potencial de punta (*offset*). Los valores de potencial de membrana no fueron corregidos por el potencial de juntura

(*junction potential*) que se estimó en -13mV con las soluciones utilizadas. Una vez establecida la configuración célula entera se estimó el valor de resistencia en serie ( $R_s$ ) que típicamente estuvo entre 20 y 30 M $\Omega$  y puede inducir a errores en los experimentos de fijación de voltaje. La  $R_s$  fue compensada entre un 60-70% solo en los experimentos indicados (propiedades biofísicas de  $I_h$ ). El error inducido por la  $R_s$  depende de la corriente registrada mediante la ley de Ohm. Si se toman valores medios aproximados se puede tener una idea del error de la fijación de voltaje. Para una  $R_s$  de 25M $\Omega$  compensada un 70% y una corriente total de 600pA el error teórico de la fijación de voltaje es de 4,5mV. Esta estimación es válida en la región efectivamente controlada, es decir el soma y las dendritas cercanas, y se puede incrementar con corrientes y resistencia en serie mayores, o ser inferior si estas variables son menores. En los experimentos que no se compensó la  $R_s$  (debido a lo inestable de esta compensación) el error puede llegar a ser de hasta 20mV, pero es esos casos lo importante es que el valor de  $R_s$  no cambie durante el transcurso del experimento para que afecte a los controles y tratamientos de igual forma. Los registros en los que  $R_s$  cambió más de un 20% respecto del valor inicial no fueron incluidos en el análisis.

La señal analógica (corriente o voltaje) fue tomada mediante un amplificador Axopatch 200B (Axon Instruments, Foster City, USA) a la máxima ganancia posible. Los datos se digitalizaron *on line* mediante un conversor A/D (Digidata 1200, Axon Instruments), a 4KHz para el modo fijación de voltaje (*voltage-clamp*) o 10KHz en los registros realizados en modo fijación de corriente (*current-clamp*). La señal fue filtrada a 2kHz en fijación de voltaje o 5kHz cuando se trabajó en el de modo fijación de corriente, con el filtro interno pasabajos del amplificador. También se utilizó un filtro digital (eliminador de ruidos Hum Bug) para filtrar interferencias de 50Hz y sus armónicos.

Los protocolos de estímulo y adquisición de datos fueron controlados mediante el programa Clampex 8.0 (Axon Instruments). Los datos se analizaron luego del experimento con los programas Clampfit 8.0 (Axon Instruments) y GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) y en cada experimento se indica el test estadístico utilizado. Los resultados se presentan como el valor promedio  $\pm$  el error estándar.

## Imágenes funcionales de $\text{Ca}^{2+}$

Para estimular la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en las neuronas se evocó un tren de potenciales de acción en modo de fijación de corriente mediante la aplicación de 3 a 6 pulsos de corriente despolarizante supraumbrales (3ms de duración cada uno a una frecuencia de 50Hz). Se controló que cada pulso haya generado un solo potencial de acción. Esto provocó un aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el soma y la dendrita apical principalmente mediado por canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje, cuyo cambio se midió utilizando un colorante.

El equipamiento para los experimentos de imágenes de  $\text{Ca}^{2+}$  en simultáneo con registros electrofisiológicos somáticos fue similar al utilizado para los registros convencionales, con el agregado de los módulos necesarios para la toma de imágenes y la tarjeta de adquisición. Las señales eléctricas fueron adquiridas con una interfase ITC-18 (Instrutech Corporation, Port Washington, USA) a 10kHz y filtradas a 5kHz. Las imágenes se digitalizaron mediante una cámara CCD enfriada Quantix-EEV57 (Roper Scientific, Tucson, USA). Los colorantes fluorescentes se excitaron utilizando un monocromador (Polychrome-II, TILL Photonics, Pleasanton, USA) conectado al microscopio con un fibra óptica. La toma de imágenes se sincronizó con la estimulación y adquisición de registros electrofisiológicos mediante el programa no comercial TIWorkbench (cortesía del Dr. Takafumi Inoe, Universidad de Tokio, Japón) utilizando una Macintosh G3 (Apple). Los datos se analizaron luego del experimento con TIWorkbench, Igor Pro (Wavemetrics Inc., Oregon, USA) y GraphPad Prism.

Para detectar los cambios en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  se utilizó el colorante Oregon Green 488 BAPTA-1 (OGB-1, Invitrogen Molecular Probes, Carlsbad, USA). El colorante se agregó a la solución de pipeta normal a una concentración de 100 $\mu\text{M}$ . El OGB-1 pertenece a la familia de colorantes *intensiométricos* de longitud de onda larga. A diferencia de los colorantes *ratimétricos* como el Fura-2, los colorantes *intensiométricos* aumentan la intensidad de fluorescencia sin cambios importantes de la longitud de onda, lo que facilita técnicamente la medición. Por otro lado estos colorantes aumentan significativamente la sensibilidad del sistema ya que poseen una mayor relación señal-ruido. El OGB-1 tiene las ventajas adicionales de que su longitud de onda de excitación es menos absorbida por el tejido por lo que resulta menos dañado, y que el espectro de emisión no se superpone con la autofluorescencia

normal del tejido. Una vez obtenido el acceso al interior celular, se esperó entre 20 y 30min para que el colorante difundiera y llegara a una concentración constante en las regiones donde se tomaron imágenes (ROIs, *region of interest*). Los ROIs se ubicaron en el soma y en una o dos posiciones de la dendrita apical proximal. La neurona se posicionó de forma que cada imagen incluyó una parte del soma y la mayor parte posible de la dendrita apical. Sin embargo normalmente la dendrita apical no pudo ser observada más allá de 150µm debido a que se interna más profundamente en la rebanada. El OGB-1 se excitó a  $490 \pm 12\text{nm}$  con el monocromador y se detectó la emisión  $\geq 530\text{nm}$  con la cámara CCD. Para reducir el tiempo de lectura de cada imagen, dentro del campo visual de la cámara se definió un subcampo más pequeño de aproximadamente 200 por 400 píxeles que contenía el soma y una parte de la dendrita apical de la neurona. El tamaño exacto de este subcampo dependió en cada caso de la posición de la neurona y de la extensión de la parte visible su dendrita apical. La frecuencia de adquisición de imágenes fue de entre 25 y 35Hz y quedó determinada automáticamente por dos variables fijadas en cada caso, el tiempo de exposición de cada toma y el tamaño del subcampo mencionado arriba. El tiempo de exposición fue de 20 a 40ms y cada película constó de 40 a 80 tomas. Tanto el tiempo de exposición como el número de tomas se minimizaron para reducir el fotoblanqueo y el daño celular. De esta forma, si en una célula fue necesario aumentar el tiempo de exposición por toma (por ejemplo para mejorar la señal de fluorescencia), entonces se redujo el número de tomas para que el tiempo total de exposición de la película no sea mayor a 2s. Como cada experimento consta de no más de 10 películas, el tiempo total de exposición de una célula no superó los 20s. Con este tiempo de exposición durante un experimento no se detectó fotoblanqueo significativo. La vida media de este colorante expuesto a excitación continua es de 73s, más de tres veces mayor que es tiempo máximo de exposición durante estos experimentos. La fluorescencia de fondo del tejido fue sustraída colocando un ROI en un área de tejido donde no hubiera procesos neuronales visibles.

Los cambios de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  se expresaron como el cambio de fluorescencia ( $\delta F$ ), una medida adimensional que depende de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y se calculó con la siguiente fórmula:

$$\delta F = \%(F - F_{\text{basal}}) / F_{\text{basal}}$$

donde  $F - F_{\text{basal}}$  ( $\Delta F$ ) representa el cambio de fluorescencia respecto de  $F_{\text{basal}}$  (la fluorescencia basal) durante los milisegundos previos al estímulo. La dependencia entre  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y  $\delta F$  en colorantes *intensiométricos* es lineal si la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  es mucho menor que el

Kd del indicador, sino sería sublineal (Maravall y col., 2000). El Kd del OGB-1 en células Hela es aproximadamente 400nM (Thomas y col., 2000), un valor que esta dentro del rango fisiológico de  $[Ca^{2+}]_i$  evocado en neuronas piramidales por BAP (Schiller y col., 1995), por lo tanto en las condiciones de este trabajo la dependencia entre  $[Ca^{2+}]_i$  y  $\delta F$  sería sublineal. No se realizaron las calibraciones necesarias para obtener una estimación de  $[Ca^{2+}]_i$  porque son complejas de realizar en rebanadas y no es importante conocerla para el objetivo de estos experimentos. Otro factor que puede distorsionar la fluorescencia observada respecto de los cambios de  $Ca^{2+}$  es la compartimentalización subcelular del colorante. Sin embargo el OGB-1 no presenta compartimentalización subcelular importante salvo en el núcleo, y tanto su rango dinámico como su Kd, son similares en núcleo y en el citoplasma (Thomas y col., 2000), por lo tanto la dependencia de  $\delta F$  con  $[Ca^{2+}]_i$  en los distintos compartimientos celulares sería la misma.

### Soluciones y drogas

Durante todos los experimentos, disección, corte, mantenimiento y registro, las rebanadas de tejido se mantuvieron en solución salina de buffer bicarbonato (BBS) saturado en gas carbógeno ( $O_2$  95%/CO<sub>2</sub> 5%). El gaseado con carbógeno asegura la oxigenación del tejido y mantiene el pH a 7,4. El BBS normal, con el cual se mantienen las rebanadas y se realizan los registros, tuvo la siguiente composición: NaCl 125mM, KCl 2,5mM, CaCl<sub>2</sub> 2mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,25mM, NaHCO<sub>3</sub> 26mM y glucosa 10mM. Este tiene una osmolaridad de 290 a 300mOsm controlada ocasionalmente. El BBS de corte tuvo una composición similar al normal pero con en una menor relación  $Ca^{2+}/Mg^{2+}$ : NaCl 125mM, KCl 2,5mM, CaCl<sub>2</sub> 0,5mM, MgCl<sub>2</sub> 2,5mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,25mM, NaHCO<sub>3</sub> 26mM y glucosa 10mM. Durante los registros electrofisiológicos el BBS normal tiene adicionados Bicuculina 10 $\mu$ M y CNQX 10 $\mu$ M para bloquear la actividad sináptica de receptores GABA<sub>A</sub> y de glutamato tipo AMPA/Kainato. Según se indica en cada experimento se agregó al BBS algunas de las siguientes drogas: tetraetilamonio (TEA) 10mM para bloquear canales de K<sup>+</sup> tipo *delayed rectifier*; 4-aminopiridina (4-AP) 2mM para bloquear canales de K<sup>+</sup> tipo A; cloruro de bario (BaCl<sub>2</sub> ó Ba<sup>2+</sup>) para bloquear canales de K<sup>+</sup> tipo *inwardly rectifying* (I<sub>kir</sub>); cloruro de cadmio (CdCl<sub>2</sub> ó Cd<sup>2+</sup>) 100 $\mu$ M y cloruro de níquel (NiCl<sub>2</sub> o Ni<sup>2+</sup>) para bloquear canales de Ca<sup>2+</sup> y tetrodotoxina (TTX) 1 $\mu$ M para bloquear canales de Na<sup>+</sup> dependientes de voltaje.



Cuando el agregado de drogas osmóticamente activas excede de 3mM, la osmolaridad fue compensada reduciendo una cantidad equimolar el NaCl.

En los experimentos que combinan detección de imágenes fluorescentes de  $\text{Ca}^{2+}$  y registros electrofisiológicos el BBS contenía los bloqueantes CNQX 10 $\mu\text{M}$ , Picrotoxina (PTX) 50mM para bloquear canales GABA ionotrópicos y ácido aminofosfovalérico (APV) 20 $\mu\text{M}$  para bloquear canales NMDA.

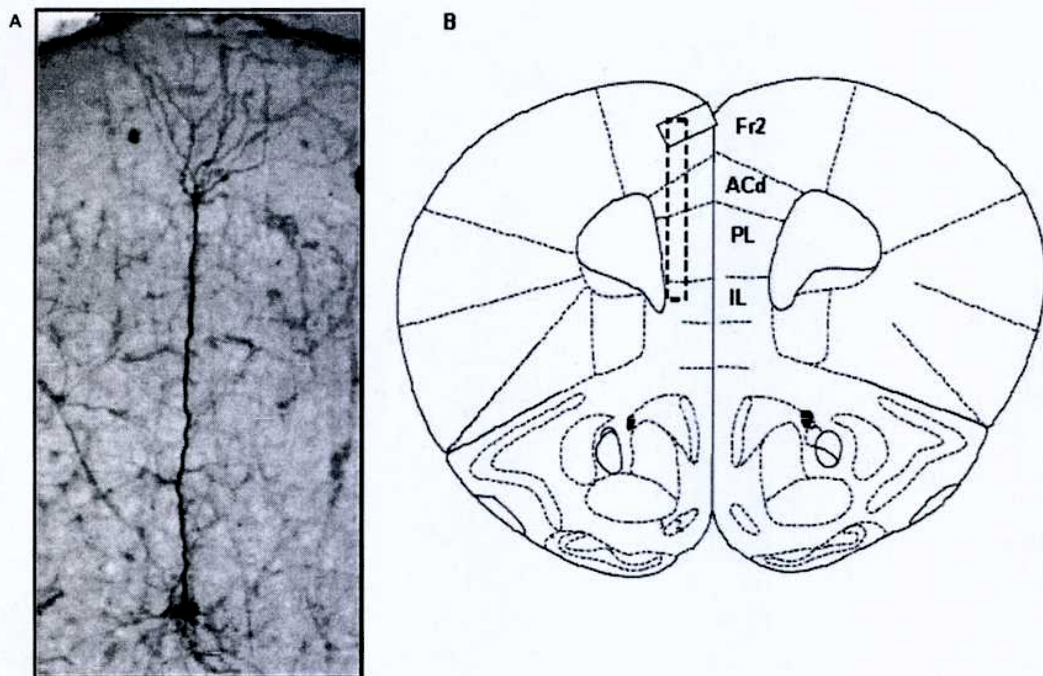
La solución de pipeta (o intracelular) normal tiene la siguiente composición: K-gluconato 120mM, KCl 20, HEPES 10mM, EGTA 0,1mM,  $\text{MgCl}_2$  2mM,  $\text{Na}_2\text{ATP}$  3mM, NaGTP 0,3mM y  $\text{Na}_2$ -creatina fosfato 10mM. Se ajustó el pH a 7.3 con KOH. La osmolaridad fue de 280-290mOsm controlada cada vez que se preparó. La solución de pipeta se preparó cada seis meses y se guardó alicuotada a  $-70^\circ\text{C}$ . En algunos experimentos se utilizó una solución sin creatina fosfato, precursor para la síntesis de ATP. En las células utilizadas para ver morfología se agregó a la solución de pipeta neurobiotina 0,15-0,2%.

# **RESULTADOS**

## Identificación de las NPLV

### *Morfología*

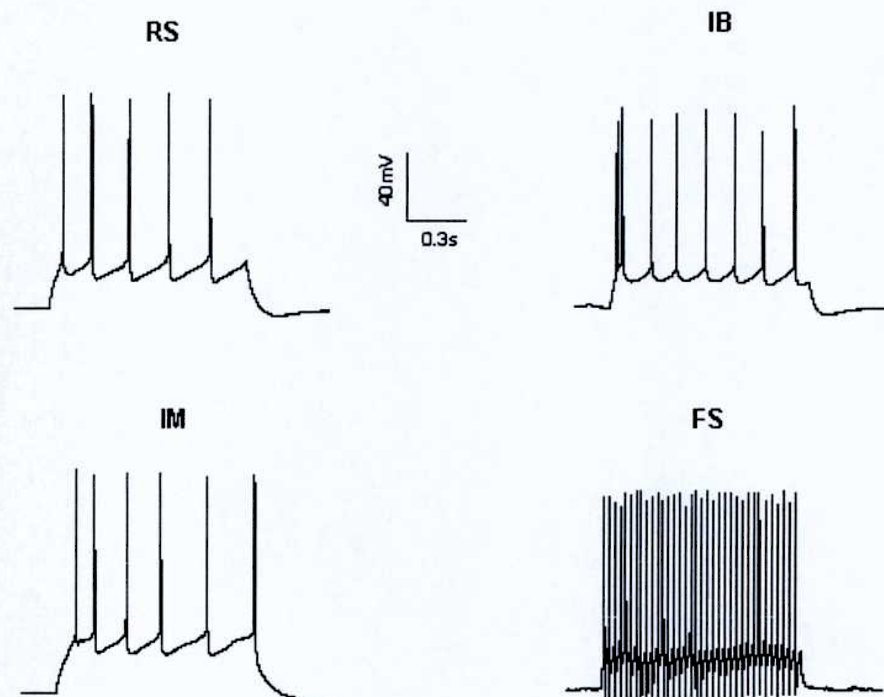
Las neuronas a registrar se ubicaron y eligieron visualmente mediante video-microscopía infrarroja con contraste de interferencia diferencial según el criterio explicado en materiales y métodos. Se tuvo en cuenta la ubicación, tamaño y forma del soma y la orientación de la dendrita apical en la rebanada de tejido. La morfología de veinte neuronas se confirmó post-registro revelando las neuronas registradas con el marcador neurobiotina. Todas las neuronas tuvieron la forma y ubicación de las NPLV, similares a la que se muestra en la figura 15A.



**Figura 15: neurona piramidal de la lámina V revelada con neurobiotina.** A, Neurona piramidal de la corteza prefrontal de ratón marcada con neurobiotina. Se distinguen el soma piramidal y la dendrita apical prominente apuntando a la pia que se ramifica en la lámina I. B, Diagrama de una sección coronal de corteza prefrontal de ratón. El recuadro de línea llena indica la ubicación de la neurona marcada con neurobiotina de B. El recuadro de la línea entrecortada muestra el área de registros. [esquema tomado y modificado de Franklin y Paxinos 2001].

### *Propiedades de disparo de potenciales de acción*

Las NPLV también se identificaron de acuerdo a las características del patrón de disparo de potenciales de acción. Para evocar un tren de potenciales de acción, a cada neurona se le aplicó un pulso de corriente rectangular supraumbral de 1 seg de duración. Las neuronas analizadas dispararon espigas luego de la aplicación de pulsos de entre 40 y 100pA de amplitud. La amplitud del pulso se ajustó en cada neurona con el criterio de obtener entre 5 y 10 potenciales de acción para poder distinguir el patrón de disparo.



**Figura 16: Patrones de disparo encontrados en la corteza prefrontal.** Neuronas piramidales: neurona de disparo regular (RS), neurona de disparo en ráfagas (IB), neurona intermedia (IM). FS, neurona de disparo rápido correspondiente a una de las dos interneuronas gabaérgicas encontradas pero no utilizadas en este trabajo.

Las neuronas registradas se agruparon tres grupos según las características del patrón de disparo: RS, IB e IM (Yang y col., 1996). Se clasificaron 59 neuronas de un total de aproximadamente 300 neuronas registradas y se observó que el 39% eran de disparo regular (RS), el 43% correspondió a neuronas de disparo en ráfaga (IB) y el 18% a intermedias (IM) (figura 16). Durante el desarrollo de este trabajo se encontraron dos neuronas con un patrón de disparo correspondiente a interneuronas gabaérgicas de

disparo rápido (FS) (figura 16). El cuarto tipo de NPLV descrito anteriormente, ROB, no fue observado durante este trabajo.

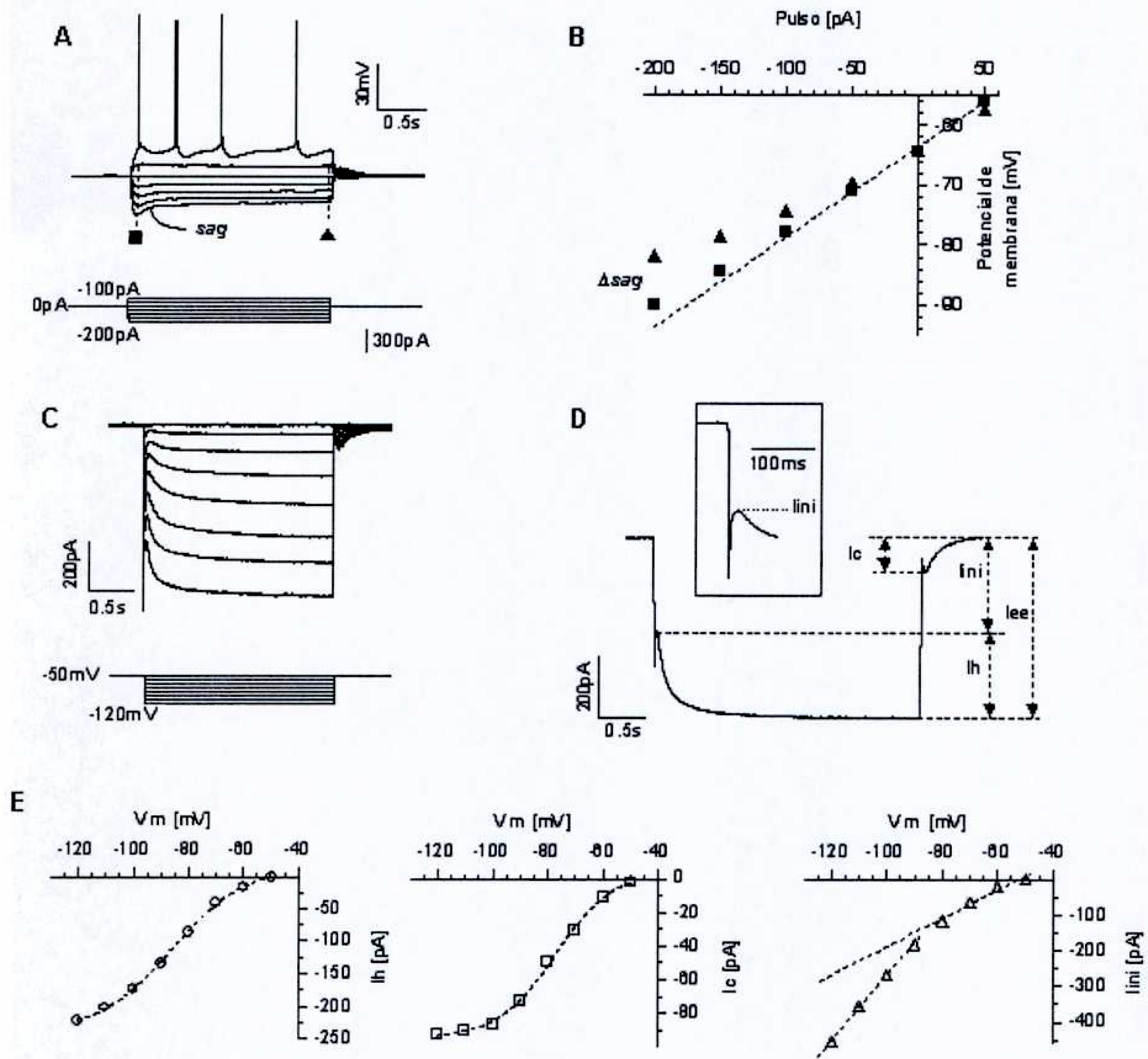
No se encontraron diferencias en el potencial de membrana en reposo ( $V_r$ ), en la resistencia de membrana ( $R_m$ ) ni la capacitancia de membrana ( $C_m$ ) entre los subtipos de neuronas piramidales. Todas las neuronas fueron agrupadas obteniéndose los siguientes valores:  $V_r$ :  $-63.3 \pm 0.5$  mV,  $R_m$   $232 \pm 15$ MOhm y  $C_m$   $115 \pm 15$ pF ( $n=59$ ).

### **Las NPLV poseen al menos dos tipos de corrientes activadas por hiperpolarización**

Se analizó la presencia de corrientes activadas por hiperpolarización en las NPLV utilizando dos protocolos experimentales distintos, uno de fijación de corriente y otro de fijación de voltaje.

#### *Registros en modo fijación de corriente*

Mediante registros de fijación de corriente se registró el potencial de membrana de las neuronas piramidales en condiciones de reposo o durante la aplicación de pulsos de corriente despolarizantes e hiperpolarizantes y se observó el patrón de disparo y la presencia de *sag*. En la figura 17A se ilustran superpuestas las respuestas de una neurona a 7 pulsos de 2s de duración cada uno aplicados a intervalos de 10s. El primer pulso tuvo una amplitud de -200pA incrementándose los siguientes en 50pA hasta superar el umbral de disparo (100pA en este ejemplo). Con pulsos hiperpolarizantes se evidenció en casi todas las neuronas la presencia de un *sag*, característico de las células que poseen la corriente catiónica activada por hiperpolarización  $I_h$  (figura 17A). Los pulsos despolarizantes se aplicaron simplemente para determinar el patrón de disparo de potenciales de acción. Durante los pulsos subumbrales (hiper- y despolarizantes) se midió el potencial de membrana, a dos tiempos distintos correspondientes al pico (■) y en el estado estacionario (▲). Los valores obtenidos se graficaron en función de la amplitud del pulso de corriente aplicando obteniéndose la relación voltaje-corriente (V-I) (figura 17B). La diferencia entre ambas curvas se debe a la desviación de la linealidad (es decir una respuesta no óhmica) del potencial de membrana debido al *sag*.



**Figura 17. Las neuronas piramidales poseen dos componente de la corriente activada por hiperpolarización, rápido y lento.** **A**, registros en modo fijación de corriente donde se observan los cambios del potencial de membrana de una neurona en respuesta a una serie de pulsos de corriente hiperpolarizante y despolarizante. Protocolo de estimulación: se pasaron 7 pulsos de corriente consecutivos a intervalos de 10s, de -200pA a +100pA de amplitud con incrementos de a 50pA y una duración de 2s (trazos inferiores). **B**, relación voltaje-corriente (V-I) tomada a los tiempos indicados con líneas discontinuas de los pulsos subumbrales de la figura A. La diferencia entre ambas curvas ( $\Delta sag$ ) denota la rectificación entrante y se debe a la activación de  $I_h$ . **C**, registros en modo fijación de voltaje donde se observan las corrientes activadas por hiperpolarización evocadas en una neurona por pulsos hiperpolarizantes de voltaje. Protocolo de estimulación: se aplicaron 8 escalones de voltaje consecutivos a intervalos de 10s, de -50mV a -120mV de amplitud con incrementos de -10mV y una duración de 2s (trazos inferiores). **D**, corriente activada por un pulso hiperpolarizante donde se indican como se midieron los distintos componentes de la corriente, el inicial ( $I_{ini}$ ), el componente lento ( $I_h$ ) y la corriente de cola ( $I_c$ ). En el recuadro se muestra un detalle del punto tomado como  $I_{ini}$  luego del transitorio capacitivo, tomado como el comienzo de la activación de  $I_h$ . **E**, relaciones corriente-voltaje (I-V) de  $I_h$  (○),  $I_c$  (□) e  $I_{ini}$  (△) calculados de la figura C.

### *Registros en modo fijación de voltaje*

Para estudiar en forma directa las corrientes de membrana activadas por hiperpolarización se realizaron experimentos utilizando protocolos de fijación de voltaje. La figura 17C ilustra los registros superpuestos de las respuestas de corriente (arriba) evocadas por los pulsos de voltaje (abajo). Las neuronas se mantuvieron a  $-50\text{mV}$ , un potencial al cual  $I_h$  no se encontraría activa. A este potencial las NPLV tampoco disparan potenciales de acción. A partir de  $-50\text{mV}$  se aplicaron 8 pulsos de voltaje hiperpolarizantes de amplitud creciente (en valor absoluto) cada 10s. Cada pulso tuvo una duración de 2s después de los cuales el potencial se regresó a  $-50\text{mV}$ . Los pulsos se incrementaron en  $-10\text{mV}$  cada uno de manera que el último llevó el potencial de membrana a  $-120\text{mV}$ , un valor al cual  $I_h$  se encontraría totalmente activada. En la figura 17D se muestra la corriente total evocada por un pulso hiperpolarizante ( $-110\text{mV}$ ) perteneciente a la serie 17C. Se observa que la corriente activada por hiperpolarización presenta dos componentes: uno rápido inicial y uno de activación lenta posterior. El componente inicial ( $I_{ini}$ ) se midió después del transitorio capacitivo, entre 10ms y 40ms de aplicado el pulso (ver recuadro). El transitorio capacitivo está presente en todos los registros ya que solo pudo ser compensado parcialmente a través del control electrónico del amplificador. La amplitud del componente de activación lenta se calculó como  $I_{ee} - I_{ini}$  y presenta las características de  $I_h$ : corriente entrante de activación lenta que no muestra inactivación. También se puede observar una corriente de cola ( $I_c$ ), que presenta una relajación lenta que correspondería al cierre de los canales que median  $I_h$ .

Para la mayor parte de este trabajo solo se utilizaron células cuyo componente activado por hiperpolarización lento ( $I_h$ ) fue mayor de  $100\text{pA}$ , salvo donde la sección que se indicó expresamente lo contrario. Esto se cumplió incluso en aquellas células que fueron registradas en modo fijación de corriente porque cuando presentaban un sag pequeño se comprobó que tuvieran  $I_h > 100\text{pA}$  en modo fijación de voltaje.

Al graficar la amplitud de estas corrientes en función del valor del pulso de voltaje que les dio origen se obtienen las relaciones corriente-voltaje (I-V). En la figura 17E se muestran las relaciones I-V obtenidas para  $I_h$ ,  $I_c$  e  $I_{ini}$  las cuales fueron calculadas a partir de la serie de corrientes evocadas por pulsos hiperpolarizantes que se muestran en la figura 17C. En la curva I-V de  $I_h$  ( $\circ$ , figura izquierda) se puede ver que la amplitud tiene una dependencia del potencial que pudo ajustarse a una curva sigmoidea (ecuación de Boltzman). La relación I-V de  $I_c$  ( $\square$ , centro) presenta forma

sigmoidea más marcada y también ajusta a esta ecuación.  $I_c$  será utilizada más adelante para estudiar la dependencia del voltaje de  $I_h$ . En la relación I-V calculada para  $I_{ini}$  ( $\Delta$ , derecha) se puede ver una dependencia del voltaje diferente. La amplitud de  $I_{ini}$  no tiende a un valor máximo, sino que a la inversa tiende a aumentar más a potenciales más hiperpolarizados. Se puede ver un aumento de la pendiente aproximadamente a  $-90\text{mV}$ . Debido a que la pendiente de las relaciones I-V representa la conductancia, entonces este cambio indica la activación de una corriente dependiente del voltaje. Este cambio de conductancia del componente rápido a potenciales hiperpolarizados cercanos al potencial de reversión del  $\text{K}^+$  (teóricamente  $-100\text{mV}$ , ver abajo), indicaría la activación de  $I_{kir}$ , la corriente mediada por canales de  $\text{K}^+$  tipo *inwardly rectifying*. Como  $I_{kir}$  posee una activación rápida, su amplitud no pudo ser estimada directamente a partir de los registros, pues se superpone con la corriente de fuga y el transitorio capacitivo del inicio del pulso. Por lo tanto para estimar la amplitud de  $I_{kir}$  se recurrió a experimentos de bloqueo con  $\text{Ba}^{2+}$ .

### **$I_{kir}$ es parte del componente rápido de la corriente activada por hiperpolarización**

Con el objetivo de confirmar la presencia de  $I_{kir}$  en las NPLV se recurrió a aplicaciones del ión  $\text{Ba}^{2+}$  ( $\text{BaCl}_2$ ) en el medio extracelular que, como se mencionó en la introducción, a concentraciones del orden micromolar es un potente y selectivo bloqueante de  $I_{kir}$ . En algunas preparaciones donde se estudió el rol de  $I_h$ , el  $\text{Ba}^{2+}$  fue utilizado a concentraciones más altas ( $0,5\text{-}2\text{mM}$ ) para asegurar el bloqueo de  $I_{kir}$ , sin que por esto  $I_h$  se vea afectada (Mercuri y col., 1995; Gasparini y DiFrancesco, 1999; Funahashi y col., 2003). En otros trabajos la aplicación de concentraciones altas de  $\text{Ba}^{2+}$  también tuvieron un efecto inhibitorio sobre  $I_h$ , como se reportó en motoneuronas (Takahashi, 1990; Bayliss y col., 1994) y recientemente en neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo (van Welie y col., 2005) donde se expresan las subunidades HCN1 y HCN2 como en la corteza cerebral. Por este motivo fue necesario establecer en esta preparación las concentraciones de  $\text{Ba}^{2+}$  capaces de bloquear selectivamente  $I_{kir}$  sin inhibir de  $I_h$ .

Con este objetivo se evaluó la sensibilidad de  $I_h$  e  $I_{kir}$  a distintas concentraciones de  $\text{Ba}^{2+}$  a través de sus curvas I-V. En la figura 18A y 18B se muestra el efecto cuatro concentraciones  $\text{Ba}^{2+}$  ( $50\mu\text{M}$ ,  $200\mu\text{M}$ ,  $500\mu\text{M}$  e  $1000\mu\text{M}$ ) sobre las relaciones I-V de  $I_{ini}$



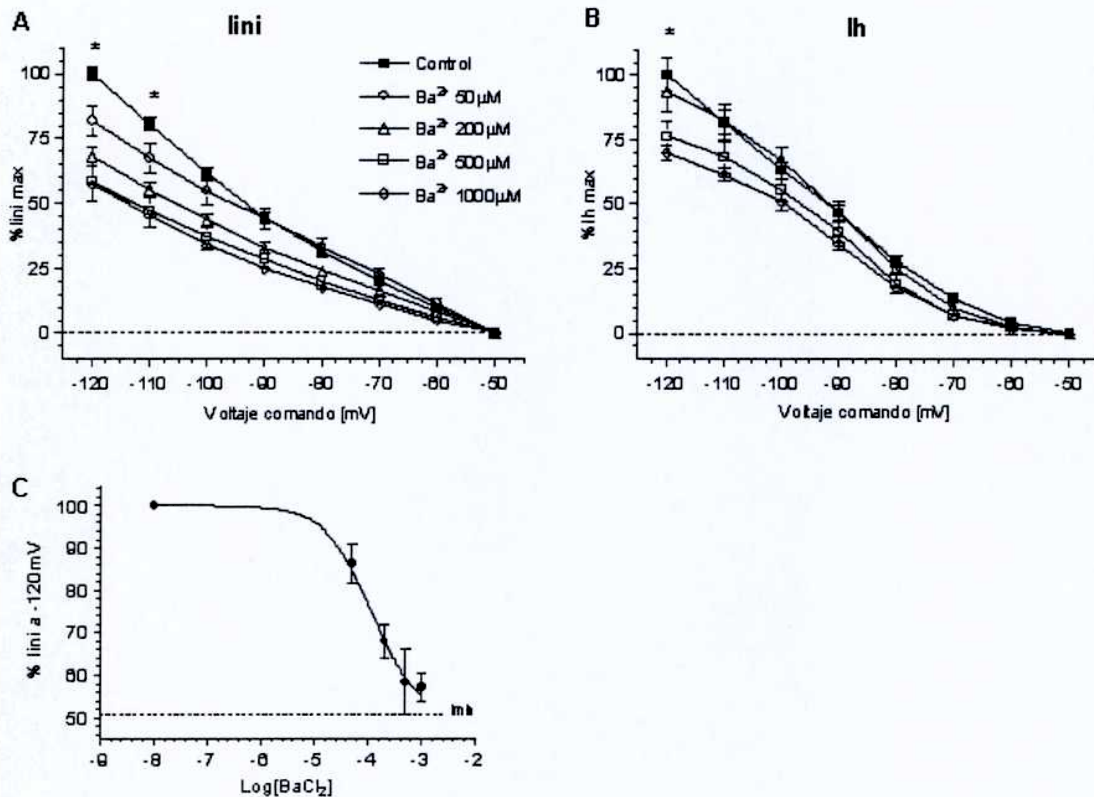
e Ih en 28 células bañadas en BBS conteniendo CNQX 10 $\mu$ M, Bicuculina 10 $\mu$ M y TTX 1 $\mu$ M para bloquear potenciales sinápticos y potenciales de acción. Las curvas I-V se presentan normalizadas al valor del control, obtenido a -120mV. Para cada una de las células estudiadas se realizó una curva I-V control entre los 5 y 10min posteriores al establecimiento del registro, luego se aplicó Ba<sup>2+</sup> a la concentración indicada durante 10min y se realizó otra curva. Los controles de cada corriente se agruparon en una misma curva y las amplitudes de las corrientes de los tratamientos se contrastaron contra las del control para cada pulso de voltaje, utilizando ANOVA de una vía y en caso encontrarse una diferencia significativa el postest de Dunnett para comparar todos los tratamientos con el control.

#### *Ikir se evidencia por su bloqueo a bajas concentraciones Ba<sup>2+</sup>*

La aplicación de Ba<sup>2+</sup> 50 $\mu$ M provocó una reducción significativa de la amplitud de I<sub>ini</sub> para los pulsos de -110 y -120mV llevando la corriente al 84%  $\pm$  6% y 82%  $\pm$  6%, respectivamente ( $p < 0,05$  en ambos casos). Esta inhibición de I<sub>ini</sub> con una concentración baja de Ba<sup>2+</sup> en este rango de voltajes indica sin dudas el bloqueo de canales Kir. Además se puede ver que el Ba<sup>2+</sup> 50 $\mu$ M linealiza la curva I-V de I<sub>ini</sub> (figura 18A, ○), como se espera si se bloquearan canales Kir. Como se desconoce el grado de bloqueo de I<sub>kir</sub> que se logró con esta concentración de Ba<sup>2+</sup> se probaron concentraciones mayores, aunque se sabe que estas también podrían inhibir otras corrientes de K<sup>+</sup>, como la corriente de fuga, I<sub>k<sub>leak</sub></sub> (Coetzee y col., 1999; Day y col., 2005). A concentraciones mayores de Ba<sup>2+</sup> se observó una reducción significativa de la amplitud de I<sub>ini</sub> en casi todo el rango de voltaje (-70 a -120mV) sugiriendo que también se produciría una inhibición sobre la I<sub>k<sub>leak</sub></sub>. La amplitud de I<sub>ini</sub> en presencia de Ba<sup>2+</sup> 200 $\mu$ M fue un 67.9%  $\pm$  3.8% (para el pulso de -120mV) y un 75%  $\pm$  4% (para el pulso de -90mV) de la amplitud de I<sub>ini</sub> en el control. I<sub>ini</sub> se redujo también en presencia de Ba<sup>2+</sup> 500 $\mu$ M en todo el rango de voltajes, llevando la corriente al 58,2%  $\pm$  7,7% en el pulso de -120mV y al 64,8%  $\pm$  5,5% con el pulso de -90mV, respecto del control. La aplicación de Ba<sup>2+</sup> 1mM no aumentó significativamente el bloqueo obtenido con 500 $\mu$ M indicando que se alcanzó el bloqueo máximo.

La reducción de I<sub>ini</sub> provocada por concentraciones medias y altas de Ba<sup>2+</sup>, en todo el rango de potenciales, indica que además de I<sub>kir</sub> se inhibieron corrientes

independientes del voltaje como las corrientes de fuga de  $K^+$   $K_{leak}$ . Consistentemente con estos resultados recientemente se reportó que las NPLV de la CPF de ratón expresan ARNm de canales responsables de  $I_{kir}$  (Kir2.2 y Kir2.3) e  $I_{Kleak}$  (KCNK3 yKCNK9) (Day y col., 2005).



**Figura 18: Efecto de varias concentraciones de  $Ba^{2+}$  sobre  $I_h$  e  $I_{ini}$ .** Curvas I-V normalizadas para  $I_{ini}$  (A) e  $I_h$  (B) calculadas a partir de las corrientes activadas por 8 pulsos hiperpolarizantes como en la figura 17C. Se registraron 28 neuronas antes (■, control) y durante la aplicación de cuatro concentraciones de  $Ba^{2+}$ : 50  $\mu$ M (○, n=6), 200  $\mu$ M (△, n=14), 500  $\mu$ M (□, n=5) y 1000  $\mu$ M (◇, n=3). A, nótese que  $Ba^{2+}$  50  $\mu$ M lineariza la curva reduciendo los valores de  $I_{ini}$  a -120 mV y -110 mV (\*:  $p < 0,05$ ). Para concentraciones mayores la reducción de  $I_{ini}$  es significativa entre -120 mV y -80 mV ( $p < 0,01$ ). B, el  $Ba^{2+}$  tiene efecto sobre  $I_h$  a partir de 500  $\mu$ M a -120 mV (\*:  $p < 0,05$ ). No se muestra la curva de  $Ba^{2+}$  50  $\mu$ M para simplificar el gráfico. C, curva concentración-respuesta de  $I_{ini}$  a -120 mV tomado de la figura A. La inhibición por  $Ba^{2+}$  se ajustó a una ecuación sigmoidea ( $IC_{50}$  de  $113,3 \pm 2,4 \mu$ M). La línea discontinua indica el valor de  $I_{ini}$  al cual tiende la curva para concentraciones altas de  $Ba^{2+}$  (50,4%).

Para estimar la sensibilidad de estas corrientes ( $I_{kir}$  e  $I_{Kleak}$ ) al  $Ba^{2+}$  se construyó una curva de inhibición de  $I_{ini}$  por  $Ba^{2+}$  para el pulso de -120 mV, y se ajustó el gráfico a una función sigmoidea (figura 18C):

$$I = I_{\min} + (I_{\max} - I_{\min}) / (1 + 10^{(\log IC_{50} - \log [Ba^{2+}])})$$

donde  $I_{\max}$  es el 100% medido en ausencia de  $Ba^{2+}$  e  $I_{\min}$  es el valor al que tiende la corriente para altas concentraciones de  $Ba^{2+}$ .  $I_{\min}$ , indicado en línea discontinua, fue del 50,4% indicando que aproximadamente la mitad de la  $I_{\text{ini}}$  observada en NPLV serían corrientes de  $K^+$  sensible a  $Ba^{2+}$ . A partir de esta ecuación se calculó una  $IC_{50}$  de  $113,3 \pm 2,4 \mu\text{M}$ . EL valor obtenido de  $IC_{50}$  es uno o dos órdenes de magnitud mayor que el descripto sobre  $I_{\text{kir}}$  sola en varias preparaciones (Ransom y Sontheimer, 1995; Schram y col., 2003), por lo tanto se puede interpretar como una evidencia de la inhibición de  $I_{\text{k}_{\text{leak}}}$  que presentan  $IC_{50}$  al  $Ba^{2+}$  mayores que  $I_{\text{kir}}$  (Coetzee y col., 1999).

Como los canales Kir2 son rectificadores fuertes se espera que su contribución sea más importante a partir del potencial de reversión del  $K^+$  (Hille, 2001). El potencial de equilibrio de un ión se obtiene de la ecuación de Nerst.

$$E_k = RT/F \ln [K^+]_i / [K^+]_e.$$

Reemplazando los valores para las concentraciones de  $K^+$  utilizadas, y suponiendo una temperatura ambiente de  $25^\circ\text{C}$  se obtiene:

$$E_k = 25\text{mV} \ln [2,5] / [140] = -100,6 \text{ mV}$$

Este valor coincide bastante bien con el potencial al cual aumentó la conductancia (pendiente) de la corriente  $I_{\text{ini}}$  en ausencia de  $Ba^{2+}$  (figura 17E y 18A ■).

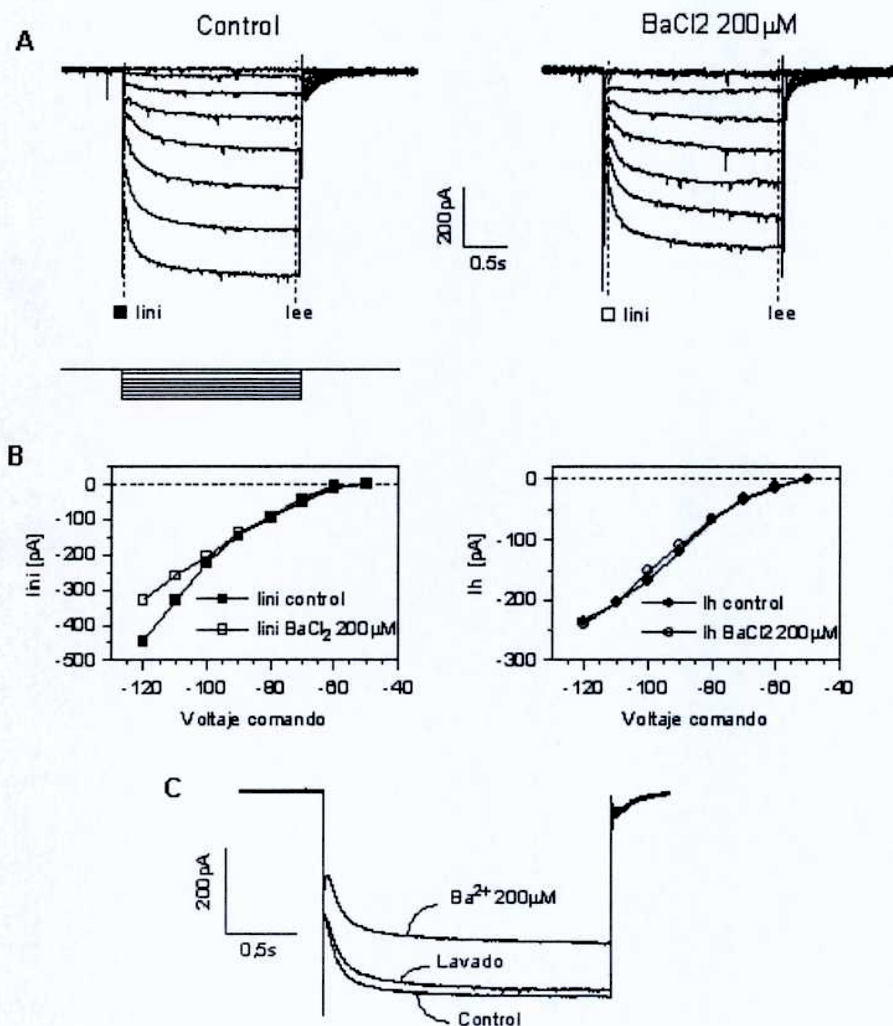
A partir de estos experimentos se desprende que las NPLV poseen  $I_{\text{kir}}$  e  $I_{\text{k}_{\text{leak}}}$ . Si bien  $I_{\text{k}_{\text{leak}}}$  es más probable que contribuya a potenciales cercanos al reposo (ubicado entre  $-60$  y  $-70\text{mV}$ ) es posible que  $I_{\text{kir}}$  también contribuya en un grado menor.

#### *I<sub>h</sub> es sensible a concentraciones altas de Ba<sup>2+</sup>*

Las curvas I-V de  $I_h$  no se vieron afectadas con la aplicación de concentraciones bajas de  $Ba^{2+}$  ( $50 \mu\text{M}$  y  $200 \mu\text{M}$ , figura 18B). Sin embargo, a concentraciones mayores se produjo una reducción moderada de la amplitud de la  $I_h$ . Si bien la inhibición resultó significativa solo a  $-120\text{mV}$  (se redujo  $I_h$  al  $70\% \pm 3\%$ ,  $p < 0,05$ ), parece haber una tendencia similar para todo el rango de voltaje. En base a estos resultados se decidió utilizar  $Ba^{2+}$   $200 \mu\text{M}$  en los experimentos expuestos en las siguientes secciones, ya que sería suficiente para inhibir  $I_{\text{kir}}$  sin afectar  $I_h$ .

En la figura 19A se ilustra una familia de registros de fijación de voltaje representativa mostrando el efecto de  $Ba^{2+}$   $200 \mu\text{M}$  sobre las corrientes activadas por

hiperpolarización en una neurona bañada en BBS sin bloqueantes adicionales. A partir de estas corrientes se calcularon las curvas I-V para  $I_{ini}$  (figura 19B izquierda, cuadrados) e  $I_h$  (figura 19B derecha, círculos) obtenidas a los tiempos indicados con línea discontinua. Se observa que la aplicación de  $Ba^{2+}$   $200\mu M$  extracelular redujo la amplitud de  $I_{ini}$  sin afectar  $I_h$ . En esta neurona en particular la reducción de  $I_{ini}$  se produjo solo a potenciales hiperpolarizados, pero como se mostró en las curvas I-V promedio de la figura 18, en general para esta concentración de  $Ba^{2+}$   $I_{ini}$  reduce en todo el rango de voltajes. Los efectos del  $Ba^{2+}$  fueron reversibles (figura 19C)



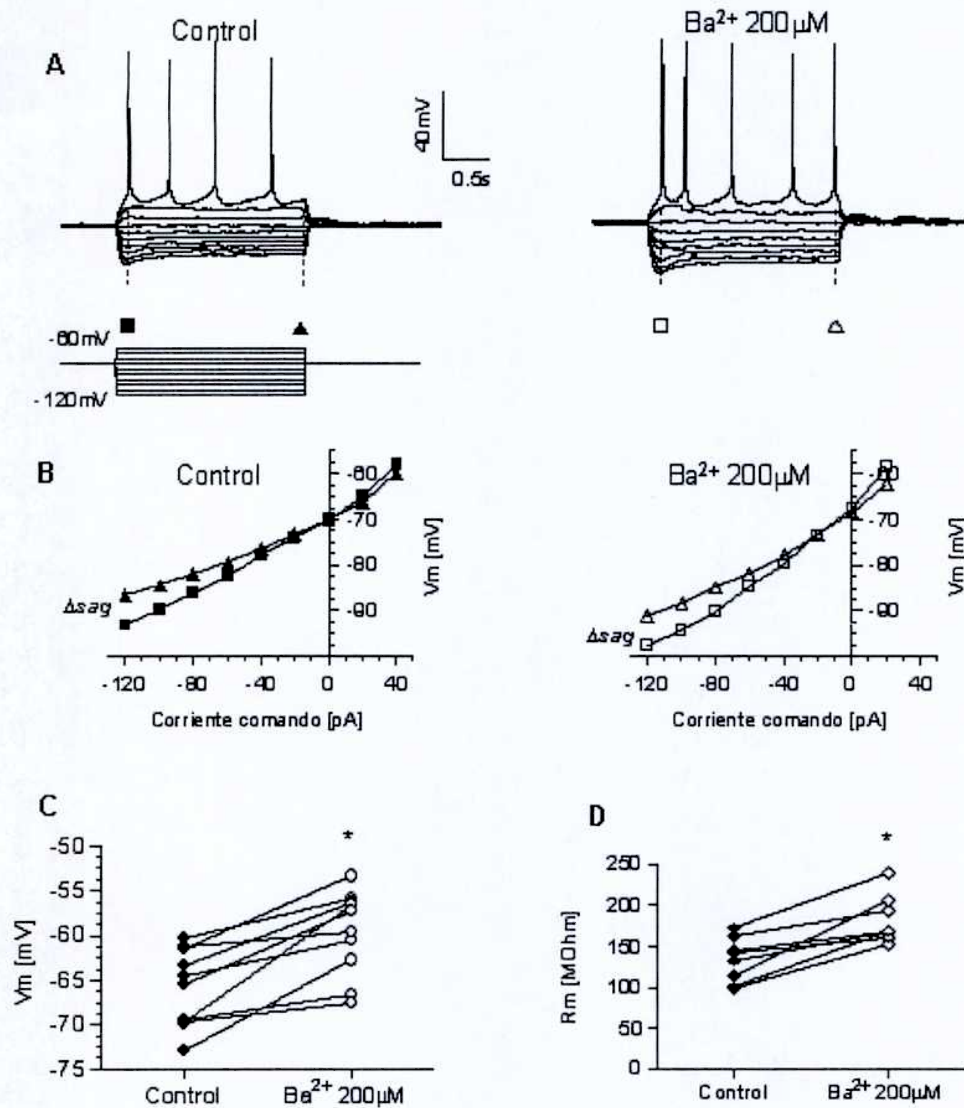
**Figura 19: Efecto de  $Ba^{2+}$   $200\mu M$  sobre  $I_h$  e  $I_{ini}$  en una neurona.** A, corrientes activadas por hiperpolarización de una célula antes (izquierda) y durante la aplicación de  $Ba^{2+}$   $200\mu M$  (derecha). Las corrientes se evocaron utilizando el protocolo de 8 pulsos hiperpolarizantes de  $-50$  mV a  $-120$  mV en modo fijación de voltaje (trazos inferiores). Se indican con línea de puntos  $I_{ini}$  y  $I_{ee}$ . Nótese la presencia de potenciales sinápticos espontáneos debido a que se registró sin CNQX y Bicuculina. B, Relaciones I-V para  $I_{ini}$  (izquierda) e  $I_h$  (derecha) obtenidas de A.  $I_h$  se calculó como  $I_{ee} - I_{ini}$ . C, corriente activada por hiperpolarización ( $-50/-120$  mV) donde se muestra la reversibilidad del efecto del  $Ba^{2+}$   $200\mu M$ .

*Ba<sup>2+</sup> despolariza a las NPLV en reposo y aumenta Rm*

Se analizó el efecto de la aplicación de Ba<sup>2+</sup> 200μM en modo fijación de corriente para ver si es consistente con el bloqueo de I<sub>kir</sub> e I<sub>k<sub>leak</sub></sub> observado en fijación de voltaje. Para ello se estudiaron el potencial de reposo (V<sub>m</sub>), la resistencia de membrana (R<sub>m</sub>), el *sag* y el disparo de potenciales de acción en neuronas registradas en BBS normal sin bloqueantes. Se aplicaron pulsos de corriente desde -120pA hasta evocar un tren de potenciales de acción con incrementos de 20pA, en condiciones control y luego de la adición de Ba<sup>2+</sup> 200μM. En la figura 20A se ilustran los registros obtenidos en una neurona representativa. No se observaron cambios en la forma de los potenciales de acción, indicando que el Ba<sup>2+</sup> a la concentración probada no tiene efecto sobre canales de K<sup>+</sup> que participan de la repolarización. Consistentemente con los resultados previos donde se mostró que no inhibía I<sub>h</sub> la aplicación de Ba<sup>2+</sup> 200μM tampoco afectó el *sag*. Esto se aprecia en las curvas V-I de la figura 20B calculadas de los pulsos subumbrales a los tiempos indicados en A: en el pico del potencial (cuadrados) y en el estado estacionario luego del *sag* (círculos). La diferencia de potencial debida al *sag* (Δ*sag*) observada en el control (izquierda) no se redujo presencia de Ba<sup>2+</sup> (derecha).

El V<sub>m</sub> se midió durante los primeros 200ms del protocolo de estimulación antes de aplicar los pulsos de corriente. La R<sub>m</sub> se calculó a partir de la pendiente de las curvas V-I en la región lineal, normalmente entre los pulsos de -40pA a +20pA. La aplicación de Ba<sup>2+</sup> 200μM provocó una despolarización con respecto del potencial de reposo de 6,2mV, de -65,4 ± 1,7mV a -59,6 ± 2,3mV en 10 de 13 neuronas analizadas (p<0,001, test de "t" pareado) (figura 20C). En las tres neuronas restantes no se observó ningún cambio, como si no tuvieran corrientes sensibles a Ba<sup>2+</sup> 200 en este rango de potenciales. La R<sub>m</sub> aumentó de 133,9 ± 9,7MΩ a 182,4 ± 10,1MΩ en 8 de 10 neuronas analizadas (p<0,001, test de "t" pareado) (figura 20D).

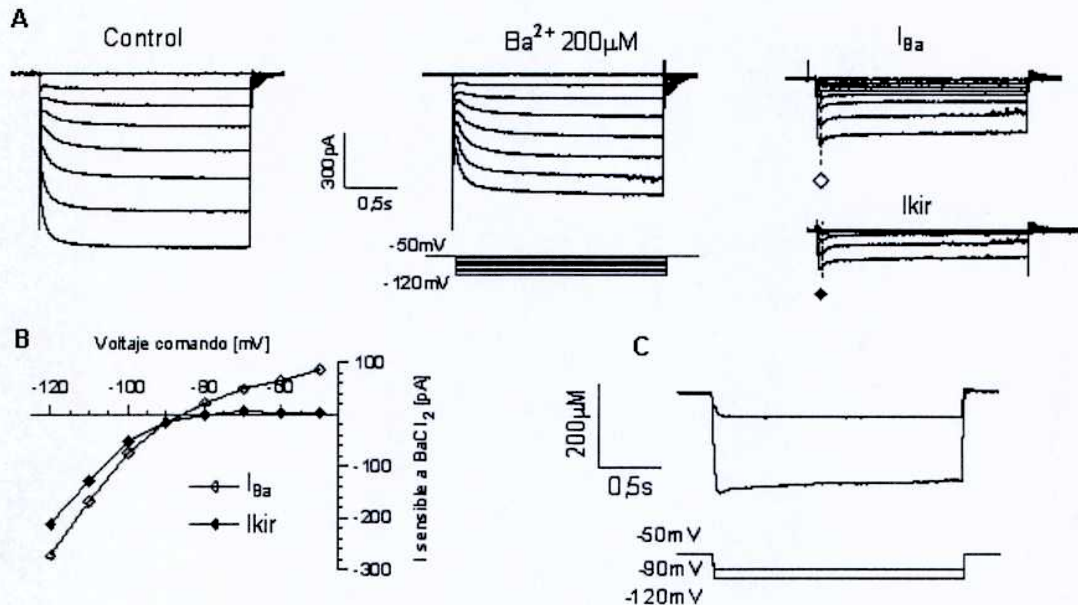
La aplicación de Ba<sup>2+</sup> 200μM produjo un aumento de la excitabilidad, visualizada porque se necesitaron menos pulsos despolarizantes para alcanzar el umbral de disparo (figura 20A). Esta mayor excitabilidad está mediada por una despolarización del potencial de reposo y un aumento de la resistencia de membrana. Estos resultados son consistentes con el bloqueo de canales de K<sup>+</sup> activos en el potencial de reposo como K<sub>leak</sub> y K<sub>ir</sub>.



**Figura 20: Efecto de  $Ba^{2+}$  sobre el potencial de membrana de las NPLV.** A, cambios del potencial de membrana en respuesta a pulsos de corriente hiperpolarizantes y despolarizantes (modo fijación de corriente), que evidencian el sag y el patrón de disparo de potenciales de acción en una neurona en condiciones control (izquierda) o luego de la aplicación  $Ba^{2+}$  200  $\mu M$  extracelular (derecha). Protocolo: pulsos de corriente desde -120 pA con incrementos de 20 pA hasta alcanzar el umbral de disparo (trazos inferiores). B, curvas V-I tomadas en el pico y en el estado estacionario de las respuestas de voltaje subumbral de A (líneas discontinuas). La diferencia entre las curvas representa la amplitud del sag ( $\Delta sag$ ).  $\Delta sag$  no cambia en presencia de  $Ba^{2+}$ . C, el  $Ba^{2+}$  200  $\mu M$  despolarizó el potencial de reposo en 10 de 13 neuronas analizadas ( $p < 0,001$ , test de "t" pareado). D,  $Ba^{2+}$  también aumentó la resistencia de membrana ( $R_m$ ) n 8 de 10 neuronas analizadas ( $p < 0,001$ , test de "t" pareado).

### Estimación de $I_{kir}$

Para aislar el componente de  $I_{ini}$  que corresponde a  $I_{kir}$  se calculó la corriente sensible a  $Ba^{2+}$   $200\mu M$  ( $I_{Ba}$ ) substrayendo de los trazos de las corrientes medidas en condiciones control las corrientes activadas por hiperpolarización en presencia de  $Ba^{2+}$   $200\mu M$ .



**Figura 21: Estimación de  $I_{kir}$  por su sensibilidad a  $Ba^{2+}$   $200\mu M$ .** A, corrientes activadas por hiperpolarización en condiciones control (izquierda) y en presencia de  $Ba^{2+}$   $200\mu M$  (centro). La corriente sensible a  $Ba^{2+}$  ( $I_{Ba}$ ) se calculó por diferencia entre los trazos anteriores (derecha arriba) y luego se le substrajo la corriente de fuga para obtener el componente  $I_{kir}$  dependiente de voltaje (derecha abajo). Se utilizó el protocolo de 8 pulsos de voltaje de  $-50mV$  a  $-120mV$ . B, relaciones I-V calculadas a partir de los trazos de  $I_{Ba}$  ( $\blacklozenge$ ) e  $I_{kir}$  ( $\diamond$ ) de A. C,  $I_{Ba}$  promedio obtenido de 14 neuronas para los pulsos de  $-50/-90mV$  y  $-50/-120mV$ . La amplitud máxima de estas corrientes fue de  $-60,9 \pm 7,6pA$  a  $-90mV$  y  $242,6 \pm 20,5pA$  a  $-120mV$ . El  $t_{90}$  fue  $61ms$  para el pulso de  $-90mV$  y  $35ms$  para el de  $-120mV$ . Estos experimentos fueron realizados en presencia de TTX  $1\mu M$ , CNQX  $10\mu M$  y Bicuculina  $10\mu M$ .

En la figura 21A se muestran las corrientes activadas por hiperpolarización registradas de una misma neurona en condiciones control (izquierda) y en presencia de  $Ba^{2+}$   $200\mu M$  (centro).  $I_{Ba}$  se obtuvo por diferencia de estos registros (derecha arriba). Luego a  $I_{Ba}$  se le restó la corriente de fuga para obtener  $I_{kir}$  dependiente de voltaje (derecha abajo). Para la substracción de la corriente de fuga (definida como el componente independiente del voltaje) se le restó a cada trazo un valor constante

proporcional a la resistencia de membrana calculada por ley de Ohm a partir del primer pulso de la serie (-50/-60mV), al cual no hay activación importante de canales dependientes del voltaje. Se puede ver en las curvas I-V (figura 21B) que tanto  $I_{Ba}$  como  $I_{Kir}$  presentan una mayor conductancia a potenciales negativos respecto -90mV (potencial aproximado donde se produce un incremento de la pendiente). El potencial de reversión de ambas corrientes está entre -80 y -90mV, un valor cercano al  $E_K$  teórico calculado más arriba (~ -100mV).

De esta forma se calcularon las corrientes sensibles a  $Ba^{2+}$  200 $\mu$ M en 14 neuronas para 2 pulsos de voltaje, -50/-90mV y -50/-120mV (figura 21C). La amplitud máxima de estas corrientes fue de  $-60,9 \pm 7,6$ pA a -90mV y  $242,6 \pm 20,5$ pA a -120mV. El tiempo necesario para alcanzar el 90% de la corriente máxima ( $t_{90}$ ), fue 61ms para el pulso de -90mV y 35ms para el de -120mV.

Estos resultados presentan fuertes evidencias de que  $Ba^{2+}$  200 $\mu$ M bloquea  $I_{Kir}$ . Este procedimiento puede ser utilizado para estimar la  $I_{Kir}$  dependiente de voltaje que por su activación rápida se superpone con  $I_{Kleak}$  y por su dependencia del voltaje se superpone con  $I_h$ .

### **$I_h$ es el componente lento de las corrientes activadas por hiperpolarización**

Con el objeto de evaluar si el componente lento de las corrientes activadas por hiperpolarización en las NPLV corresponde a la  $I_h$  se utilizaron los bloqueantes 4-etilfenilamina-1,2-dimetil-6-metilaminopirimidina (ZD7288) y CsCl. ZD7288 ha sido descrito como un bloqueante orgánico de  $I_h$  altamente selectivo (BoSmith y col., 1993; Harris y Constanti, 1995) que actúa del lado interno del canal en forma dependiente del voltaje (Shin y col., 2001). Sin embargo, se han reportado efectos para esta droga que serían independientes del bloqueo de la  $I_h$ , como por ejemplo cambios en la plasticidad sináptica (Chevaleyre y Castillo, 2002). A pesar de esto ZD7288 sigue siendo ampliamente utilizado como bloqueante de  $I_h$  y su especificidad aun es reconocida (Huang y Hsu, 2006; Proenza y Yellen, 2006; Rodrigues y Oertel, 2006).

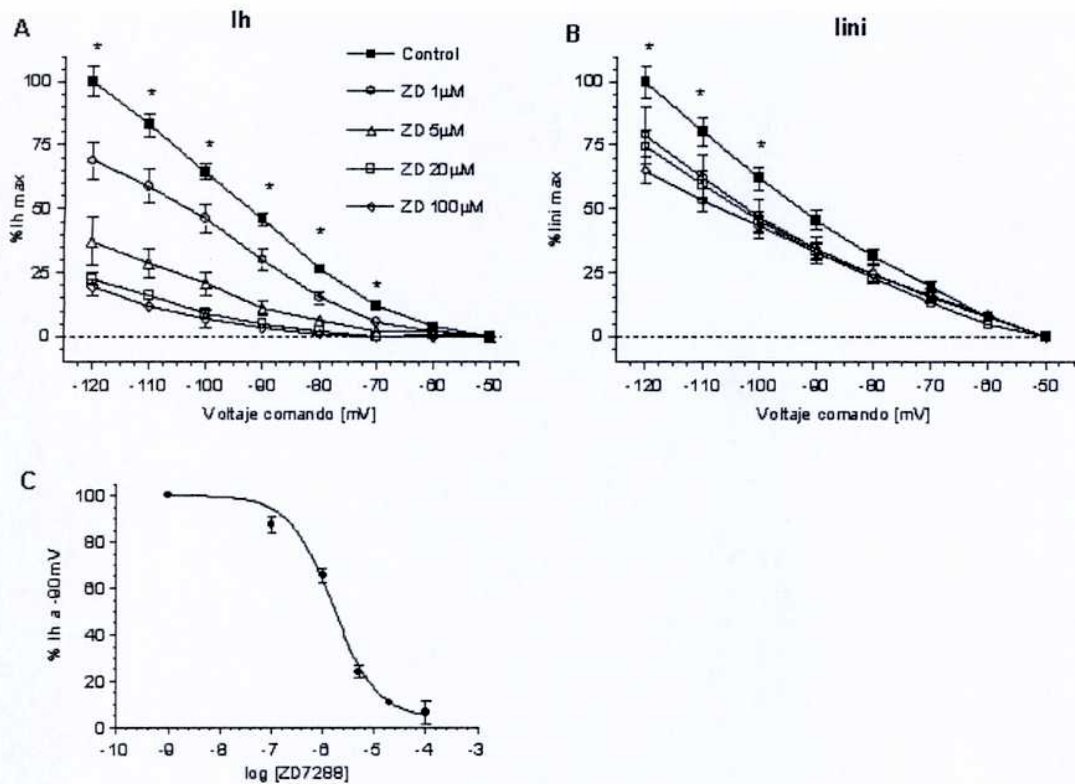
El tiempo de acción del ZD7288 en aplicaciones extracelulares depende de la dosis utilizada y los efectos bloqueantes no son reversibles. Los tiempos de acción son de 5 a 30min o incluso más dependiendo de la dosis (Harris y Constanti, 1995; Satoh y Yamada, 2000).



Se evaluó el efecto de cuatro concentraciones de ZD7288 (1 $\mu$ M, 5 $\mu$ M, 20 $\mu$ M, y 100 $\mu$ M) sobre las curvas I-V calculadas a partir de las corrientes activadas por hiperpolarización  $I_{ini}$  e  $I_h$  obtenidas en modo fijación de voltaje (figura 22). Las corrientes fueron evocadas antes y durante la aplicación de ZD7288 en la solución extracelular. Concidentemente con lo observado en otras preparaciones el efecto no se lavó y a concentraciones de 20 $\mu$ M o mayores el efecto máximo se alcanzó entre 10 y 15min mientras que a concentraciones de 0,1 y 1 $\mu$ M fueron necesarios hasta 30min para llegar al máximo de la respuesta. Los experimentos que se describen a continuación se realizaron en 33 neuronas bañadas en BBS con los siguientes bloqueantes: CNQX 10 $\mu$ M, Bicuculina 10 $\mu$ M, TTX 0,5 $\mu$ M, y Ba<sup>2+</sup> 200 $\mu$ M. Los controles se promediaron en una misma curva y las amplitudes de las corrientes de los tratamientos se contrastaron con las del control en cada pulso de voltaje utilizando ANOVA de una vía y en caso encontrarse una diferencia significativa el postest de Dunnett para comparar todos los tratamientos contra el control.

#### *ZD7288 inhibe el componente lento en forma dosis-dependiente*

En la figura 22A se ilustran curvas I-V de  $I_h$  normalizadas para el control y las cuatro concentraciones de ZD7288. La aplicación de ZD7288 1 $\mu$ M redujo significativamente  $I_h$  al 65,4%  $\pm$  6,2% para el pulso de -90mV y al 68,8%  $\pm$  7,3% a -120mV. Utilizando ZD7288 20 $\mu$ M  $I_h$  se redujo al 10,7%  $\pm$  3,2% para el pulso de -90mV y al 22,3%  $\pm$  2,3% a -120mV. Con esta concentración se alcanzó la inhibición máxima ya que no difiere significativamente de lo observado con ZD7288 100 $\mu$ M. El bloqueo producido por ZD7288 fue menor a voltajes más hiperpolarizados indicando una dependencia del potencial consistente con el mecanismo descrito (Shin y col., 2001). Utilizando los valores de las curvas de  $I_h$  a -90mV se calculó la curva de inhibición del ZD7288. La inhibición de  $I_h$  fue dosis dependiente, con un IC<sub>50</sub> de 1,6 $\mu$ M  $\pm$  0.6 (figura 22C) valor que está en el orden de los obtenidos en otras preparaciones (Gasparini y DiFrancesco, 1997). Se utilizó el pulso -50/-90mV porque está cercano al potencial al cual esta corriente se activa al 50% ( $V_{50}$ ). Estos resultados confirman que el componente lento de la corriente activada por hiperpolarización corresponde a  $I_h$ . En los experimentos subsiguientes de esta tesis se utilizó ZD7288 20 $\mu$ M para bloquear  $I_h$  ya que con esta concentración se logra una efectividad del 90%.



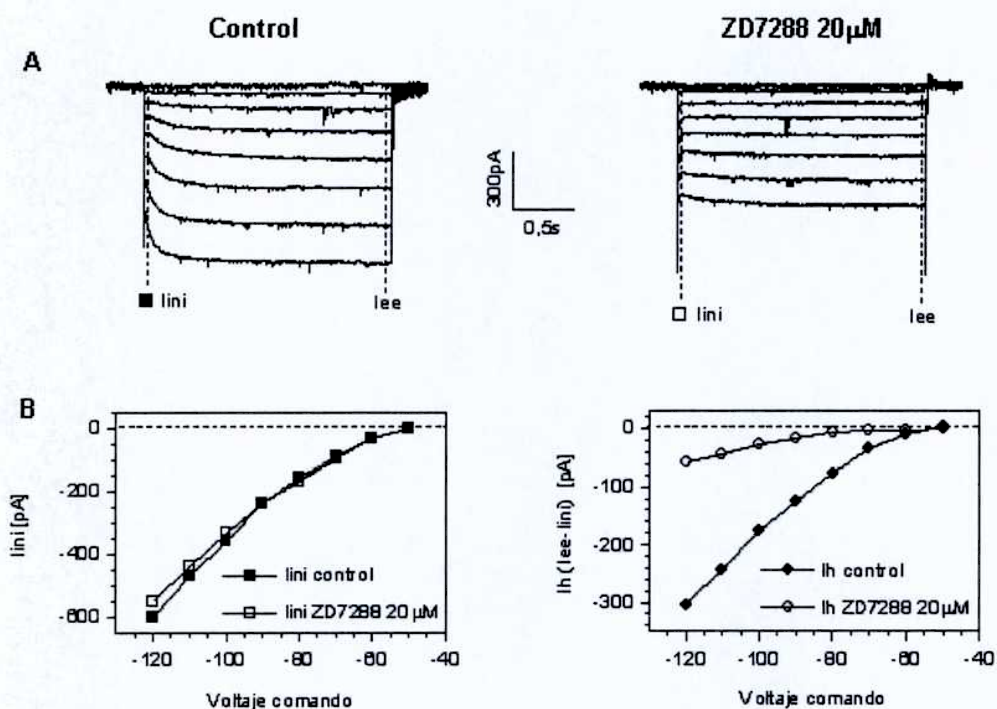
**Figura 22: Efecto de varias concentraciones de ZD7288 sobre  $I_h$  e  $I_{ini}$ .** Curvas I-V normalizadas de  $I_h$  (A) e  $I_{ini}$  (B) calculadas a partir de las corrientes activadas por 8 pulsos hiperpolarizantes de -50mV hasta -120mV con incrementos de -10mV. Se registraron 33 neuronas antes (■, control) y durante la aplicación de varias concentraciones diferentes de ZD7288: 1  $\mu$ M (○, n=6), 5  $\mu$ M (△, n=5), 20  $\mu$ M (□, n=17) y 100  $\mu$ M (◇, n=5). A, La aplicación de ZD7288 1  $\mu$ M produjo una inhibición significativa en casi todo el rango de voltajes (-70mV a -120mV,  $p < 0,05$ ). B, ZD7288 produjo una inhibición significativa entre -120mV y -100mV. No se muestra la curva de ZD7288 5  $\mu$ M para simplificar el gráfico. C, curva concentración-respuesta de  $I_h$  a -90mV tomado de la figura A, salvo ZD7288 0,1  $\mu$ M con el que no se realizaron curvas I-V completas. La inhibición por ZD7288 se ajustó a una ecuación sigmoidea ( $IC_{50} = 1,6 \mu\text{M} \pm 0,6 \mu\text{M}$ ).

### ZD7288 bloquea parcialmente $I_{ini}$

La figura 22B muestra las curvas I-V normalizadas de la corriente  $I_{ini}$  para las cuatro concentraciones de ZD7288 probadas. Se observó una reducción de  $I_{ini}$  en el rango de -80mV a -120mV notoria con 1  $\mu$ M (la menor concentración de ZD7288 utilizada en curvas I-V) y significativa con ZD7288 20  $\mu$ M y 100  $\mu$ M. El ZD7288 20  $\mu$ M redujo  $I_{ini}$  a  $72,8\% \pm 6,5\%$  en el pulso a -90mV y a  $74,4\% \pm 6,6\%$  a -120mV ( $p < 0,01$  ANOVA). Este resultado indica que ZD7288 podría bloquear otras corrientes además de  $I_h$  (Chen, 2004). Alternativamente  $I_h$  podría tener un componente rápido que se

superpone con  $I_{ini}$  (Proenza y col., 2002).

La figura 23A muestra una familia de registros de fijación de voltaje representativa mostrando el efecto del ZD7288  $20\mu\text{M}$  sobre las corrientes activadas por hiperpolarización en una célula bañada en BBS sin bloqueantes adicionales. A partir de las corrientes se calcularon las curvas I-V de  $I_{ini}$  e  $I_h$  obtenidas a los tiempos indicados en línea discontinua. Se observa que la aplicación de ZD7288  $20\mu\text{M}$  extracelular bloqueó el componente lento (figura 23B derecha) con mínimo efecto sobre el componente rápido  $I_{ini}$  (figura 23B izquierda).

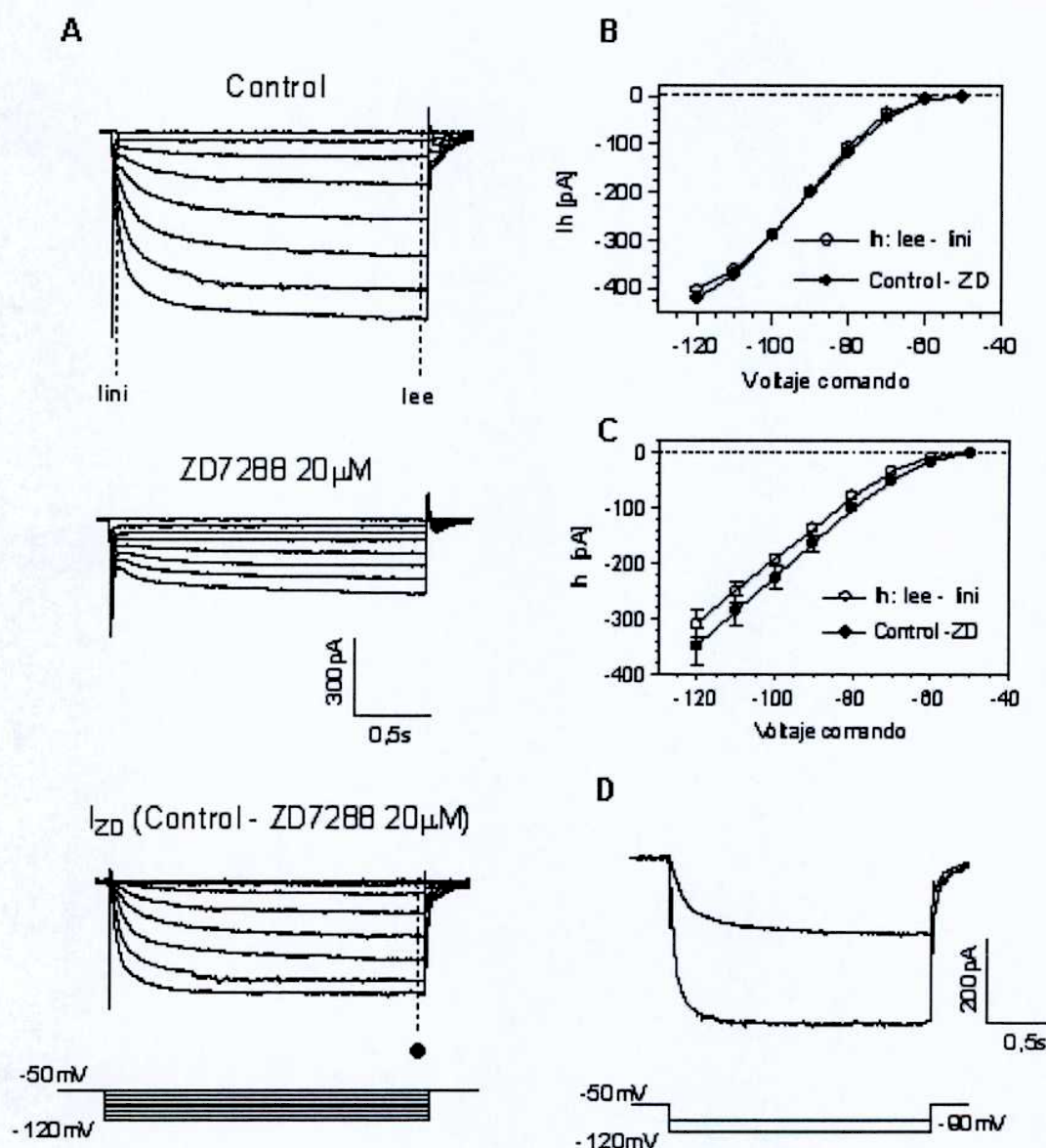


**Figura 23: Efecto de ZD7288  $20\mu\text{M}$  sobre  $I_h$  e  $I_{ini}$  sin bloqueantes adicionales.** A, corrientes activadas por hiperpolarización de una célula con ZD7288  $20\mu\text{M}$  (derecha) o sin ZD7288 (izquierda). Las series de corrientes se evocaron con el protocolo de 8 pulsos hiperpolarizantes de  $-50\text{mV}$  a  $-120\text{mV}$  de 2s de duración en incrementos de  $-10\text{mV}$ . Se indican con línea discontinua  $I_{ini}$  y  $I_{ee}$ . Nótese la presencia de potenciales sinápticos debido a que los registros fueron realizados en ausencia de bloqueantes. B, Relaciones I-V para  $I_{ini}$  (izquierda) e  $I_h$  (derecha) obtenidas de A.  $I_h$  fue calculada como  $I_{ee} - I_{ini}$ .

#### Estimación de $I_h$ como la corriente sensible a ZD7288

Con el propósito de validar el método anteriormente descrito para la medición de  $I_h$  ( $I_{ee} - I_{ini}$ ), se calculó por substracción la corriente sensible a ZD7288  $20\mu\text{M}$  ( $I_{ZD}$ ) y a este resultado se lo comparó con la medidas realizadas para  $I_h$  en las mismas células.

Para ello se evocaron corrientes por pulsos hiperpolarizantes en 17 células bañadas en BBS conteniendo CNQX  $10\mu\text{M}$ , Bicuculina  $10\mu\text{M}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$   $200\mu\text{M}$  y TTX  $1\mu\text{M}$  con el protocolo de pulsos de voltaje de  $-50/-120\text{mV}$ . En la figura 24A se muestran las corrientes activadas por hiperpolarización evocadas en una neurona representativa en condiciones control (arriba) y en presencia de ZD7288  $20\mu\text{M}$  (centro).  $I_{\text{ZD}}$  se calculó por diferencia entre las corrientes control y las corrientes remanentes en presencia de ZD7288 (abajo). A partir de estas corrientes se calcularon las curvas I-V para  $I_{\text{h}}$  e  $I_{\text{ZD}}$  en esta neurona realizando las medidas a los tiempos indicados con líneas discontinuas (figura 24B). De la misma forma se calcularon las curvas I-V promedio de 18 neuronas (figura 24C). Las amplitudes de  $I_{\text{h}}$  e  $I_{\text{ZD}}$  no fueron significativamente distintas en todo el rango de voltajes, sugiriendo que  $I_{\text{h}}$  estaría correctamente estimada utilizando cualquiera de los dos métodos. Debido a esto en los siguientes experimentos de este trabajo  $I_{\text{h}}$  fue medida directamente a partir de la corriente activada por hiperpolarización como  $I_{\text{ee}} - I_{\text{ini}}$ , sin el empleo de ZD7288. En la figura 24D se ilustran 2 corrientes  $I_{\text{ZD}}$  promedio para los pulsos de  $-90\text{mV}$  y  $-120\text{mV}$ . La amplitud promedio de  $I_{\text{ZD}}$  fue de  $184 \pm 16\text{pA}$  para el pulso de  $-90\text{mV}$  y de  $363 \pm 42\text{pA}$  para el de  $-120\text{mV}$ . Los  $t_{90}$  de  $I_{\text{ZD}}$  fueron  $970\text{ms}$  para el pulso de  $-90\text{mV}$  y  $179\text{ms}$  para el de  $-120\text{mV}$ , lo que indica una activación sensiblemente más lenta que  $I_{\text{kir}}$  cuyos  $t_{90}$  fueron  $61\text{ms}$  y  $35\text{ms}$ , respectivamente (figura 21C). Estos tiempos muestran que ambas corrientes tienen tiempos de activación significativamente distintos. Sin embargo esto no permite descartar algún grado de superposición entre  $I_{\text{h}}$  e  $I_{\text{kir}}$ , especialmente durante los instantes iniciales. Para tener una idea de la rapidez de  $I_{\text{ZD}}$  y confirmar cierto grado de superposición con  $I_{\text{kir}}$ , se calcularon las constantes de tiempo para  $I_{\text{ZD}}$ . La activación de  $I_{\text{ZD}}$  ajustó significativamente mejor a ecuaciones biexponenciales con dos constantes de tiempo ( $p < 0,05$ , test de F), una rápida ( $\tau_{\text{R}}$ ) y una lenta ( $\tau_{\text{L}}$ ), que para el pulso de  $-120\text{mV}$  fueron de  $24\text{ms}$  y  $107\text{ms}$ , y para el pulso de  $-90\text{mV}$  fueron  $60\text{ms}$  y  $362\text{ms}$ . Un  $\tau_{\text{R}}$  de  $24\text{ms}$  para  $I_{\text{ZD}}$  es posible que sea lo suficientemente rápido para como para superponerse con  $I_{\text{kir}}$  en vista de que en las mismas condiciones presenta un  $t_{90}$  de  $35\text{ms}$  (figura 21C). Por este motivo se utilizó  $\text{Ba}^{2+}$   $200\mu\text{M}$  en todos los experimentos de caracterización de  $I_{\text{h}}$ .



**Figura 24: Estimación de  $I_h$  en base a la sensibilidad al ZD7288.** A, corrientes activadas por hiperpolarización en una célula representativa. Arriba: corrientes control. Centro: en presencia ZD7288  $20\mu\text{M}$ . Abajo: corrientes sensibles a ZD7288  $20\mu\text{M}$  ( $I_{ZD}$ ) calculadas como control menos ZD7288. Protocolo: 8 pulsos de voltaje de  $-50$  a  $-120\text{mV}$  de  $2\text{s}$  de duración con incrementos de  $-10\text{mV}$  a intervalos de  $10\text{s}$ . B, curvas I-V de  $I_h$  ( $\circ$ , lee - Iini) e  $I_{ZD}$  ( $\bullet$ ) de las corrientes mostradas en A, a los tiempos indicados en línea discontinua. C, curvas I-V de  $I_h$  e  $I_{ZD}$  promedio de 17 células. Las amplitudes no fueron significativamente diferentes. D, estimación de  $I_{ZD}$  promedio para dos pulsos de voltaje,  $-50/90$  y  $-50/-120\text{mV}$ . La amplitud máxima fue  $184,4 \pm 16\text{pA}$  y  $362,8 \pm 42\text{pA}$  para  $-90\text{mV}$  y  $-120\text{mV}$ , respectivamente. El  $t_{90}$  fue de  $970\text{ms}$  y  $179\text{ms}$  para los pulsos a  $-90\text{mV}$  y  $-120\text{mV}$ , respectivamente. Estos experimentos fueron realizados en presencia de CNQX  $10\mu\text{M}$ , Bicuculina  $10\mu\text{M}$ , TTX  $1\mu\text{M}$  y  $\text{Ba}^{2+}$   $200\mu\text{M}$ .

*Ih contribuye al potencial de reposo en las NPLV*

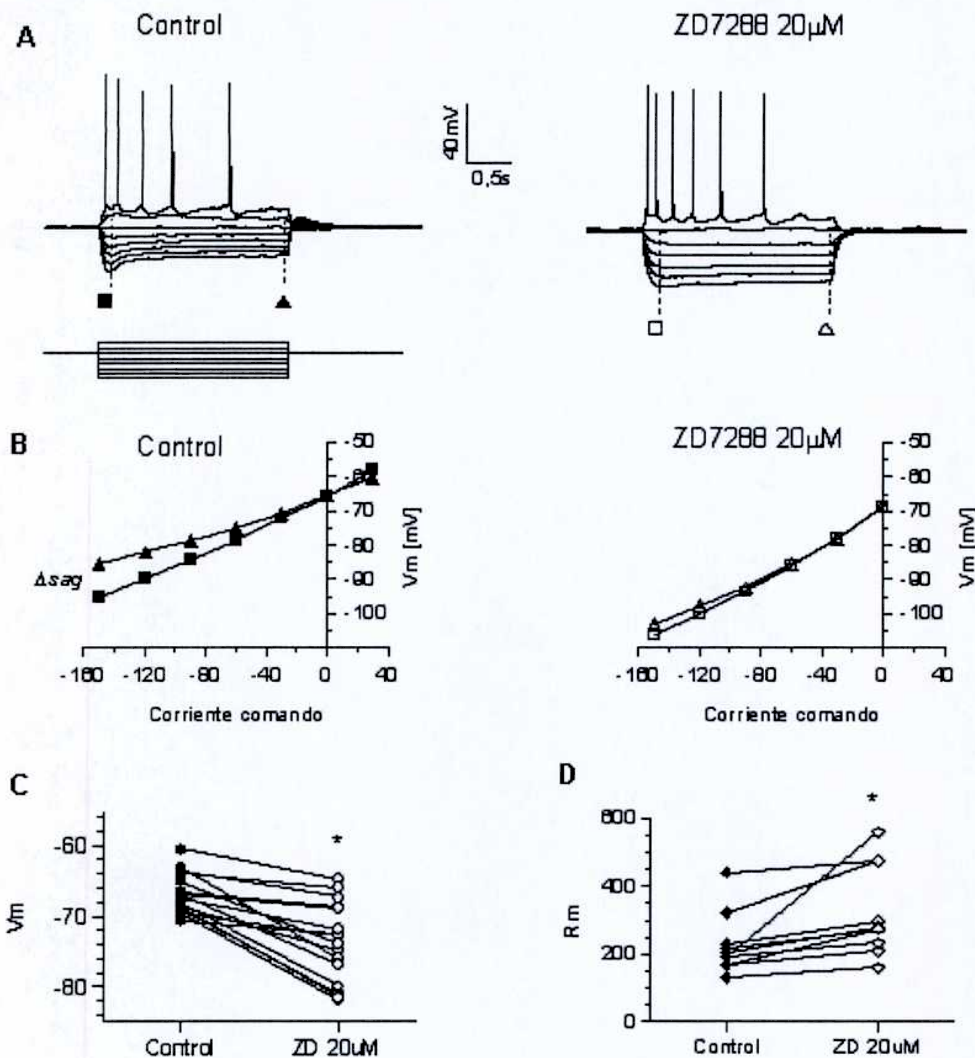
Para estudiar una posible contribución de  $I_h$  al potencial de reposo se analizaron los efectos de ZD7288 y  $Cs^+$  sobre el potencial de membrana en condiciones de reposo y durante la respuesta a pulsos de corriente en modo fijación de corriente. Se analizó el efecto de ZD7288  $20\mu M$  sobre neuronas registradas en BBS normal sin bloqueantes en las que se observó el patrón de disparo de potenciales de acción, el *sag*, el potencial de reposo ( $V_m$ ), y la resistencia de membrana ( $R_m$ ). Se aplicaron pulsos de corriente desde  $-120pA$  con incrementos de  $20pA$  hasta evocar un tren de potenciales de acción en condiciones control y luego de la aplicación de ZD7288  $20\mu M$  en 20 neuronas. Como se observa en una neurona representativa no se encontraron cambios en la forma de los potenciales de acción pero sí se inhibió el *sag* (figura 25A).

Se construyeron las curvas V-I (figura 25B) a partir de los trazos de A en los tiempos indicados en línea discontinua y se puede ver cómo ZD7288 inhibió la diferencia de potencial debida al *sag* ( $\Delta sag$ ). El  $V_m$  se midió durante los primeros 200ms del protocolo de estimulación antes de aplicar los pulsos de corriente (figura 25A) y la  $R_m$  se obtuvo de la región lineal de las curvas V-I normalmente entre los pulsos de  $-40pA$  a  $+20pA$ .

La aplicación de ZD7288  $20\mu M$  provocó una hiperpolarización significativa de  $6,9mV$  en 16 de 20 neuronas analizadas en estas condiciones (figura 25C izquierda) (de  $-66,8 \pm 0,7mV$  a  $-73,7 \pm 1,4mV$ ,  $p < 0,0001$  test de "t" para muestras pareadas). En las 4 neuronas restantes el ZD7288 produjo una leve despolarización de  $2,6mV$  (de  $-63,8 \pm 1,3mV$  a  $-61,2 \pm 1,7mV$ ,  $p = 0,023$  con el test de "t" para muestras pareadas). El efecto del  $CsCl$   $3mM$  se probó en 5 neuronas en las que produjo también una hiperpolarización significativa de  $6mV$  llevando el  $V_m$  de  $-66,4 \pm 1,2mV$  a  $-72,4 \pm 0,8mV$  ( $p = 0,0004$  test de "t" para muestras pareadas, datos no mostrados).

La aplicación de ZD7288  $20\mu M$  también aumentó la  $R_m$  de  $225 \pm 29M\Omega$  en condiciones control a  $324 \pm 42M\Omega$  en 10 de 15 neuronas analizadas ( $p = 0,014$  test de "t" para muestras pareadas) (figura 25C derecha). En las restantes 5 neuronas no se observaron cambios significativos.

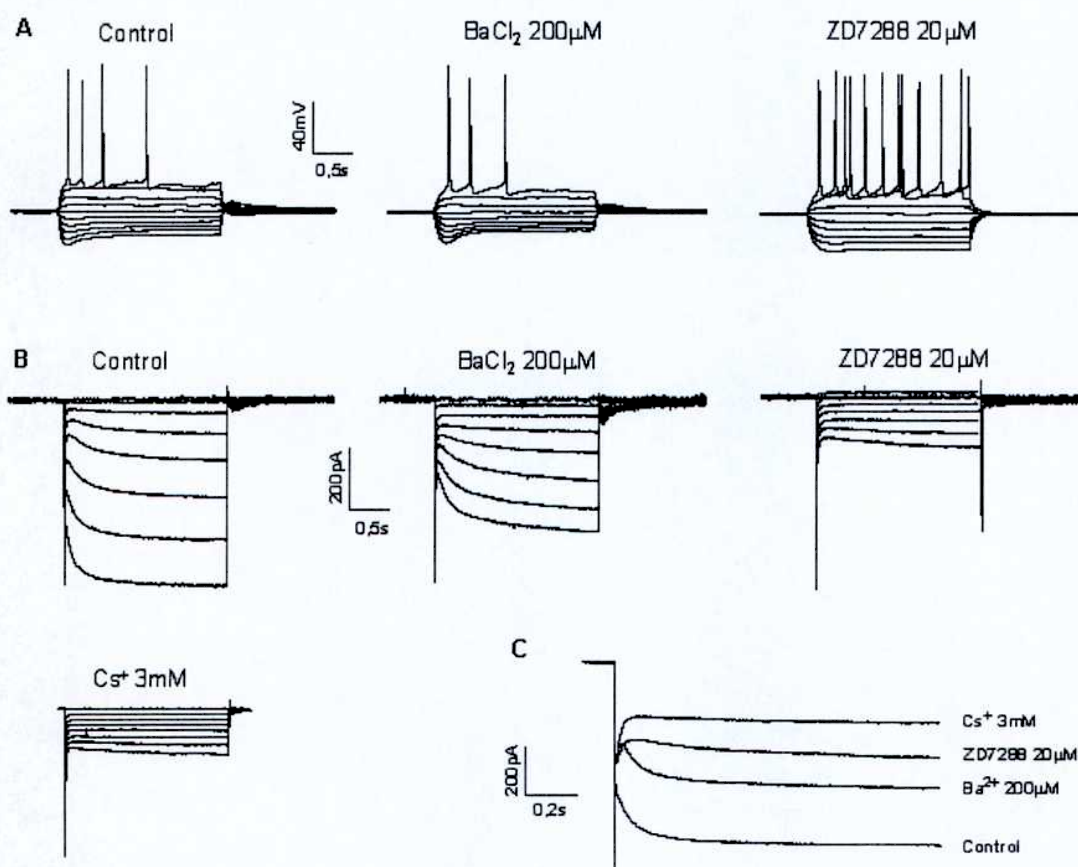
Los efectos hiperpolarizantes provocados por ZD7288 y  $Cs^+$  confirman que  $I_h$  está parcialmente activa en el potencial de reposo y contribuye a su mantenimiento en las NPLV de la corteza prefrontal de ratón.



**Figura 25: Efecto del ZD7288 sobre el potencial de membrana.** A, potencial de membrana de una neurona en respuesta a pulsos hiper- y despolarizantes en condiciones control y durante la aplicación de ZD7288 20  $\mu\text{M}$  que inhibió el sag y no cambió los potenciales de acción. Las 20 neuronas analizadas mostraron resultados similares. El protocolo consistió en una serie de pulsos de corriente desde -120 pA hasta superar el umbral de disparo en incrementos de 20 pA. B, curvas V-I tomadas en el pico y en el estado estacionario de las respuestas de voltaje subumbrales de A (líneas discontinuas). El ZD7288 inhibió el sag (derecha). C, hiperpolarización inducida por ZD7288 en 16 neuronas ( $p < 0,001$ , test de "t" para muestras pareadas). D, la aplicación de ZD7288 también aumentó la  $R_m$  ( $p = 0,014$ , test de "t" para muestras pareadas).

*Inhibición de  $I_h$  e  $I_{Kir}$  por aplicación sucesiva de los bloqueantes en una misma célula*

$Ba^{2+}$  y ZD7288 pueden ser aplicados sobre una misma célula para bloquear secuencialmente  $I_{Kir}$  e  $I_h$ . En la figura 26 se ilustra el efecto de aplicaciones consecutivas de  $Ba^{2+}$  200 $\mu$ M (centro) y ZD7288 20 $\mu$ M (derecha) sobre el *sag* y los potenciales de acción (figura 26A) y sobre las corrientes activadas por hiperpolarización (figura 26B). También se muestra la aplicación del bloqueante de ambas corrientes  $Cs^+$  3mM sobre las corrientes (figura 26B inferior).



**Figura 26:**  $Ba^{2+}$ , ZD7288 y  $Cs^+$  aplicados consecutivamente en una célula. **A**, se observa en modo fijación de corriente el patrón de disparo y el *sag* con  $Ba^{2+}$  200 $\mu$ M y ZD7288 20 $\mu$ M. **B**, corrientes activadas por los pulsos hiperpolarizantes en modo fijación de voltaje en condiciones control (izquierda) en presencia de  $Ba^{2+}$  (centro), ZD7288 (derecha) y  $Cs^+$  3mM (abajo). **C**, ampliación de la corriente activada por un pulso de -50/-120mV con la aplicación sucesiva de los tres bloqueantes.



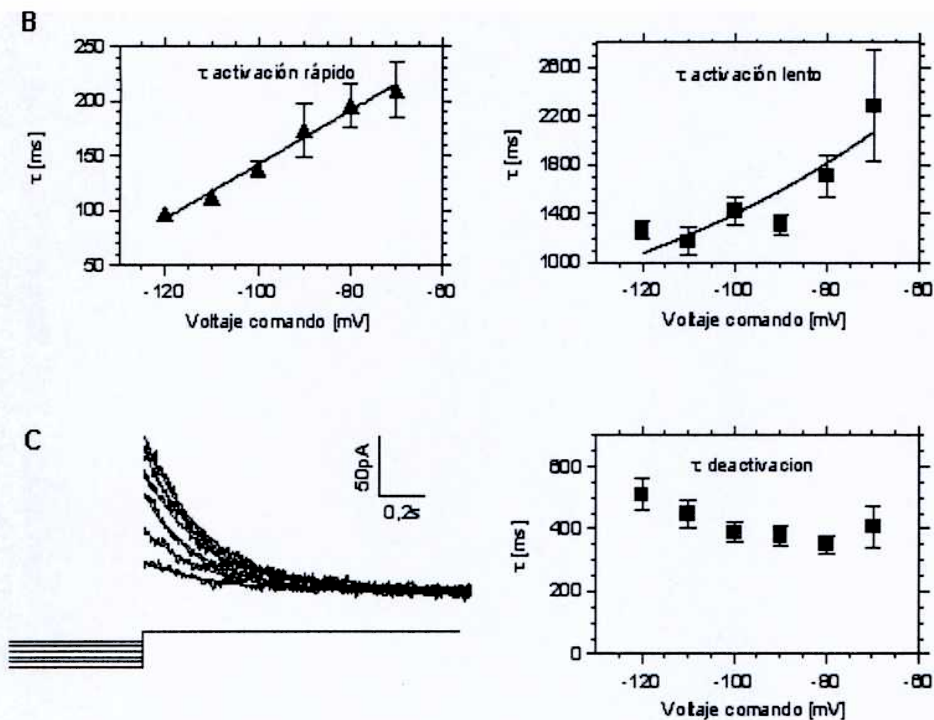
En la figura 26C se muestran el detalle de la aplicación sucesiva de  $Ba^{2+}$  200 $\mu$ M, ZD7288 20 $\mu$ M y  $Cs^+$  3mM sobre la corriente evocada por un pulso de -50/-120mV otra neurona. Se observa como  $Ba^{2+}$  inhibió el componente rápido, ZD7288 el componente lento, y  $Cs^+$  inhibió aún más ambos componentes, especialmente  $I_{ini}$ , y el remanente de  $I_h$  no bloqueado por ZD7288. El bloqueo adicional de  $Cs^+$  sobre  $I_{ini}$  indica el bloqueo incompleto de  $I_{k_{leak}}$  con  $Ba^{2+}$ , mientras que el efecto de  $Cs^+$  sobre  $I_h$  es consistente con que ZD7288 20 $\mu$ M bloquee entre un 80 y 90% la  $I_h$  (figura 22), confirmado con curvas I-V de  $I_h$  con la aplicación consecutiva de ambos bloqueantes (datos no mostrados).

### Caracterización de $I_h$

En esta sección se caracterizaron las propiedades biofísicas de  $I_h$  de las NPLV utilizando distintos protocolos de registro en el modo fijación de voltaje. Como se explicó en los métodos este tipo de registros son influenciados considerablemente por el valor de la resistencia en serie ( $R_s$ ) de cada experimento (Sakmann, 1995). Por esta razón, para estudiar las propiedades biofísicas de  $I_h$  se tomaron dos recaudos adicionales que reducen el error de la fijación de voltaje por un lado se compensó la resistencia en serie entre un 60 y 70% y por el otro lado se usaron bloqueantes de canales dependientes de voltaje como TTX 0,5 $\mu$ M para canales de  $Na^+$ , TEA 10mM, 4-AP 2mM,  $Ba^{2+}$  200 $\mu$ M para canales de  $K^+$  y  $NiCl_2$  200 $\mu$ M y  $CdCl_2$  100 $\mu$ M para canales de  $Ca^{2+}$ . El bloqueo de estos canales además de contribuir al aislamiento de  $I_h$ , hacen la neurona eléctricamente más compacta facilitando la fijación de voltaje. De todas formas debido a la imposibilidad de controlar el voltaje en las dendritas lejanas, donde los canales HNC se encontrarían más concentrados, es inevitable que los valores obtenidos subestimen los valores reales. Los datos obtenidos en esta sección se resumen en la tabla 1 mostrada al final.

#### *Cinética de $I_h$*

La cinética y la amplitud de  $I_h$  en una neurona son importantes para entender en que medida y en que rangos de tiempo esta corriente puede contribuir a los cambios de potencial. La activación de  $I_h$  presentó su forma sigmoidea característica debida al retraso inicial (*delay*) de algunos milisegundos, luego del cual se activa exponencialmente.



**Figura 27: Activación y deactivación de  $I_h$ .** A, la activación de  $I_h$  se ajustó a ecuaciones biexponenciales (líneas rojas). El ajuste se realizó entre las líneas discontinuas verticales (izquierda). La amplitud de  $I_h$  se midió entre  $I_{ini}$  y el valor  $C$  calculado de las ecuaciones. Para obtener las constantes de activación a varios potenciales (derecha)  $I_h$  se aplicó el protocolo de 8 pulsos de -50 a -120mV. B, gráficos de las constantes de activación ( $\tau$ ) en función del voltaje.  $\tau_R$  (izquierda) mostró una fuerte correlación (Pearson  $r = 0,993$ ,  $p < 0,0001$ ) con una dependencia lineal del voltaje.  $\tau_L$  (derecha) tuvo una correlación moderada (Pearson  $r = 0,85$ ,  $p < 0,032$ ) con una dependencia exponencial de voltaje. C, la deactivación ajustó bien a una exponencial simple.  $\tau$  se calculó de las corrientes de cola al cierre del mismo protocolo (izquierda, nótese que las corrientes están invertidas a fin de poder ajustar el decaimiento exponencial). Derecha: la  $\tau$  de deactivación no presentó correlación significativa con el voltaje.

En ningún caso se observó inactivación mientras se mantuvo en pulso hiperpolarizante. Para determinar la amplitud de  $I_h$  y sus cinéticas de activación y deactivación se ajustó el curso temporal de estas corrientes a ecuaciones exponenciales. La activación se ajustó luego del *delay* hasta el estado estacionario como se indica con las líneas discontinuas verticales de la figura 27A, y fue descripta significativamente

mejor en casi todos los casos por ecuaciones biexponenciales de la forma:

$$f(t) = A_R e^{-t/\tau_R} + A_L e^{-t/\tau_L} - C$$

dónde  $\tau_R$  y  $\tau_L$  son las constantes de tiempo rápida y lenta, y  $C$  es el valor máximo al que tiende la corriente total.

El valor de  $C$  fue utilizado para calcular la amplitud de  $I_h$  como  $C - I_{ini}$ . De esta forma la amplitud media de  $I_h$  fue de  $219 \pm 16$  pA y  $440 \pm 35$  pA para los pulsos de  $-90$  mV y de  $-120$  mV, respectivamente. Las constantes de activación obtenidas fueron  $169 \pm 28$  ms ( $\tau_R$ ) y  $1306 \pm 89$  ms ( $\tau_L$ ) para el pulso de  $-50/-90$  mV y  $97 \pm 5$  ms ( $\tau_R$ ) y  $1262 \pm 75$  ms ( $\tau_L$ ) para el pulso de  $-120$  mV. La velocidad de activación aumentó con la amplitud del pulso de voltaje. La constante  $\tau_R$  presentó una fuerte correlación con el voltaje (Pearson  $r = 0,993$ ,  $p < 0,0001$ ) (figura 27B izquierda) mientras que  $\tau_L$  mostró una dependencia menos marcada (Pearson  $r = 0,85$ ,  $p < 0,032$ ) (figura 27B derecha). La proporción de cada componente a la amplitud de  $I_h$  varió con el potencial. A potenciales hasta  $-90$  mV  $\tau_R$  contribuyó con aproximadamente el 50%, mientras que a potenciales más hiperpolarizados su contribución estuvo entre el 60 y 70% de la amplitud de  $I_h$  (datos no mostrados). Para calcular los tiempos de deactivación de  $I_h$  se ajustaron ecuaciones exponenciales a las corrientes de cola. A diferencia de la activación, la deactivación de  $I_h$  ajustó bien a una ecuación exponencial simple. La deactivación no presenta una correlación significativa con el voltaje ( $p = 0,076$ ,  $n = 6$ ) (figura 27C). Las constantes de deactivación fueron  $378 \pm 29$  ms para el pulso de  $-90/-50$  mV y  $508 \pm 50$  ms para el pulso de  $-120/-50$  mV.

Los valores obtenidos para la cinética de activación de  $I_h$  fueron similares a los reportados previamente en la corteza y el hipocampo y consistentes con la expresión de la subunidad HCN1 que en experimentos *in vitro* es la subunidad que rinde constantes de tiempo más rápidas entre las cuatro subunidades de mamíferos conocidas.

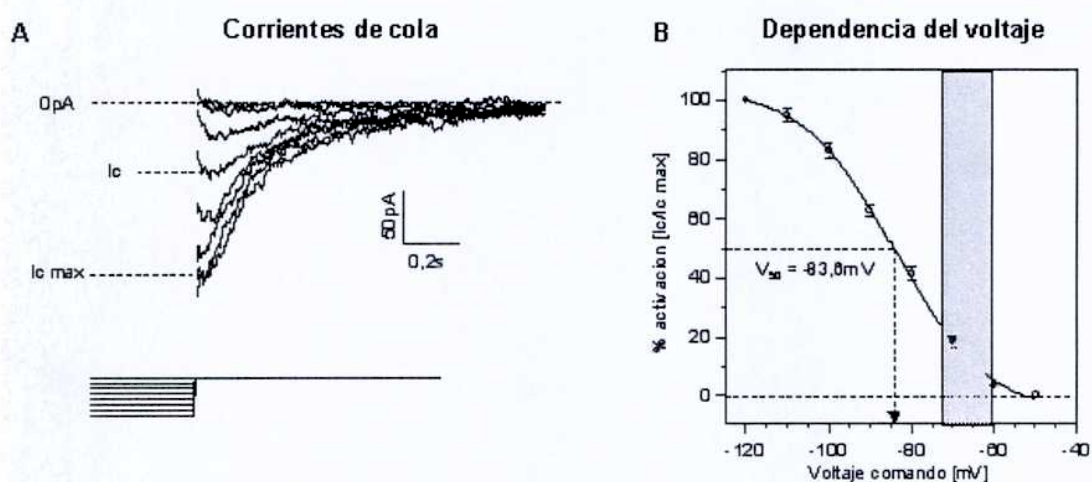
#### *Dependencia del voltaje de $I_h$*

La dependencia del voltaje determina el rango de potenciales de activación y la proporción de  $I_h$  activa a un potencial dado, por lo tanto es importante describir este parámetro para determinar la función que pudiera desempeñar esta corriente en las NPLV. Con el objetivo de estudiar la dependencia del voltaje de  $I_h$  se analizaron sus corrientes de cola ( $I_c$ ) para distintos potenciales de activación en el modo fijación de

voltaje. Para ello se midieron las amplitudes de  $I_c$  al cierre del protocolo de pulsos hiperpolarizantes como se muestra en la figura 28A. En cada una de las 6 células analizadas se normalizaron los valores de  $I_c$  a  $I_c$  máxima. Solo se utilizaron células en las que se pudo distinguir una  $I_c$  cuya amplitud saturó tanto para el pulso de mayor amplitud como en el de menor amplitud. Luego se graficaron las curvas I-V de  $I_c$  y se ajustaron los datos de cada una a la ecuación de Boltzman de donde se obtuvieron los parámetros de la dependencia del voltaje:

$$I = I_{\min} + (I_{\max} - I_{\min}) / (1 + e^{(V_{50} - V_m) / k})$$

De esta ecuación se calculó para cada célula el voltaje al cual  $I_h$  se activó al 50% del máximo ( $V_{50}$ ) y la pendiente de la curva en ese punto ( $k$ ), obteniéndose un  $V_{50}$  promedio de  $83,6 \pm 1\text{mV}$  ( $n = 6$ ) y una pendiente de  $11,4 \pm 0,7$ . En figura 28B se muestran la curva I-V de  $I_c$  normalizada promedio de todas las células y su ajuste a la ecuación de Boltzman. La franja gris señala el rango de potenciales de reposo normales para las NPLV.



**Figura 28: Curva de activación de  $I_h$ .** A corrientes de cola de una célula representativa (arriba) evocadas al cierre de una serie de pulsos hiperpolarizantes de  $-50$  a  $-120\text{mV}$  en incrementos de  $-10\text{mV}$  y nuevamete a  $-50\text{mV}$  (abajo). B, %activación de  $I_c$  en función del voltaje obtenida de las amplitudes relativas de la  $I_c$  de 6 neuronas. El  $V_{50}$  fue  $83,6 \pm 1\text{mV}$  y la pendiente fue  $11,4 \pm 0,7$ . La región gris es el rango de potenciales de reposo de las NPLV.

Estos experimentos muestran que  $I_h$  comienza a activarse entre  $-50$  y  $-60\text{mV}$  llegando a una activación de entre el 5 y 20% al potencial de reposo, lo que explica su contribución al mantenimiento del mismo. La pendiente ( $k$ ) está en el rango de las

obtenidas en otros trabajos (4-13) pero es de las más altas, indicando una fuerte dependencia del voltaje. Esto significa que pequeños cambios de voltaje provocan una activación importante de la corriente, coherente con un valor de  $V_{50}$  bastante positivo y cercano al potencial de reposo.

#### *Estimación del potencial de reversión de $I_h$*

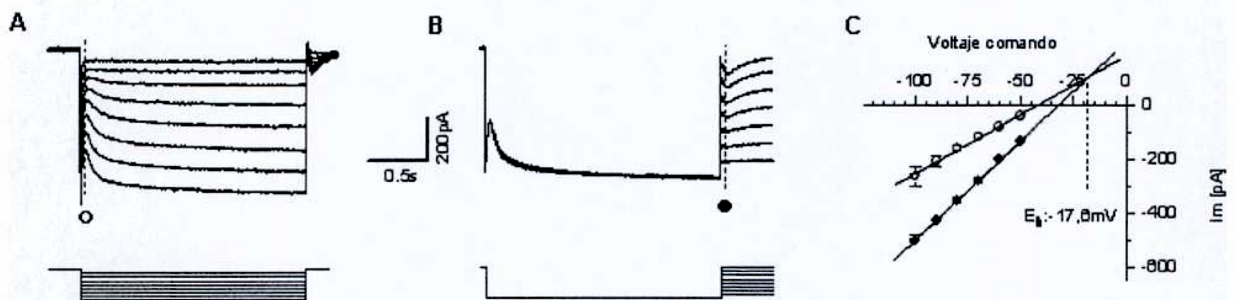
Se estimó el potencial de reversión de  $I_h$  ( $E_{Ih}$ ) utilizando un protocolo de extrapolación como se muestra en la figura 29 (Spain y col., 1987; Bayliss y col., 1994). El procedimiento consiste en calcular la relación I-V instantánea desde dos potenciales en los cuales la contribución de  $I_h$  a la conductancia instantánea sea diferente, por ejemplo -40mV y -120mV. Para ello se utilizaron protocolos similares al descrito anteriormente. El primero fueron 8 pulsos de -40mV a -120mV en incrementos de -10mV retornando luego de 2s a -40mV. En este se midieron las corrientes instantáneas al principio de los pulsos hiperpolarizantes (figura 29A, ○) del mismo modo en que anteriormente se midió  $I_{ini}$ . Estas corrientes representan la conductancia instantánea cuando  $I_h$  aún no está activa. Luego a cada célula se le aplicó un segundo protocolo de 8 pulsos de voltaje que llevan el potencial a -120mV durante 2s para activar totalmente  $I_h$  y luego a otro menor entre -110 y -40mV con escalones de 10mV. En este protocolo se midió la amplitud  $I_c$  a cada escalón de potencial. Las amplitudes de estas corrientes en función del voltaje representan la conductancia instantánea con  $I_h$  totalmente activada (figura 29B, ●). Luego se graficaron las relaciones I-V de ambos protocolos para cada célula y se ajustó la región lineal a una recta (normalmente -100mV a -50mV). El valor de la proyección en el eje x del punto donde se cruzan las rectas ajustadas a los puntos de las relaciones I-V es una estimación del  $E_{Ih}$  en estas células. El  $E_{Ih}$  de cada célula se obtuvo mediante la siguiente fórmula:

$$E_{Ih} = (b_2 - b_1) / (m_1 - m_2)$$

dónde  $b_1$  y  $b_2$  son las ordenadas al origen de las rectas y  $m_1$  y  $m_2$  las pendientes que representa las conductancias con  $I_h$  inactiva (○) o activa (●). De esta forma se obtuvo un potencial de reversión promedio de  $E_{Ih} = -17,6 \pm 2.4$ mV. Este potencial es similar a lo descrito en otras neuronas y es consistente con los valores que se esperan para una corriente mediada por  $K^+$  y  $Na^+$  (Pape, 1996).

La aplicación de este método de estimación del potencial de reversión conlleva la

suposición de que la única conductancia dependiente del voltaje que se activó fue  $I_h$ . La contribución de la corriente de fuga a la conductancia no depende del potencial, así que la diferencia entre las dos relaciones I-V estará dada por el diferente grado de activación de  $I_h$  en cada uno. Otras conductancias cuyos rangos de activación podrían estar dentro del rango de potenciales utilizados fueron bloqueadas como se indicó más arriba. El hecho que las relaciones I-V obtenidas fueran lineales indica que otras conductancias dependientes del voltaje no contribuyen significativamente.



**Figura 29: Estimación del potencial de reversión de  $I_h$ .** A, corrientes activadas por pulsos hiperpolarizantes de -40 a -120mV de donde se midió  $I_{h1}$  (○). B, Deactivación de  $I_h$  entre -120 y -40mV luego de su activación completa a -120mV. Se midió  $I_c$  (●, corriente instantánea antes de la desactivación de  $I_h$ ). C, las curvas I-V de ambas corrientes se ajustaron a una recta. La intersección de ambas rectas extrapolada al eje x representa el potencial de reversión de  $I_h$  ( $-17,6 \pm 2,4$ mV).

### Resumen de propiedades biofísicas

	Amplitud [pA]	$\tau_R$ activación [ms]	$\tau_L$ activación [ms]	$\tau$ desactivación [ms]	$V_{50}$ [mV]	$E_{I_h}$ [mV]
-90mV	$219 \pm 16$ (10)	$169 \pm 28$ (7)	$1306 \pm 89$ (7)	$378 \pm 29$ (6)	$-83,6 \pm$	$-17,6 \pm$
-120mV	$440 \pm 35$ (10)	$97 \pm 5$ (8)	$1262 \pm 75$ (8)	$508 \pm 50$ (6)	$2,4$ (6)	$2,4$ (6)

**Tabla 1: propiedades biofísicas de  $I_h$ .** Se indican los valores obtenidos de amplitud, constantes de tiempo de activación y desactivación para pulsos de -50 a -90mV y -50 a -120mV.  $V_{50}$ : potencial al cual  $I_h$  está un 50% activada.  $E_{I_h}$ : potencial de reversión de  $I_h$ .

## Regulación de I<sub>h</sub> por nucleótidos cíclicos

Como se mencionó en la introducción, una característica distintiva de los canales HCN es su capacidad de ser regulados por nucleótidos cíclicos mediante la interacción *directa* con un dominio intracitoplasmático de unión a nucleótidos cíclicos (CNBD). El AMPc y otros nucleótidos cíclicos facilitan la activación de I<sub>h</sub> corriendo la curva de activación hacia potenciales despolarizados. Se describió en varias preparaciones que el 8Br-AMPc (8-bromo-adenosina monofosfato cíclico), un análogo permeable y no hidrolizable del AMPc, produce el mismo efecto, por ejemplo en neuronas piramidales del hipocampo (Gasparini y DiFrancesco, 1999) y las neuronas talamocorticales (Luthi y McCormick, 1999).

En los experimentos que se presentan a continuación se exploró la posibilidad de que I<sub>h</sub> en NPLV pueda ser regulada por nucleótidos cíclicos utilizando el análogo 8Br-AMPc. Se utilizó este análogo a una concentración de 10 $\mu$ M ya que en neuronas talámicas está reportado que fue 100 veces más potente que el propio AMPc (Luthi y McCormick, 1999). En las pipetas de registro se utilizó una solución intracelular modificada sin Creatina fosfato para que no haya regeneración de ATP, el precursor del AMPc, y reducir la regulación por el AMPc basal.

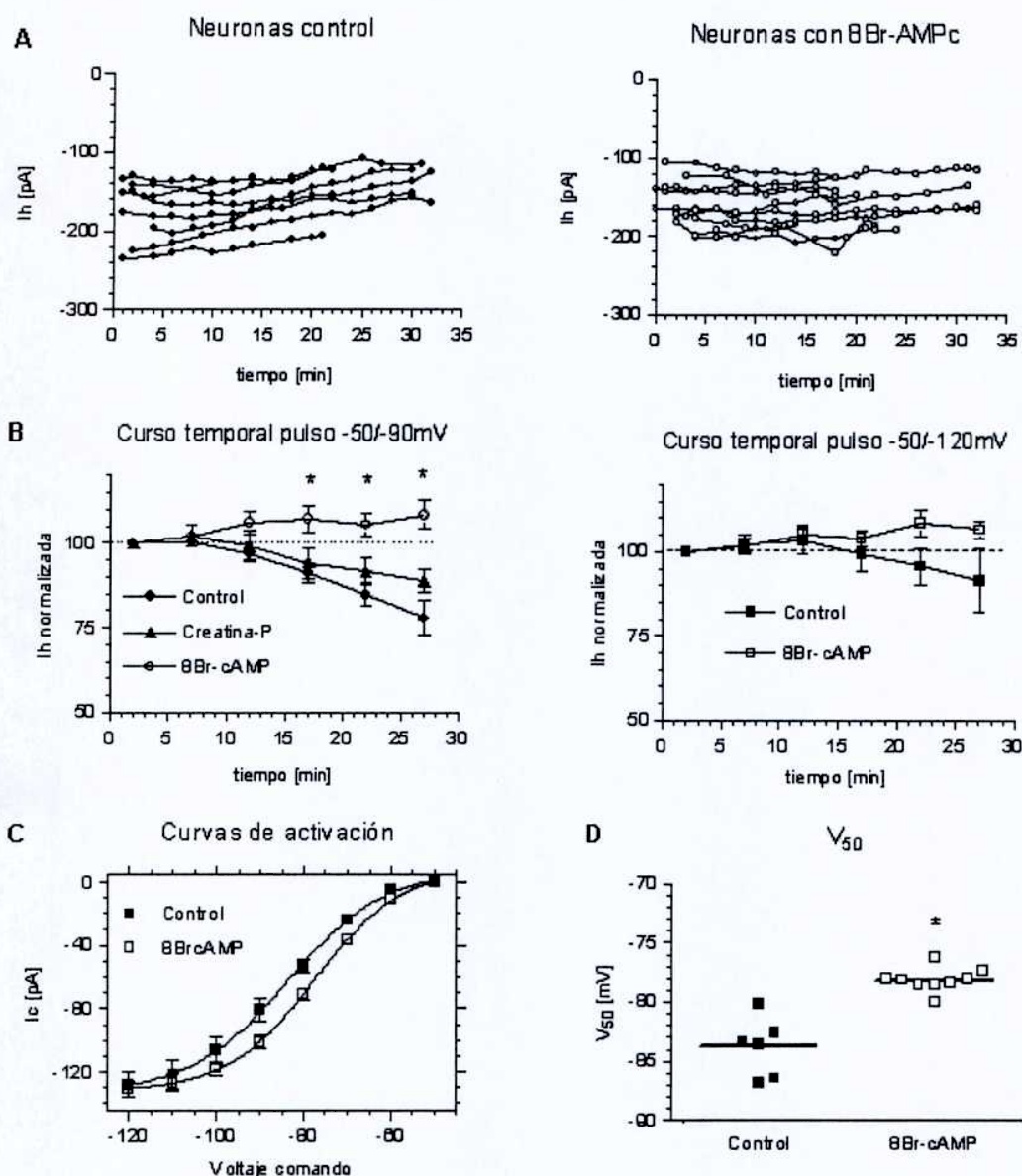
Por tratarse de un análogo permeable inicialmente se intentó ver efecto del 8Br-AMPc 10 $\mu$ M mediante su aplicación en la solución extracelular sobre toda la rebanada de cerebro. Se midió la amplitud de I<sub>h</sub> desde el establecimiento del registro a intervalos de tiempo regulares para los pulsos de -50/-90mV y -50/-120mV y se aplicó 8Br-AMPc de 7 a 8min. En tres células registradas en estas condiciones no se observó efecto en dos y en una fue muy leve (datos no mostrados). Debido a que el sitio CNBD es intracelular, era posible que con este procedimiento el efecto del 8Br-AMPc no llegara a ser detectado por necesitar más tiempo o una mayor concentración. Por lo tanto se cambió de estrategia y se incorporó el análogo directamente a la solución de pipeta, como ya había sido utilizado con éxito en neuronas talámicas (Luthi y McCormick, 1999).

Una vez añadido el 8Br-AMPc 10 $\mu$ M a la solución de pipeta se midió la amplitud de I<sub>h</sub> para dos pulsos de voltaje, -50/-90mV y -50/-120mV, a intervalos de 2 a 4min a partir del establecimiento del registro en tres grupos de neuronas: con solución intracelular control, con solución intracelular estándar (contiene creatina fosfato) y con 8Br-AMPc (sin creatina fosfato). La solución estándar (con creatina fosfato) es la utilizada en el resto de los experimentos de esta tesis y provee el sistema regenerador de

ATP para prevenir el decaimiento de las corrientes. El 8Br-AMPC disuelto en DMSO se agregó a la solución de pipeta en el momento y los tres grupos de células tuvieron una concentración final de 0,2% de DMSO. En la figura 30 se muestran los gráficos de la amplitud de  $I_h$  en función del tiempo de células individuales para el pulso de -50/-90mV de dos grupos: control (figura 30A izquierda, n=8) y tratadas con 8Br-AMPC 10 $\mu$ M (figura 30A derecha, n=10). Se puede ver en el grupo de células control que con el correr de los minutos la amplitud de  $I_h$  tiene una tendencia a reducirse en valor absoluto (figura 30A izquierda, nótese el eje y negativo porque se presentan las amplitudes de corriente cruda), mientras que en el grupo tratado con 8Br-AMPC la amplitud de  $I_h$  se mantuvo más constante (figura 30A derecha). Para analizar estas tendencias las amplitudes de las corrientes de cada neurona se agruparon en intervalos de 5min y se normalizaron a la amplitud de  $I_h$  registrada durante los primeros 5min y luego se promediaron por intervalos. De esta forma cada punto del curso temporal es el promedio de entre 4 y 10 células independientes. La figura 30B muestra los cursos temporales de la amplitud de  $I_h$  luego del agrupamiento para el pulso -50/-90mV (izquierda) o -50/-120mV (derecha) con los tres grupos de neuronas: control (●), con creatina fosfato (▲) y con 8Br-AMPC (○). Se puede ver que la amplitud de  $I_h$  con la solución control tuvo un decaimiento significativo (*run-down*) pasados los 15min de registro. Este decaimiento se revirtió parcialmente cuando se utilizó creatina-P. Cuando a la solución de pipeta se le adicionó 8Br-AMPC no se observa el decaimiento, existiendo una diferencia significativa respecto de la solución control. El aumento de la amplitud observado dentro del grupo tratado con 8Br-AMPC no es significativo (figura 30B izquierda). Cuando  $I_h$  fue evocada con el pulso de -50/-120mV, se observó menor decaimiento en el control que no difiere significativamente con las células tratadas con 8Br-AMPC (figura 30B derecha). Esta diferencia con el pulso a -90mV se explicaría si porque el mecanismo de acción del AMPC cambia la dependencia del voltaje sin modificar la conductancia máxima.

El decaimiento de la corriente en condiciones control indica que en la célula están presentes factores que regulan positivamente  $I_h$  y que probablemente son diluidos a partir del establecimiento del registro en configuración célula entera. La reversión parcial de este decaimiento con Creatina-P, y total con 8Br-AMPC, sugiere que el AMPC intracelular sería el principal responsable del mantenimiento de la amplitud de  $I_h$  a -90mV.





**Figura 30: Regulación de  $I_h$  por 8Br-AMPC intracelular.** **A**, se muestra la amplitud de  $I_h$  en función del tiempo de registro para un pulso de -50/-90mV en dos grupos de neuronas: control (izquierda) y con 8Br-AMPC en la solución de pipeta (derecha). Se observa que mientras en el grupo control se reduce la amplitud con los minutos (tener en cuenta la escala negativa del eje y), en el grupo tratado se mantiene. **B**, curso temporal de las amplitudes de  $I_h$  agrupadas en intervalos de 5min y promediadas para el pulso de -90mV (izquierda) y -120mV (derecha). Izquierda: neuronas de A en condiciones control (●), con 8Br-AMPC (○), o con la solución de pipeta estándar con Creatina-P (▲). Derecha: amplitud de  $I_h$  a -120mV en presencia (□) o ausencia (■) de 8Br-AMPC. Cada punto de los cursos temporales promedio es el resultado de 5 a 10 células independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas entre el grupo tratado con 8Br-AMPC y el grupo control ( $p < 0,05$ , test de "t"). **C**, relación I-V de las corrientes de cola (curva de activación) en presencia (□,  $n=9$ ) o ausencia (■,  $n=6$ ) de 8Br-AMPC en la solución de pipeta. La serie de corrientes activadas por hiperpolarización se evocó a los 20min de registros con pulsos de -50 a -120mV. Las amplitudes de  $I_c$  en función del potencial se ajustaron a la ecuación de Boltzman. El  $V_{50}$  en presencia de 8Br-AMPC se despolarizó significativamente 6,3m ( $p = 0,014$ , test de F para comparación del  $V_{50}$  entre curvas). **D**, valores del  $V_{50}$  individuales. Control:  $-83,6 \pm 2,3\text{mV}$  vs. 8Br-AMPC:  $-77,3 \pm 3\text{mV}$ .

Para determinar si la regulación mediada por nucleótidos cíclicos cambia la dependencia del voltaje, se evocó  $I_h$  entre -50 y -120mV y se analizaron las curvas de activación de las corrientes de cola ( $I_c$ ) a los 20min de iniciados los registros en dos grupos de neuronas, control (■, n=6) y tratadas con 8Br-cAMPc (□, n=9) (figura 30C). Las curvas de activación promedio de ambos grupos se ajustaron a la ecuación de Boltzman y se analizó si eran estadísticamente diferentes ( $p = 0,0001$ , test de F). Para saber dónde radicaba la diferencia entre curvas se analizaron los parámetros  $V_{50}$ ,  $I_{max}$ ,  $I_{min}$  y pendiente ( $m$ ) entre grupos control y tratados. Los valores de  $I_{min}$  (8,4 vs. 9,4pA),  $I_{max}$  (-133,4 vs. -132,4pA) y  $m$  (11,4 vs. 10) no fueron significativamente diferentes ( $p > 0,6$  en todos los casos, test de F). El  $V_{50}$  sí fue estadísticamente diferente, cambiando de -83,6mV para el control a -77,3mV para las células con 8Br-AMPc ( $p=0,015$ , test de F) (figura 30D).

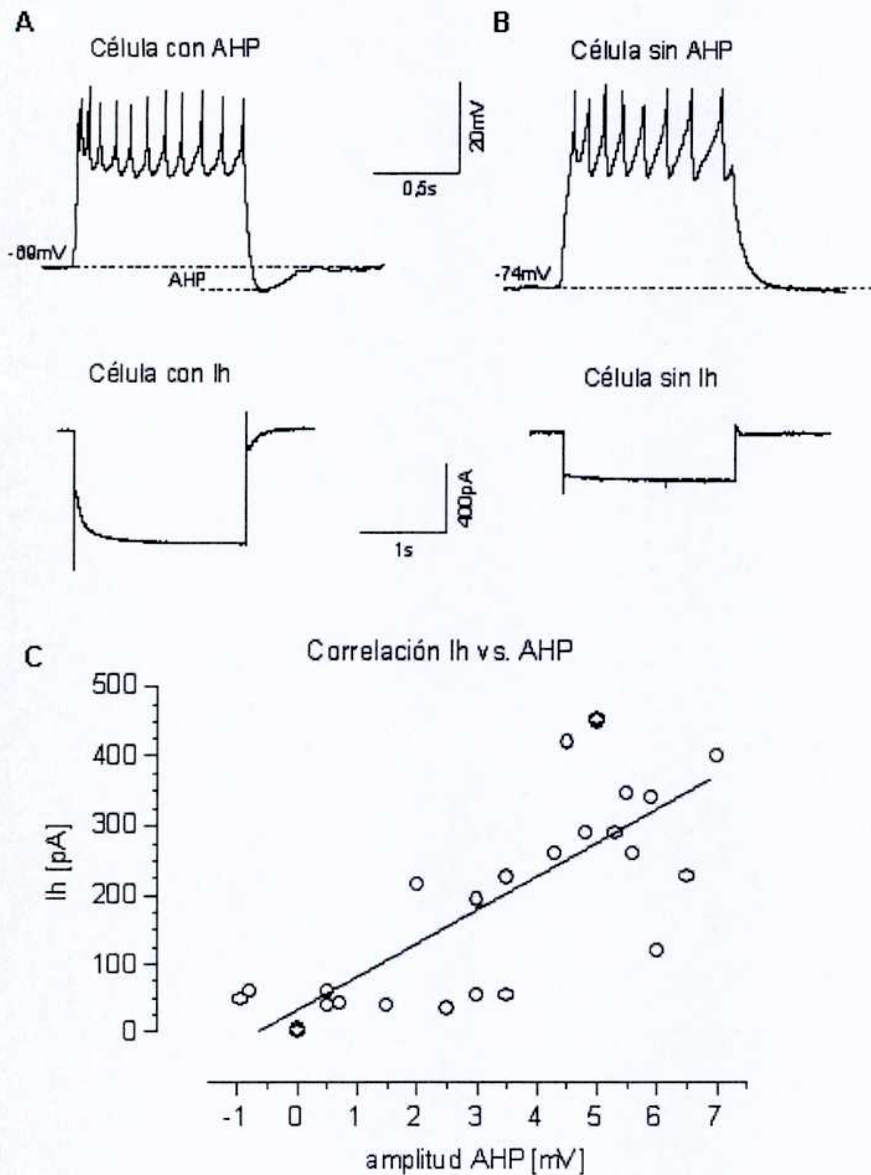
Estos resultados muestran que el 8Br-cAMPc facilita la activación por voltaje de  $I_h$  en NPLV modificando el  $V_{50}$  hacia potenciales más despolarizados sin afectar la amplitud máxima. Esto es consistente con que la amplitud de  $I_h$  a -120mV no fuera aumentada significativamente con el tratamiento de 8Br-AMPc (figura 30B derecha).

### **$I_h$ contribuye a la hiperpolarización post-potencial (AHP)**

La hiperpolarización post-potencial (AHP) es importante en la regulación del patrón de disparo de potenciales de acción, la excitabilidad y la actividad en neuronas con disparo rítmico.

Con el objetivo de estudiar la influencia de  $I_h$  sobre la AHP en NPLV de la CPF se realizaron los experimentos que se muestran a continuación. Primeramente se evocó la AHP con ráfagas de potenciales de acción a una frecuencia de entre 5 y 15Hz durante 1s, al término del cual normalmente se observó la aparición de una AHPm. La amplitud de la AHPm se midió como la hiperpolarización producida respecto del potencial de reposo (figura 31A). Esta hiperpolarización normalmente tuvo una duración acorde a la esperada para la AHPm (50 a 300ms) y una amplitud de hasta 10mV aproximadamente. En las condiciones de este estudio no se encontró la AHP lenta (de más de 0,5-1s de duración), sin embargo no se puede descartar totalmente su presencia ya que no se utilizaron bloqueantes selectivos de los distintos AHP (Sah y Faber, 2002). La AHP rápida se vio en algunas células luego de los primeros potenciales de acción de una ráfaga, pero nunca al final. En los experimentos desarrollados a lo largo de esta tesis se observó que

algunas neuronas no tenían AHP luego del tren de potenciales de acción, y que esta ausencia de AHP en algunos casos coincidía con células en las que la amplitud de  $I_h$  era pequeña (figura 31B).



**Figura 31: Correlación entre la amplitud de  $I_h$  y la AHP en NPLV.** A, ejemplo de una neurona cuya AHP (arriba) e  $I_h$  (abajo) tienen amplitudes prominentes. B, neurona en la que tanto su  $I_h$  como la AHP son pequeñas. C, correlación entre la amplitud de  $I_h$  y la amplitud de la AHP ( $r$  Pearson = 0,77,  $p < 0,0001$ ,  $n = 26$ ).  $I_h$  fue evocada por un pulso de voltaje hiperpolarizante de 2s de -50 a -120mV. La AHP fue medida en las mismas neuronas luego de un pulso de corriente despolarizante que provocó un tren de 5 a 15 potenciales de acción.

A partir de esta observación se analizó si existía una correlación entre la amplitud de la AHP observada luego de una ráfaga de potenciales de acción en función de la amplitud de  $I_h$  evocada con un pulso de voltaje de -50 a -120mV (figura 31C). En esta correlación se incluyeron 11 neuronas cuya amplitud de  $I_h$  fue menor de 100pA, y si bien habían sido descartadas para otros análisis, se había registrado el patrón de disparo y la AHP. En un total de 26 células se encontró correlación positiva entre ambas variables ( $r$  Pearson = 0,77,  $p < 0,0001$ ).

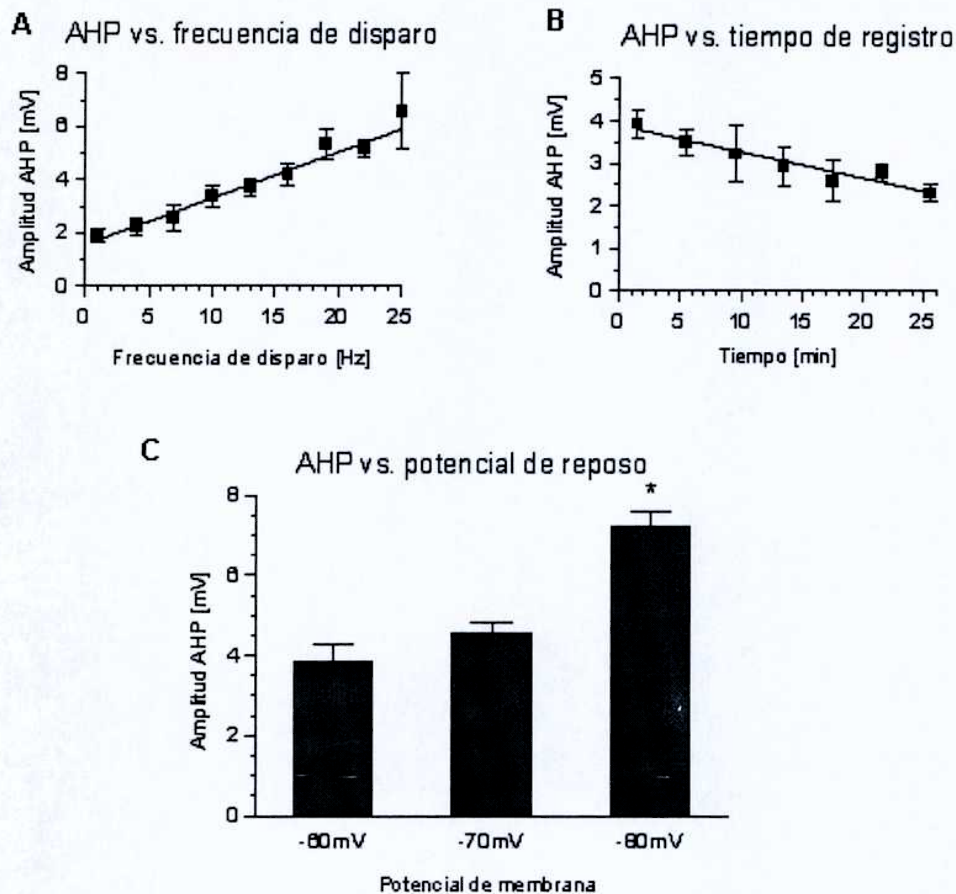
Se analizaron las características de la AHP en las NPLV: dependencia de la frecuencia de disparo, dependencia del tiempo y dependencia del voltaje.

Para evaluar la amplitud de la AHP en función de la frecuencia de disparo se reguló el número de potenciales de acción evocados durante un pulso despolarizante de segundo de duración variando la amplitud del pulso. Las células se mantuvieron a un potencial de reposo de -70mV fijado por inyección de corriente. La amplitud de la AHP mostró una dependencia lineal con la frecuencia de disparo de potenciales de acción,  $r^2 = 0,953$  (figura 32A). La pendiente de la recta indica un incremento de la amplitud de la AHP de  $0,17 \pm 0,01$ mV/Hz. Las AHP evocadas en el rango de 5 a 15 potenciales de acción tuvieron en promedio una amplitud de 2,5 a 4,2mV.

Por otro lado se analizó la amplitud de la AHP en función del tiempo para observar si hay decaimiento (figura 32B). Para esto se midió la amplitud de la AHP evocada aproximadamente a 15Hz en 8 neuronas durante 30min. Se observó un decaimiento dependiente del tiempo que ajustó bien a una función lineal ( $r^2 = 0,92$ ) cuya pendiente representa la velocidad de reducción de la AHP:  $-0,062 \pm 0,008$ mV/min. Para una amplitud inicial de aproximadamente 4mV, la AHP decayó al 50% en 32min. Los experimentos realizados en esta sección no llevaron más de 30min desde el establecimiento del registro.

También se analizó la amplitud del AHP en función del potencial de reposo. En 14 neuronas se evocaron trenes de aproximadamente 15 potenciales de acción a partir de tres potenciales de reposo: -60, -70 y -80mV, fijados mediante inyección de corriente. Se observó una mayor amplitud cuando el potencial de membrana partió de -80mV respecto de cuando lo hizo a -60 o -70mV (figura 32C) ( $p < 0,001$ , ANOVA de medidas repetidas, posttest de Bonferroni para comparaciones múltiples). Este resultado sugiere que la AHP a potenciales hiperpolarizados no estaría mediada solo por corrientes de  $K^+$  (probablemente canales  $K_{Ca}$ ), dado que a potenciales hiperpolarizados (como -80) las

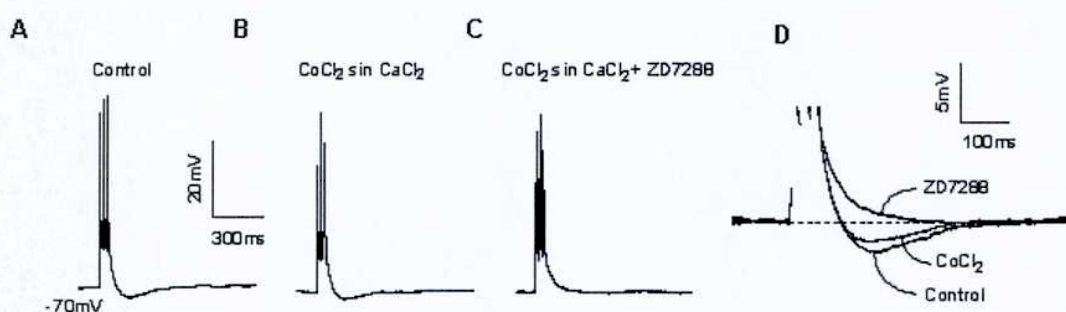
corrientes de  $K^+$  disminuyen por la cercanía al  $E_k$ . Sugestivamente  $I_h$  se encuentra fuertemente activada a estos potenciales.



**Figura 32. Características de la AHP en NPLV.** **A**, se midió la amplitud de la AHP a distintas frecuencias de disparo de potenciales de acción. Se encontró una dependencia en forma lineal de la frecuencia de disparo ( $r^2 = 0,953$ ,  $m = 0,17 \pm 0,01$  mV/Hz). Los puntos se obtuvieron evocando ráfagas de 0 a 25 potenciales de acción con pulsos de corriente de amplitud creciente de 1s de duración en 12 células. Los datos de cada neurona se agruparon a intervalos de 3Hz y luego se promediaron. **B**, la amplitud de la AHP en función del tiempo de registro decayó en forma lineal ( $r^2 = 0,92$ ,  $m = -0,062 \pm 0,008$  mV/min). Se midió la amplitud de la AHP en 8 neuronas luego de una ráfaga de 15 potenciales de acción a intervalos de 3 a 5min durante 30min. Los datos de agruparon en intervalos de 4min y se promediaron. **C**, se midió la amplitud de la AHP en 14 neuronas desde tres potenciales de reposo: -60, -70 y -80mV. Estos potenciales se mantuvieron mediante inyección de corriente constante desde el amplificador. La AHP se evocó con un pulso despolarizante de una amplitud tal que evocó aproximadamente 15 potenciales de acción. La amplitud de la AHP aumenta significativamente cuando la célula parte de -80mV ( $p < 0,0001$   $n = 14$ ).

Se investigó la contribución de corrientes de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$  ( $I_{Ca}$ ) e  $I_h$  al AHP observado luego de un tren de potenciales de acción, utilizando bloqueantes de la entrada de  $Ca^{2+}$  y de  $I_h$ . En la figura 33 se muestra el efecto de estos bloqueantes sobre una célula mantenida a  $-70mV$  que primero fue bañada en BBS con  $CoCl_2$  2,5mM y sin  $CaCl_2$  (figura 33B) y luego se le pasó ZD7288 20 $\mu$ M (figura 33C). Como se muestra en la ampliación (D), la AHP se inhibió parcialmente en medio con  $Co^{2+}$ , pero se bloqueó totalmente cuando se le pasó ZD7288 20 $\mu$ M. Este resultado sugiere que la AHP observada en el rango del potencial de reposo de las NPLV estaría mediada al menos por dos corrientes  $I_{Ca}$  e  $I_h$ .

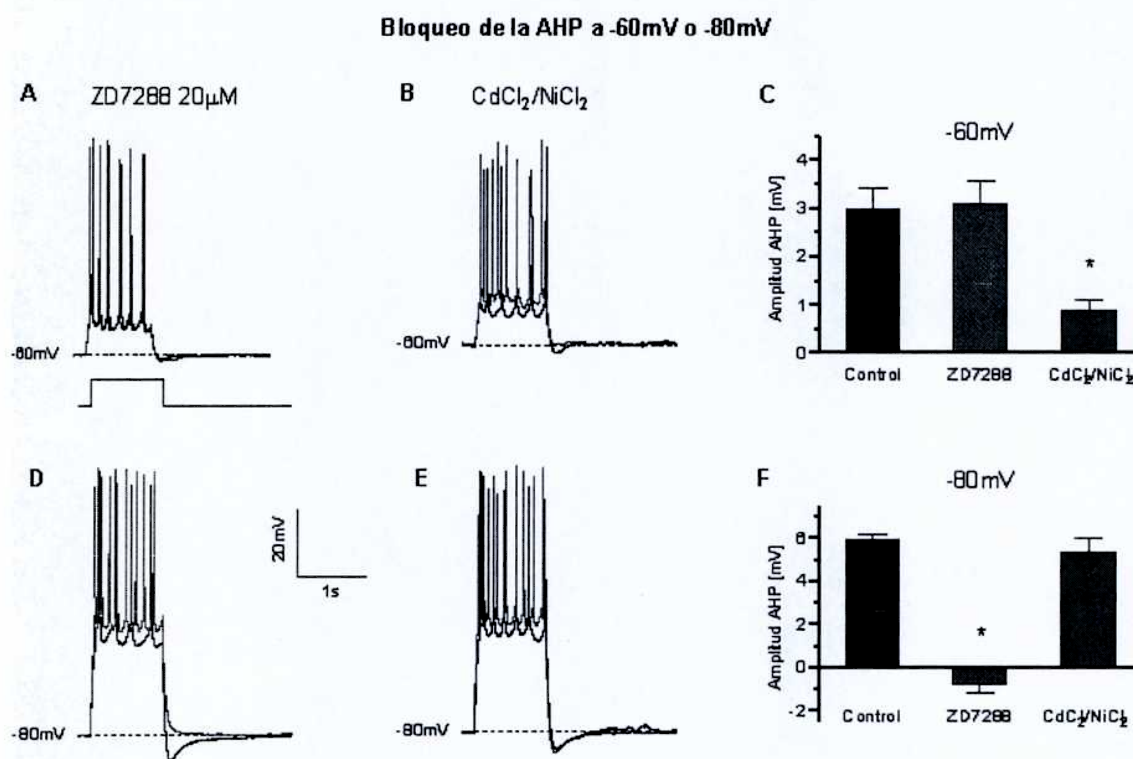
En las NPLV  $I_h$  se encuentra activada aproximadamente en un 40% a un potencial de  $-80mV$  mientras que solo un 5% a  $-60mV$  (figura 28). Por el rango de potenciales de activación de  $I_h$  se esperaría que si esta contribuyera al AHP, lo haga especialmente a potenciales más hiperpolarizados pero también en cierto grado dentro del rango de potenciales de reposo.



**Figura 33: La AHP de las NPLV tiene dos componentes, uno dependiente de  $Ca^{2+}$  y otro de  $I_h$ .** A, AHP en una célula luego de tres potenciales de acción en condiciones control, cuya amplitud fue de 2,7mV. B, cuando se pasó BBS con  $CoCl_2$  2.5mM sin  $CaCl_2$  por 12min se redujo la AHP a 1,8mV. C, al pasar ZD7288 20 $\mu$ M 12min la AHP se inhibió totalmente. D, ampliación y superposición de los trazos anteriores.

Para estudiar si  $I_h$  tiene una mayor contribución a la AHP obtenida desde potenciales hiperpolarizados, se midió la amplitud de la AHP manteniendo las células a dos potenciales de reposo diferentes,  $-60mV$  y  $-80mV$ , y sometiéndolas al tratamiento con el bloqueante de  $I_h$  (ZD7288 20 $\mu$ M,  $n = 9$ ) o bien con bloqueantes de canales de  $Ca^{2+}$  ( $NiCl_2$  200 $\mu$ M y  $CdCl_2$  100 $\mu$ M,  $n = 9$ ) (figura 34). Los pulsos de corriente se

regularon para evocar entre 5 y 15 potenciales de acción y la amplitud de la AHP se midió luego del pulso como ya se indicó. Los controles se obtuvieron de 12 células independientes no tratadas. La cantidad de potenciales de acción en los registros tratados con bloqueantes en general fue mayor que en los controles debido al aumento de la  $R_m$  que provocaron. Esto descartó que las reducciones observadas de la amplitud de la AHP fueran debidas a una menor frecuencia de disparo, y no al efecto farmacológico de los bloqueantes.



**Figura 34: Ih contribuye a la AHP a potenciales hiperpolarizados.** Se determinó la amplitud de la AHP en tres condiciones: control sin bloqueantes (trazos negros, n = 12), con el bloqueante de Ih ZD7288 20 $\mu$ M (trazos naranjas, n = 9) y con los bloqueantes de canales de Ca<sup>2+</sup> CdCl<sub>2</sub> 100 $\mu$ M y NiCl<sub>2</sub> 200 $\mu$ M (trazos verdes, n = 9). Cada grupo de neuronas fue evaluado manteniendo el potencial a -60mV y -80mV. **A**, la amplitud de la AHP no se modificó en presencia de ZD7288 a -60mV. **B**, en presencia de CdCl<sub>2</sub>/NiCl<sub>2</sub> a -60mV se produjo una inhibición de la AHP. **C**, promedios de las amplitudes de las AHP mantenidas a -60mV controles y tratadas. **D**, inhibición de la AHP con ZD7288 a -80mV. **E**, CdCl<sub>2</sub>/NiCl<sub>2</sub> no modificaron la AHP a -80mV. **F**, promedios de las amplitudes de las AHP de las neuronas mantenidas a -80mV controles y tratadas. Las diferencias fueron evaluadas con ANOVA y el postest de Bonferroni de comparaciones múltiples (\*:p<0,05).

A -60mV el ZD7288 20 $\mu$ M no produjo efectos significativos sobre la AHP (figura 34A), mientras que sí fue inhibida por los bloqueantes de canales de Ca<sup>2+</sup> CdCl<sub>2</sub> 100 $\mu$ M/NiCl<sub>2</sub> 200 $\mu$ M (figura 34B). En este grupo de neuronas mantenidas a -60mV la amplitud de la AHP sin bloqueantes (control) fue de 2,95  $\pm$  0,47mV. Cuando se aplicó ZD7288 20 $\mu$ M la amplitud promedio de la AHP fue de 3,1  $\pm$  0,5 (no significativo respecto del control). Los bloqueantes de canales de Ca<sup>2+</sup> inhibieron la AHP un 70%, 0.89  $\pm$  0.24mV vs. 2,95  $\pm$  0,47mV (p<0,05, ANOVA postest de Bonferroni de comparaciones múltiples,). (figura 34C). Estos resultados sugieren que a -60mV la AHP está mediada principalmente por canales K<sub>Ca</sub>.

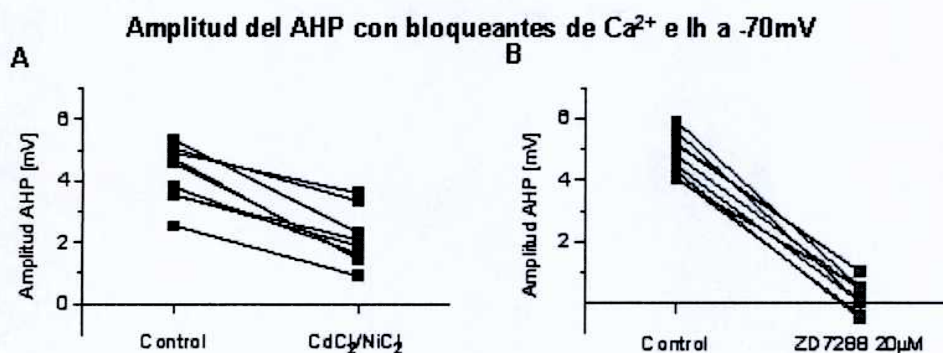
En la figura 34D y E se puede ver el efecto de ZD7288 y de los bloqueantes de canales de Ca<sup>2+</sup> sobre la AHP cuando las neuronas se mantuvieron a -80mV. En estas condiciones la AHP en las células control tuvo una amplitud de 5,9  $\pm$  0.3mV. La AHP en las neuronas tratadas con ZD7288 20 $\mu$ M la AHP se bloqueó totalmente dejando en evidencia una despolarización post-potencial (DAP) en la mayoría de las neuronas (-0,75  $\pm$  0,4mV vs. 5,9  $\pm$  0.3mV; p<0,001, postest de Bonferroni de comparaciones múltiples, ANOVA de una vía). En cambio en el grupo de neuronas tratadas con CdCl<sub>2</sub> 100 $\mu$ M/NiCl<sub>2</sub> 200 $\mu$ M no hubo una reducción significativa de la amplitud de la AHP (5,38  $\pm$  0,65mV vs. 5,9  $\pm$  0.3mV) (figura 34F). Estos resultados sugieren que en las neuronas mantenidas a un potencial de -80mV la AHP esta casi totalmente mediada por Ih mientras que a -60mV contribuyen principalmente los canales K<sub>Ca</sub>.

También se estudiaron los efectos de ZD7288 y CdCl<sub>2</sub> sobre la AHP en neuronas mantenidas a -70mV, un potencial similar al de reposo de las NPLV. En la figura 35 se muestra el efecto de ambos bloqueantes sobre la amplitud de la AHP en dos grupos de neuronas antes y durante el tratamiento.

El bloqueo de canales de Ca<sup>2+</sup> voltaje dependientes con CdCl<sub>2</sub> 100 $\mu$ M y NiCl<sub>2</sub> 200 $\mu$ M a -70mV produjo una inhibición del 50,7% (4,2  $\pm$  0,3mV vs. 2.07  $\pm$  0,3mV, n = 9, p<0,0001 test de "t" para muestras pareadas) (figura 35A). Este valor es consistente con un efecto intermedio a lo observado a -60mV y -80mV.

En el grupo de neuronas tratadas con ZD7288 20 $\mu$ M la amplitud de la AHP se redujo en un 94% (4,84  $\pm$  0,22mV vs. 0,28  $\pm$  0,18mV, n = 9, p<0,0001 test de "t" para muestras pareadas) (figura 35B). Si bien esta inhibición de la AHP con ZD788 es casi total, el efecto es un poco menor que a -80mV, donde quedaba en evidencia una despolarización post-potencial de 0,75mV (p<0,05, test de t).





**Figura 35: Ambos, Ih e  $I_{KCa}$  contribuyen con la AHP a -70mV.** A, amplitud de la AHP antes (control) y después de la aplicación de CdCl<sub>2</sub> 100μM y NiCl<sub>2</sub> 200μM ( $p < 0,0001$ ,  $n = 9$ , test de "t" para muestras pareadas). B, amplitud de la AHP antes (control) y después de la aplicación de ZD7288 20μM ( $p < 0,0001$ ,  $n = 9$ , test de "t" para muestras pareadas).

La tabla 2 resume las amplitudes de la AHP a los tres potenciales de reposo y los efectos observados con los bloqueantes.

Amplitud de la AHP [mV]			
Potencial de reposo	Control (n = 12)	CdCl <sub>2</sub> 100μM + NiCl <sub>2</sub> 200μM (n = 9)	ZD7288 20μM (n = 9)
-60 mV	2,95 ± 0,47	0,89 ± 0,24 *	3,08 ± 0,5
-70 mV	4,2 ± 0,3	2,07 ± 0,3 *	0,28 ± 0,18 *
-80 mV	5,9 ± 0,3	5,38 ± 0,65	-0,75 ± 0,4 *

**Tabla 2:** Amplitud de la AHP a tres potenciales de reposo y el efecto del tratamiento con los bloqueantes de Ih ZD7288 20μM o CsCl 3mM. Los asteriscos indican diferencias significativas entre tratamientos analizados con ANOVA y el posttest de Bonferroni.

En su conjunto estos resultados muestran que en las NPLV el AHP está mediado por más de un tipo de corriente dependiendo del potencial al cual se encuentre la neurona. A potenciales ligeramente despolarizados respecto del reposo (-60mV) estaría mediado por  $I_{KCa}$ , mientras que a potenciales ligeramente hiperpolarizados estarían mediados por Ih.

### El bloqueo de Ih aumenta la entrada de Ca<sup>2+</sup> en las dendritas de las NPLV

Como se explicó en la introducción Ih en neuronas piramidales tiene consecuencias importantes sobre la integración sináptica de EPSP y posiblemente también sobre la transmisión de potenciales a través del árbol dendrítico como los potenciales de acción retropropagados (BAP).

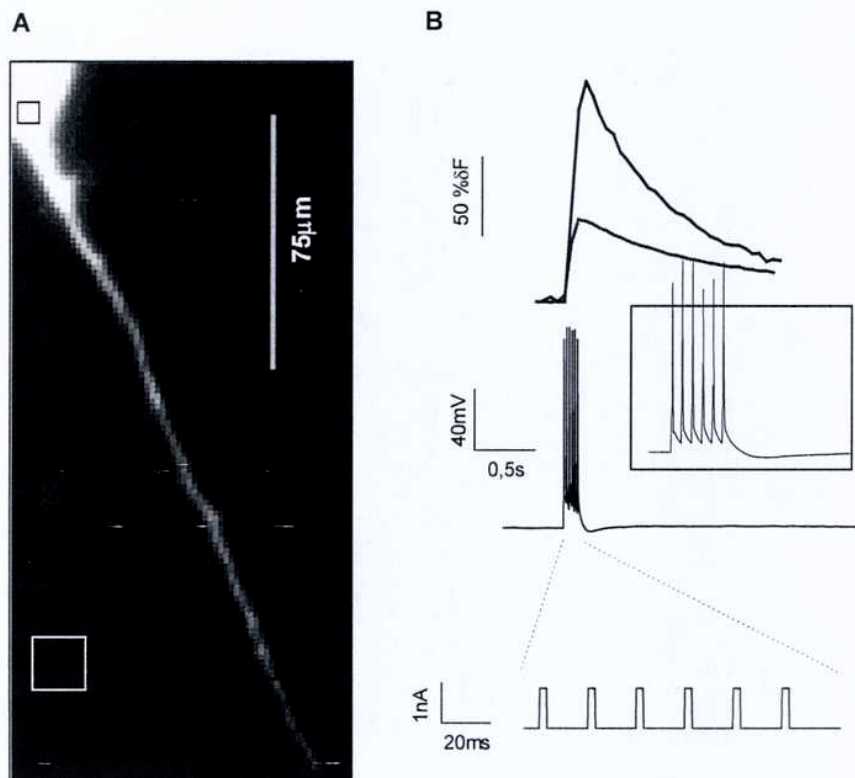
Con el propósito de estudiar la influencia de Ih sobre los BAP en las NPLV de la CPF, se analizó el efecto de los bloqueantes ZD7288 y Cs<sup>+</sup> sobre los cambios transitorios de Ca<sup>2+</sup> evocados por potenciales de acción evocados en el soma y propagados a la dendrita apical. Para ello se registró el cambio de fluorescencia inducido por aumento de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> en respuesta a los potenciales de acción, en simultáneo con el registro del potencial de membrana de las células en modo fijación de corriente. No se realizó la calibración para obtener valores absolutos de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, lo que hubiese requerido la obtención de tres parámetros del OGB-1 del sistema: el K<sub>d</sub>, el rango dinámico y la fluorescencia en condiciones saturantes de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (Maravall y col., 2000).

Se agregó a la solución de pipeta el colorante sensible a Ca<sup>2+</sup> Oregon-Green BAPTA 1 (OGB-1) a una concentración de 100μM para detectar cambios de concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular. Los aumentos transitorios de la concentración de Ca<sup>2+</sup> de cada neurona se midieron en el soma y en una o más regiones de la dendrita apical cercana como cambios de la intensidad de fluorescencia,

$$\% \delta F = 100(F_t - F_{\text{basal}}) / F_{\text{basal}}$$

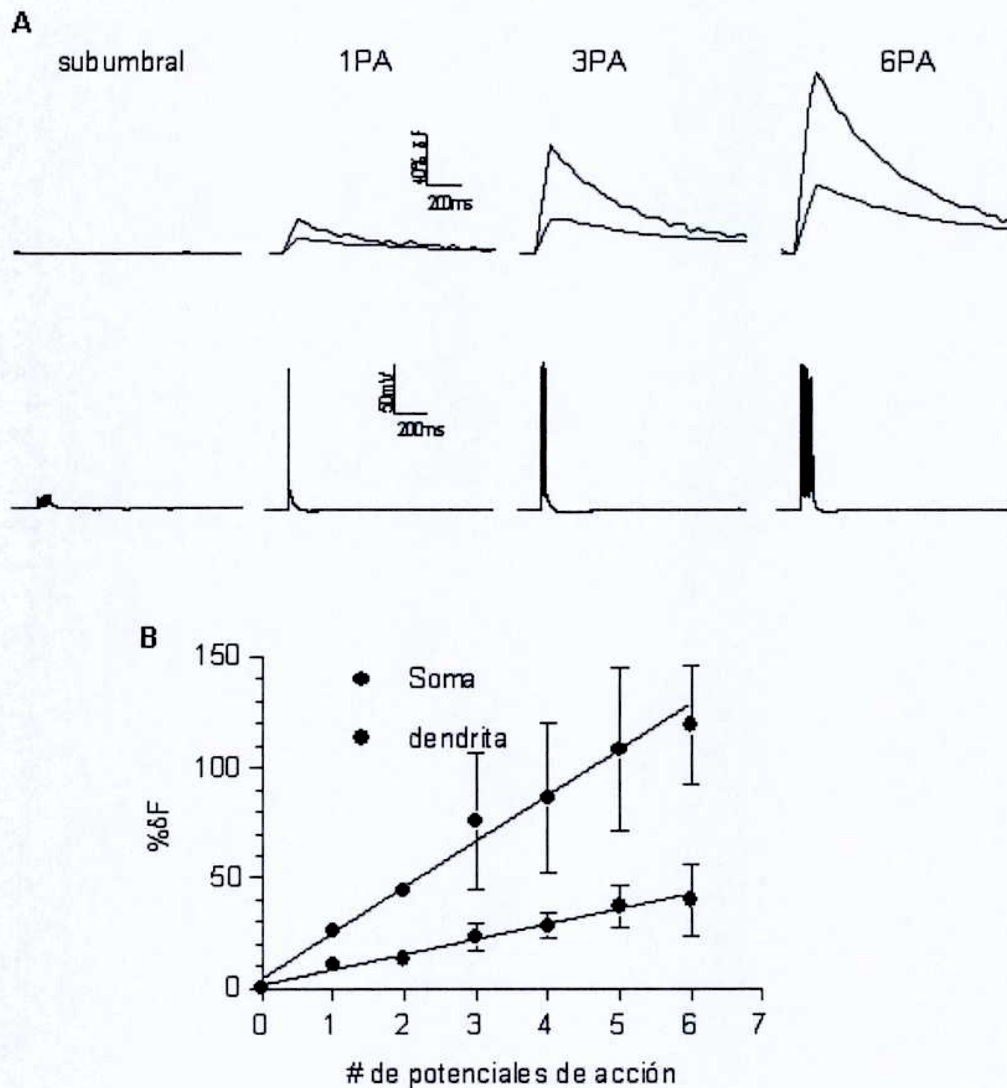
donde F<sub>basal</sub> es la fluorescencia promedio antes del estímulo electrofisiológico y F<sub>t</sub> es la fluorescencia a un determinado tiempo. El valor de δF depende de la concentración intracelular de Ca<sup>2+</sup> y refleja los cambios respecto de la concentración basal (Maravall y col., 2000). En la figura 36A se observa una neurona piramidal de la lámina V representativa cargada con OGB-1. Los rectángulos son los ROIs (regiones de interés), uno ubicado en el soma y otro en la dendrita, donde se midieron los cambios de fluorescencia en respuesta a 6 potenciales de acción somáticos (figura 35B). El ROI blanco que está en una región sin procesos neuronales visibles fue utilizado para substraer la fluorescencia de fondo. El ROI somático normalmente se ubicó en la periferia citoplasmático del soma cerca de la dendrita apical para evitar medir la fluorescencia en el núcleo celular donde los colorantes se acumulan y sus propiedades pueden ser diferentes a las citoplasmáticas. En la figura 36B se muestra el protocolo de

estimulación (abajo) con el que se controló el número de potenciales de acción evocados (centro). Los potenciales somáticos y los BAP provocaron un aumento transitorio de la  $[Ca^{2+}]_i$  somático y dendrítico detectado con el cambio de fluorescencia del OGB-1 en cada ROI (arriba). Los transitorios de  $Ca^{2+}$  presentaron una cinética coherente con el estímulo, la fluorescencia se incrementó durante todo el tren de pulsos y comenzó a bajar al final del tren en forma monoexponencial. Usualmente los transitorios de  $Ca^{2+}$  dendríticos fueron de mayor amplitud y más rápidos que los somáticos probablemente debido a una mayor relación superficie-volumen de este compartimiento (Schiller y col., 1995).



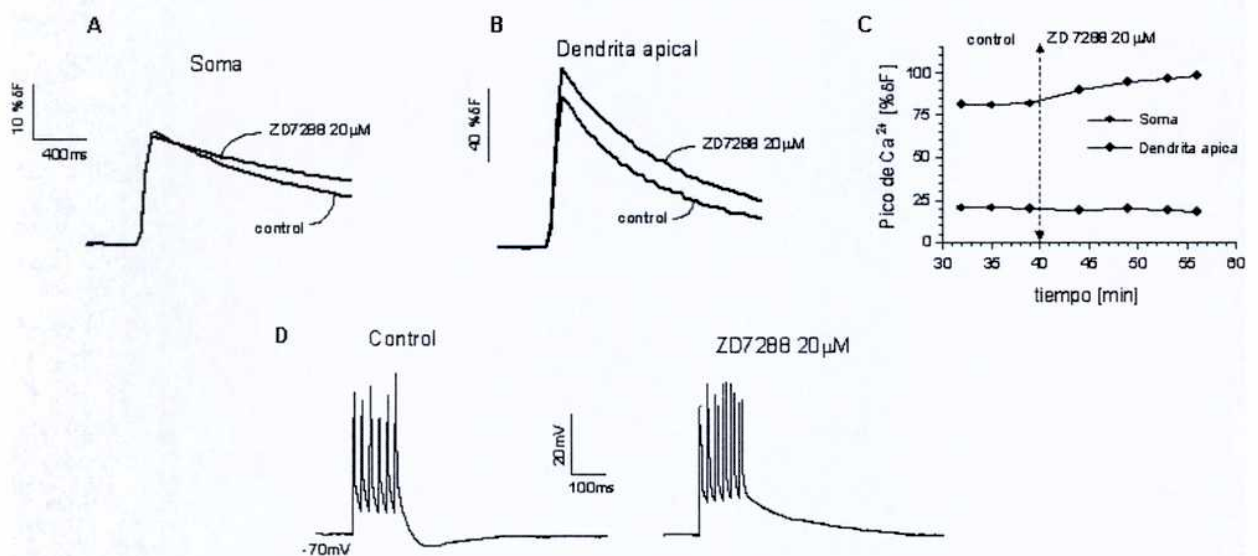
**Figura 36:** Los potenciales de acción somáticos provocaron aumentos transitorios de  $[Ca^{2+}]_i$  en el soma y la dendrita apical. **A**, foto de una NPLV cargada con OGB-1  $100\mu\text{M}$  de a que se ve parte del soma (ángulo superior izquierdo) y  $\sim 200\mu\text{m}$  de la dendrita apical. Los rectángulos son las regiones de interés (ROIs) donde se midió la fluorescencia: soma (rojo) y dendrita apical a  $150\mu\text{m}$  (azul). El ROI blanco indica la región donde se midió la fluorescencia de fondo. **B**, se evocaron 3 a 6 potenciales de acción somáticos (centro) mediante pulsos de corriente supraumbrales ( $0,8$  y  $1,2\text{nA}$ ) de  $3\text{ms}$  de duración a  $50\text{Hz}$  (abajo). El aumento transitorio de  $Ca^{2+}$  se expresó como  $\% \Delta F = 100(F_t - F_{\text{basal}})/F_{\text{basal}}$ . Todos los registros fueron realizados en presencia de CNQX  $10\mu\text{M}$ , Picrotoxina  $50\mu\text{M}$  y APV  $20\mu\text{M}$  (ácido amino-fosfovalérico, bloqueante de canales NMDA).

La intensidad de fluorescencia se midió antes (control) y después de la aplicación de uno de los bloqueantes de  $I_h$  durante 10 o 15min. Los registros se realizaron manteniendo el potencial de membrana a  $-70\text{mV}$  durante todo el experimento mediante la inyección de corriente compensando la hiperpolarización provocada por los bloqueantes. Las imágenes se comenzaron a tomar luego de 20 a 30min de establecido el registro cuando la concentración de colorante (indicada por la intensidad de fluorescencia basal) alcanzó el estado estacionario.



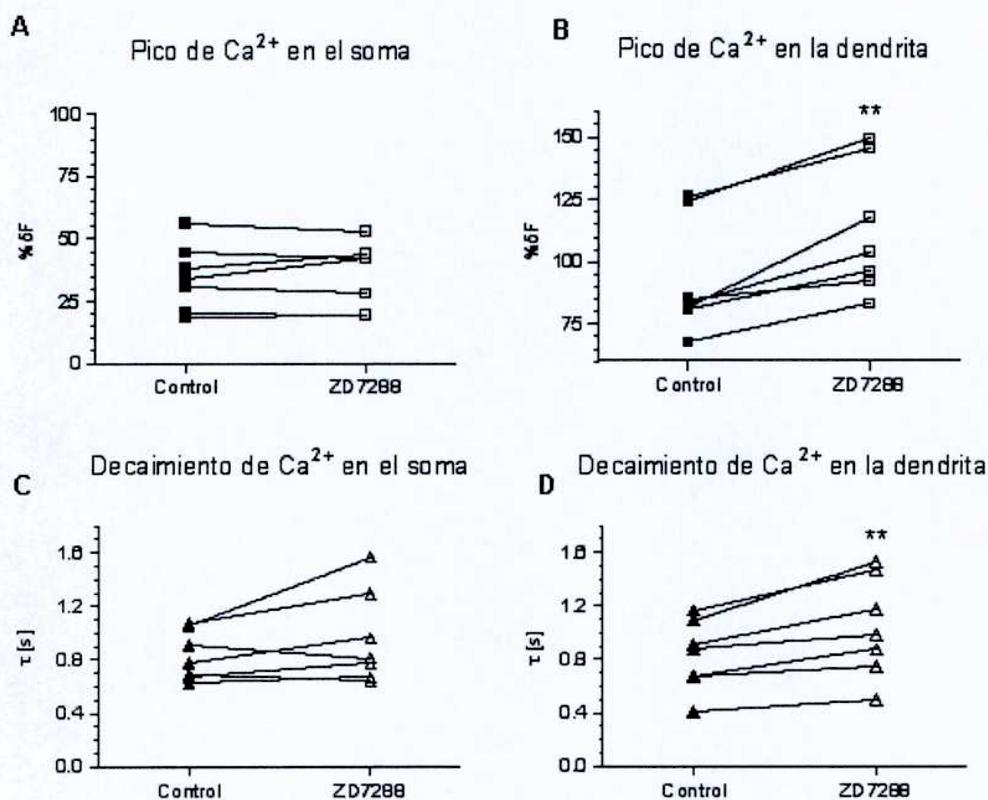
**Figura 37: Dependencia entre la amplitud de los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  y el número de potenciales de acción evocados. A**, transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  en el soma y las dendritas (arriba) evocados por un número creciente de potenciales de acción somáticos (abajo) en una neurona representativa. **B**, relación lineal entre la amplitud de los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  y el número de potenciales de acción en es soma y la dendrita ( $n=4$ ).

Normalmente luego de un tiempo de estimulación de 200ms o más a una frecuencia constante de potenciales de acción somáticos los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  dendríticos en células piramidales de corteza alcanzan un *plateau*. Durante la fase de subida, antes de llegar al *plateau*, la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  depende del número de potenciales de acción (Helmchen y col., 1996). En estos experimentos se evocaron de 3 a 6 potenciales de acción a una frecuencia constante de 50Hz de manera que los cambios de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  estuvieron en un rango aproximadamente lineal. Generalmente en estas condiciones no se advirtió que los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  llegara un *plateau* (figura 37A), pero cuando durante los registros preparatorios de cada experimento ocasionalmente se observó que el transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$  no llegó claramente a un pico, sino que la pendiente disminuía como acercándose a un *plateau*, se redujo el número de potenciales de acción hasta ver un pico sin saturación. En estas condiciones la amplitud del transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$  aumentó en forma lineal con el número de potenciales de acción tanto en el soma como en la dendrita (figura 37B). Cuando el estímulo electrofisiológico fue subumbral no se detectaron cambios en la fluorescencia del soma ni en las dendritas, confirmando que los BAP son necesarios para al aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .



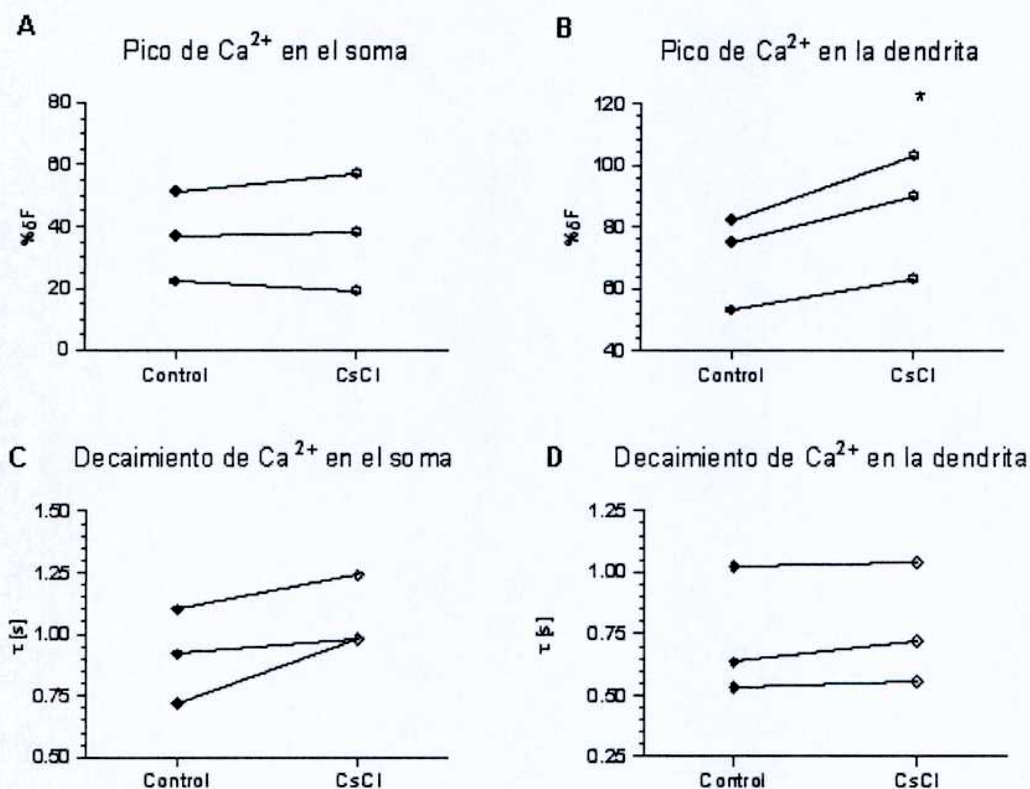
**Figura 38: Efecto del bloqueo de  $I_h$  con ZD7288 sobre la amplitud de los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$ .** **A**, transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  en el soma donde ZD7288 no cambió su amplitud. **B**, transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  en la dendrita apical a 50  $\mu\text{M}$  del soma donde ZD7288 aumentó la amplitud. **C**, curso temporal del pico de los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  en ambos compartimientos, antes y durante la aplicación de ZD7288 20  $\mu\text{M}$ . **D**, Potenciales de acción evocados para generar los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  de mostrados en A en condiciones control (izquierda) y con ZD7288 20  $\mu\text{M}$  (derecha).

En la figura 38 se muestra el efecto del ZD7288  $20\mu\text{M}$  en una neurona representativa donde este bloqueante de  $I_h$  incrementó la amplitud de los transitorios en la dendrita (figura 38B) sin presentar un efecto significativo en el soma (figura 38A). En la figura 38C se observa un curso temporal representativo de la amplitud del transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$  en ambos compartimientos neuronales. Se puede ver que la aplicación de ZD7288 incrementa la amplitud del transitorio dendrítico en forma gradual con un curso temporal acorde al tiempo de perfusión. Como se mostró en la sección anterior, la aplicación de ZD7288 también inhibe la AHP producida por los potenciales de acción somáticos (figura 38D). Resultados similares se obtuvieron en 7 neuronas tratadas de la misma forma con ZD7288  $20\mu\text{M}$  (figura 39A y B y tabla 3), donde también se calcularon las constantes de decaimiento de los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  ajustadas a una exponencial simple y se observó que el tiempo aumentó en forma significativa en la dendrita apical, no en el soma (figura 39D y tabla 4).



**Figura 39:** La aplicación de ZD7288 aumentó la amplitud y el tiempo de decaimiento de los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  dendríticos. Se midieron en 7 neuronas la amplitud de los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  y sus constantes de decaimiento en el soma (A y C) y en el la dendrita apical (B y D), antes y durante la aplicación de ZD7288  $20\mu\text{M}$ . Los valores de cada punto representan un promedio de 2 a 3 mediciones consecutivas. Los datos se analizaron con el test de "t" para muestras pareadas.

De la misma manera se analizó el efecto del  $\text{Cs}^+$  3mM sobre la amplitud y el decaimiento de los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  en 3 neuronas. Con este bloqueante de  $I_h$  se obtuvieron resultados similares a los observados con ZD7288 20 $\mu\text{M}$  (figura 40, tablas 3 y 4), confirmando que  $I_h$  regula la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la propagación de los BAP en estas neuronas.



**Figura 40:** La aplicación de  $\text{Cs}^+$  aumentó la amplitud de los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  de la dendrita apical. Se analizaron en 3 neuronas la amplitud y la constante de decaimiento de los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  en el soma (A y C) y la dendrita apical (B y D), antes y durante la aplicación de  $\text{Cs}^+$  3mM. Los valores de cada punto representan un promedio de 2 a 3 mediciones consecutivas. Los datos se analizaron con el test de "t" para muestras pareadas.

Amplitud del transitorio de $\text{Ca}^{2+}$ intracelular [% $\Delta\text{F}$ ]				
Localización	Control	$\text{CsCl}$ 3mM	Control	ZD7288 20 $\mu\text{M}$
Soma	$36,7 \pm 8,3$	$38 \pm 11$	$34,6 \pm 5$	$35,3 \pm 5$
Dendrita apical	$70 \pm 8,7$	$85,3 \pm 11,7 *$	$92,6 \pm 8,7$	$112,5 \pm 9,9 **$

**Tabla 3:** efecto de los bloqueantes de  $I_h$  sobre la amplitud del transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$  en soma y dendrita apical cercana.

$\tau$ de decaimiento del transitorio de $\text{Ca}^{2+}$ intracelular [s]				
Localización	Control	CsCl 3mM	Control	ZD7288 20 $\mu$ M
Soma	0,91 $\pm$ 0,1	1,07 $\pm$ 0,09	0,83 $\pm$ 0,07	0,96 $\pm$ 0,13
Dendrita apical	0,73 $\pm$ 0,15	0,77 $\pm$ 0,14	0,83 $\pm$ 0,1	1,04 $\pm$ 0,14 **

**Tabla 4:** efecto de los bloqueantes de Ih sobre el decaimiento de los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  en soma y dendrita apical cercana.

Estos resultados sugieren que la presencia de Ih en las dendritas de las NPLV de la CPF estaría reduciendo la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  durante la propagación de los BAP.



# DISCUSIÓN

Recientemente se han desarrollado una serie de herramientas que permiten estudiar y analizar las propiedades de las corrientes iónicas en general, e  $I_h$  en particular. Se ha desarrollado la técnica de registros de *patch-clamp* con video-microscopía DIC en rebanadas agudas de cerebro (Stuart y col., 1993) que permite obtener registros más confiables que con los microelectrodos tradicionales (Li y col., 2004). Se han encontrado nuevos bloqueantes de  $I_h$  como el ZD7288 (BoSmith y col., 1993). Y finalmente los genes que codifican los canales que median  $I_h$  han sido clonados y expresados en sistemas heterólogos, y se han obtenido anticuerpos que permitieron su localización (Santoro y col., 1998).

Desde su descubrimiento  $I_h$  ha sido descrita en numerosos tipos neuronales (Pape, 1996) inclusive en NPLV de corteza somatosensorial (Spain y col., 1987; Williams y Stuart, 2000; Berger y col., 2001) y corteza visual (Solomon y Nerbonne, 1993b). Sin embargo, aunque había evidencias que  $I_h$  estaba presente también en neuronas piramidales de la corteza prefrontal, no se había realizado una caracterización en estas células. La evidencia más cercana proviene de las NPLV de la CPF medial de ratas en las observaron la presencia del sag distintivo sensible a  $Cs^+$  (Yang y col., 1996). Anteriormente, en corteza cingular anterior de cobayo se describió la presencia de  $I_h$  como una conductancia activada a potenciales hiperpolarizados respecto del reposo que se inhibió con  $Cs^+$  (Tanaka y col., 1991).  $I_h$  se encuentra en varios tipos celulares que también expresan otra corriente activada por hiperpolarización,  $I_{kir}$  (ver introducción). En las NPLV los reportes son contradictorios, ya que se la ha encontrado que las neuronas piramidales de la CPF expresa ambas corrientes (Tanaka y col., 1991) mientras que en corteza somatosensorial algunos han observado la presencia de  $I_{kir}$  constitutiva (Takigawa y Alzheimer, 1999) y otros solo detectaron  $I_h$  (Spain y col., 1987), como en la corteza visual (Solomon y Nerbonne, 1993b).

Teniendo en cuenta estos antecedentes se decidió estudiar las corrientes activadas por hiperpolarización en la NPLV de las CPFm de ratón. En la primera parte de este trabajo se realizó una caracterización de  $I_h$ , cuyos resultados se discuten en función de estudios previos en otras neuronas del sistema nervioso central, y de la caracterización de las corrientes obtenidas por la expresión de las diferentes subunidades HCN en sistemas heterólogos. También se discute acerca de  $I_{kir}$ , que si bien no fue caracterizada en profundidad, se la estudió en función de la necesidad de bloquearla para estudiar  $I_h$ . Finalmente se analizaron los resultados que implican a  $I_h$  en regulación de la excitabilidad neuronal y la propagación de potenciales a través de la dendrita apical de

las NPLV.

### **Las NPLV de corteza prefrontal de ratón**

Como se mencionó en la introducción, está ampliamente aceptado que las neuronas de la corteza cerebral registradas presentan distintos patrones de disparo (Connors y Gutnick, 1990; Yang y col., 1996; Degenetais y col., 2002), sin embargo, existirían evidencias de que una misma neurona cortical puede intercambiar entre los patrones de disparo típicos en distintas condiciones (Steriade, 2004). Independiente de si los fenotipos electrofisiológicos *in vitro* representan o no diferentes poblaciones de neuronas, los patrones que se reconocen tienen están relativamente conservados entre las distintas técnicas de registros y pueden tener utilidad práctica para establecer correlaciones y a los fines comunicacionales.

En este trabajo se agruparon las neuronas piramidales de acuerdo al criterio utilizado por Yang y colaboradores en experimentos realizados en rodajas de CPF de rata utilizando microelectrodos (Yang y col., 1996). De los cuatro patrones de disparo descriptos para NPLV, en el presente trabajo se encontraron tres: 39%RS, 43% IB y 18% IM. No se hallaron neuronas ROB descriptas por esos autores en una baja frecuencia (13%). Además de su patrón de disparo estas neuronas se distinguieron por presentar un *sag* mayor que los otros tres tipos, lo que indicaría que poseen una mayor expresión de *I<sub>h</sub>*. Si bien en este trabajo no se hallaron neuronas ROB, sí se encontraron células con alta expresión de *I<sub>h</sub>* sugiriendo que las neuronas ROB estaban presentes pero sin su patrón de disparo típico. La ausencia de neuronas ROB no se explicaría por el uso de la técnica de *patch* ya que tampoco fueron descriptas en trabajos realizados en rebanadas de corteza somatosensorial de rata utilizando microelectrodos (Schwindt y col., 1997). Además, los registros de *patch* en modo célula entera no parecen afectar sustancialmente el patrón de disparo en neuronas piramidales ya que este se mantiene cuando la misma neurona pasa de ser registrada en modo *cell-attached* a modo célula entera (Williams, 1999). La ausencia del patrón de disparo de células ROB en las rebanadas de este trabajo se puede explicar porque las preparaciones *in vitro* carecen conexiones intercelulares y muchas de sus neuronas pierden porciones importantes de sus dendritas con los cortes. Las rodajas utilizadas por Yang y colaboradores se distinguen de otras preparaciones en dos aspectos: un mayor espesor (450µm), y en la conservación de una parte de los

axones de las NPLV con el núcleo Accumbens. Estas características incrementan la cantidad de conexiones intercelulares conservadas y permite que algunas neuronas sean menos dañadas, lo que aumentaría la probabilidad de hallar neuronas que disparen espontáneamente.

Las neuronas IM no fueron un grupo de características homogéneas sino que presentan un patrón intermedio entre las RS y las IB, muchas veces similar a alguno de los otros dos grupos pero con alguna característica excluyente. Por este motivo la frecuencia de neuronas IM es mayor a lo descrito por Yang y colaboradores donde las neuronas IM presentaron características electrofisiológicas y morfológicas más homogéneas y solo las encontraron con un frecuencia de 4%. La presencia de DAP en las neuronas IM indicaría una tendencia a disparar más de un potencial de acción. Sin embargo como el patrón de disparo de potenciales de acción se probó generalmente con un solo pulso y no se ensayaron pulsos de mayor amplitud que permitiesen corroborarlo, puede ser que una parte de las neuronas IM corresponda al subtipo IB si se hubiese utilizado una estimulación de mayor amplitud. La frecuencia de neuronas RS (39%) encontrada también fue mayor que de reportada por Yang y colaboradores (19%), pero muy similar a la encontrada en corteza somatosensorial (42%) mediante patch-clamp (Williams, 1999).

### **Corrientes activadas por hiperpolarización**

Desde los primeros experimentos en modo fijación de corriente se observó que ante los estímulos hiperpolarizantes estas células presentaban el *sag* característico de las neuronas que poseen  $I_h$ , luego confirmado mediante su inhibición tanto por  $Cs^+$  como por ZD7288. Con el propósito de estudiar  $I_h$  en estas neuronas se realizaron experimentos en modo fijación de voltaje en los que se observó que la corriente activada durante la aplicación de pulsos de voltaje hiperpolarizantes tenía dos componentes dependientes de voltaje, uno rápido que se activa a potenciales menores a  $-90mV$  incluido en  $I_{ini}$  y luego identificado como  $I_{kir}$ , y uno lento que se activa en el rango del potencial de reposo, correspondiente a  $I_h$  (figura 17). Estos dos componentes fueron distinguidos por sus cinéticas de activación diferentes, ya que  $I_{kir}$  es mayoritariamente instantánea e  $I_h$  es lenta con un retraso (*delay*) en su activación permitió separarlas. Sin embargo como  $I_{kir}$  podía presentar un componente más lento e  $I_h$  podría tener un componente rápido, fue necesario aislarlas farmacológicamente utilizando el  $Ba^{2+}$  para

bloquear  $I_{Kir}$  y ZD7288 para bloquear  $I_h$ . La otra corriente activada por hiperpolarización que podría superponerse con  $I_h$  es la corriente de  $Cl^-$  mediada por canales  $ClC$ . Sin embargo no se encontraron evidencias que permitieran suponer su expresión en NPLV ya que la rectificación entrante lenta se inhibió completamente con bloqueantes de  $I_h$  y la rápida que se linearizó con bloqueantes de  $I_{Kir}$ .

### Caracterización de $I_{Kir}$

La activación de  $I_{Kir}$  es considerada generalmente instantánea pero puede tener un componente de activación más lenta de hasta cientos de milisegundos (Hille, 2001) que se superponga con  $I_h$ . Por este motivo el criterio cinético no fue suficiente para distinguir ambas corrientes y se utilizó la sensibilidad al ión  $Ba^{2+}$ , ampliamente aceptado como un potente inhibidor de canales  $Kir$  a concentraciones micromolares bajas (Coetzee y col., 1999; Robinson y Siegelbaum, 2003). El estudio de la sensibilidad a  $Ba^{2+}$  de los dos componentes de la corriente activada por hiperpolarización ( $I_{ini}$  e  $I_h$ ) mostró que utilizando  $200\mu M$ ,  $I_{Kir}$  se bloqueó fuertemente mientras que no tuvo efecto sobre  $I_h$ , por lo tanto esta concentración de  $Ba^{2+}$  fue utilizada en casi todos los experimentos posteriores (figura 18).  $Ba^{2+}$   $200\mu M$  inhibió  $I_{ini}$  proporcionalmente en todo el rango de voltajes sugiriendo que este bloqueo no sería selectivo para  $I_{Kir}$ , sino que también podría incluir canales de  $K^+$  de la corriente de fuga ( $I_{K_{leak}}$ ). Otra evidencia que indica que el  $Ba^{2+}$  en las NPLV bloqueó otros canales además de los  $Kir$  es su  $IC_{50}$  ( $113,3 \pm 2,4\mu M$ ). Este valor está entre uno y dos órdenes de magnitud por sobre los reportados para  $I_{Kir}$  en otras preparaciones. Por ejemplo, el bloqueo de  $I_{Kir}$  por  $Ba^{2+}$  en astrocitos de médula espinal mostró un  $IC_{50}$  de  $3,5\mu M$  (Ransom y Sontheimer, 1995), mientras que los canales  $Kir2.1$ ,  $Kir2.2$  o  $Kir2.3$  expresados en ovocitos de *Xenopus laevis* produjeron  $IC_{50}$  de 2 a  $20\mu M$  (Schram y col., 2003). La aplicación de una concentración menor de  $Ba^{2+}$  ( $50\mu M$ ) mostró una reducción de  $I_{ini}$  solamente a potenciales hiperpolarizados, indicando que esta concentración bloquearía  $I_{Kir}$  sin afectar  $I_{K_{leak}}$  (Tanaka y col., 1991; Womble y Moises, 1993; Ransom y Sontheimer, 1995; Klein y col., 1999).

Para estimar  $I_{Kir}$  se obtuvo la corriente sensible a  $Ba^{2+}$   $200\mu M$  ( $I_{Ba}$ ) porque con esta concentración la inhibición de  $I_{Kir}$  sería completa. Sin embargo se mostró que también inhibiría una porción de  $I_{K_{leak}}$ . Por lo tanto para separar el componente dependiente del voltaje del independiente y obtener una estimación de  $I_{Kir}$  se le restó la

corriente de fuga (independiente del voltaje) luego del experimento (*off-line*) (figura 21). El componente de fuga fue aproximadamente 60pA. La amplitud de  $I_{kir}$  dependiente del voltaje obtenida a -120mV fue de  $-182,6 \pm 20,5$ pA y su activación presentó un componente instantáneo, más un componente lento que alcanzó el máximo en 35ms, confirmando la necesidad de bloquear  $I_{kir}$  para medir  $I_h$  especialmente a potenciales hiperpolarizados a los que el *delay* de  $I_h$  es más pequeño. El potencial de reversión de  $I_{kir}$  fue cercano al potencial de reversión del  $K^+$ , lo que indica que la aplicación de  $Ba^{2+}$  200 $\mu$ M bloquea canales selectivos para  $K^+$  (figura 21). La cinética de activación rápida y la dependencia del voltaje de la corriente obtenida de esta manera fueron coherentes con la presencia de una corriente mediada por canales Kir en estas neuronas. Consistentemente con estos resultados se reportó la presencia de  $I_{kir}$  e  $I_{k_{leak}}$  a recientemente en estas neuronas piramidales donde encontraron una  $I_{Ba}$  de iguales características a las mostradas aquí, que pudo ser reproducida bien por un modelo matemático que incluyó ambos canales, Kir2 (Kir2.1, Kir2.2 y Kir2.3) y  $K_{leak}$  (KCNK3 y KCNK9), cuyos ARNm se encontraron en NPLV de la corteza prefrontal mediante PCR reversa en célula única (Goldstein y col., 2001; Day y col., 2005).

#### *Contribución de $I_{kir}$ al potencial de reposo*

La aplicación de  $Ba^{2+}$  200 $\mu$ M en modo fijación de corriente provocó la despolarización del potencial de reposo 6,2mV concomitantemente al aumento de la  $R_m$ . Esto sugiere la contribución de una corriente mediada por canales de  $K^+$  al potencial de reposo, pudiendo ser tanto  $I_{k_{leak}}$  como  $I_{kir}$  o ambos. Sin embargo al aplicar  $Ba^{2+}$  50 $\mu$ M también se observó una despolarización del potencial de reposo, indicando que efectivamente canales tipo Kir también contribuyen a su mantenimiento (datos no mostrados). Esto es coherente con lo observado en otras neuronas (Takigawa y Alzheimer, 1999; Funahashi y col., 2003), e indica que a pesar de que los canales Kir2 son rectificadores fuertes pueden contribuir al mantenimiento del potencial de reposo (Nichols, 1997). El  $Cs^+$ , bloqueante tanto de  $I_{kir}$  como de  $I_h$ , aplicado en el medio extracelular provocó una hiperpolarización de 6mV debido a la inhibición de  $I_h$ . La inhibición que este ión ejerce sobre los canales Kir quedó ocluida respecto de su efecto sobre canales HCN probablemente porque presenta menor  $IC_{50}$  para  $I_h$  (100-200 $\mu$ M) que para  $I_{kir}$  (10-50mM) (Khakh y Henderson, 1998; Coetzee y col., 1999; Okabe y col.,

1999).

Estas evidencias sugieren que las NPLV poseen canales tipo Kir que contribuyen al potencial de reposo junto a  $I_{k_{leak}}$  para mantenerlo a potenciales más hiperpolarizados como en otras neuronas centrales (Uchimura y col., 1989). Se ha propuesto que en NPLV la presencia de  $I_{k_{leak}}$  e  $I_{kir}$  contribuyendo al mantener el potencial de reposo a potenciales hiperpolarizados permiten mantener  $I_h$  parcialmente activa, posibilitando a esta última a desactivarse ante potenciales despolarizantes (Day y col., 2005).

### **Caracterización de $I_h$**

#### *Sensibilidad a bloqueantes no selectivos*

Los experimentos en los que se estudiaron las características de  $I_h$  se realizaron en presencia de  $Ba^{2+}$  200 $\mu$ M para inhibir  $I_{kir}$ . Concentraciones de  $Ba^{2+}$  mayores inhibieron  $I_h$ , indicando que, al igual que en células CA1 de hipocampo (van Welie y col., 2005), para estudiar  $I_h$  en las NPLV el  $Ba^{2+}$  debe ser utilizado a concentraciones micromolares, y no del orden milimolar como ha sido utilizado en muchos trabajos. También se utilizaron bloqueantes de canales de  $K^+$  (TEA y 4-AP), de  $Na^+$  (TTX) y  $Ca^{2+}$  ( $Cd^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  o  $Ni^{2+}$ ) para reducir la posibilidad de contaminación por corrientes que se activan a potenciales despolarizados respecto del potencial de reposo (-50mV) como la corriente transitoria de  $K^+$  tipo A, la corriente de sodio persistente (INap), los canales de  $Ca^{2+}$  de bajo umbral y los potenciales de acción. En varios tipos celulares ha sido ampliamente probado que  $I_h$  es resistente a todas estas drogas (Takahashi, 1990; Solomon y Nerbonne, 1993b; Travagli y Gillis, 1994; Mercuri y col., 1995; Pape, 1996), inclusive en la corteza cerebral (Budde y col., 1994; Berger y col., 2001). De todas formas en experimentos preliminares se evaluó el efecto de las drogas utilizadas en las NPLV durante este trabajo en las siguientes concentraciones: TEA 10mM, 4-AP 2mM, TTX 1 $\mu$ M y  $Cd^{2+}$  100 $\mu$ M, y ninguno de estos bloqueantes mostró tener efectos sobre  $I_h$  (datos no mostrados).

*Efecto de ZD7288 sobre las corrientes activadas por hiperpolarización*

De acuerdo a lo esperado este bloqueante ejerció una inhibición dependiente de la dosis sobre el componente lento de la corriente activada por hiperpolarización confirmado de esta forma que se trataba de  $I_h$  (figura 22). ZD7288 inhibió  $I_h$  con un  $IC_{50}$  de  $1,6 \pm 0,6 \mu M$  a  $-90 mV$ , un potencial cercano al  $V_{50}$  ( $-83,6$ ). Este valor de inhibición fue similar a los obtenidos en otros trabajos donde  $I_h$  se evocó a potenciales similares. Por ejemplo en neuronas dopaminérgicas de la *sustantia nigra* evocando  $I_h$  con un pulso de  $-60$  a  $-97 mV$  se reportaron valores de  $IC_{50}$  de  $2 \mu M$  (Harris y Constanti, 1995), en neuronas CA1 de hipocampo de  $10,5 \mu M$  (pulso de  $-60$  a  $-100 mV$ ) (Gasparini y DiFrancesco, 1997) y en bastones fotorreceptores de  $6 \mu M$  (pulso de  $-35$  a  $-115 mV$ ) (Sato y Yamada, 2000). Hay que tener en cuenta que como el ZD7288 presenta un bloqueo dependiente del voltaje por cual tiende a liberarse a potenciales hiperpolarizados (Shin y col., 2001) el  $IC_{50}$  aparente será mayor cuanto mayor es el pulso hiperpolarizante con el cual se evocó  $I_h$ . Por esto se calculó el  $IC_{50}$  a un valor cercano al  $V_{50}$  ( $-90 mV$ ). También es posible que canales HCN compuestos por diferentes subunidades presenten distintas sensibilidades al ZD7288. Aunque no hay estudios comparativos al respecto se sabe que la subunidad HCN1 expresada en células HEK293 presentó un  $IC_{50}$  para ZD7288 de  $40 \mu M$  a  $-110 mV$  (Shin y col., 2001). Sin embargo en casi todas las neuronas se ha encontrado la expresión de más de una subunidad y no hay estudios de sensibilidad al ZD7288 con subunidades coexpresadas en sistemas heterólogos. En los ejemplos anteriores no hay relación entre el  $IC_{50}$  y la expresión de subunidades HCN en cada tipo celular. Los fotorreceptores solo expresarían la subunidad HCN1, mientras que las células dopaminérgicas se diferencian de las neuronas piramidales corticales, de las CA1 de hipocampo y los fotorreceptores de retina, en que no expresarían la subunidad HCN1 (Moosmang y col., 2001; Notomi y Shigemoto, 2004). Por lo tanto no se puede inferir la composición de subunidades en base a la sensibilidad al ZD7288.

El ZD7288 también bloqueo parcialmente el componente rápido de la corriente activada por hiperpolarización ( $I_{ini}$ ). Este efecto inesperado podría indicar la existencia de un componente rápido de  $I_h$  incluido en  $I_{ini}$ , o alternativamente, que ZD7288 inhiba otra corriente además de  $I_h$ . A continuación se analizan ambas posibilidades.

Aunque el ZD7288 es ampliamente utilizado como bloqueante selectivo de  $I_h$ , algunas



publicaciones recientes ponen en duda dicha selectividad. En principio se observó que esta droga induce cambios en la eficacia de la transmisión sináptica en las fibras musgosas de hipocampo por un mecanismo independiente de  $I_h$ , ya que el bloqueo de  $I_h$  con  $Cs^+$  no reprodujo los cambios en la transmisión sináptica (Chevaleyre y Castillo, 2002). Luego se vio que ZD7288 inhibió receptores de glutamato tipo AMPA y NMDA lo que podría explicar los cambios observados en la transmisión sináptica (Chen, 2004), pero no la generación de una corriente rápida observada durante la hiperpolarización como la que está en discusión. También se reportó que el ZD7288 bloqueaba canales de  $Ca^{2+}$  tipo T (de bajo umbral) que median la reacción acrosomática en espermatozoides de ratón, y todos los canales tipo T clonados y expresados en sistemas heterólogos (Felix y col., 2003). Si bien los canales de  $Ca^{2+}$  tipo T se activan a potenciales cercanos al reposo (aproximadamente  $-65mV$ ), estos presentan una fuerte inactivación cuando son mantenidos a potenciales despolarizados (Sayer y col., 1990) y no generan corriente cuando se aplica un pulso hiperpolarizante. En los experimentos realizados en fijación de voltaje durante este trabajo las células fueron mantenidas a  $-50mV$ , lo que inactiva los canales T e imposibilita que contribuyan a la corriente activada por hiperpolarización.

Como se explicó en la introducción, existen evidencias que indican que canales HCN expresados en sistemas heterólogos tienen un componente instantáneo y/o rápido (Yu y col., 2001; Proenza y col., 2002; Qu y col., 2004; Proenza y Yellen, 2006). Esto abre la posibilidad de que una  $I_h$  con componente de esas características se exprese en las NPLV, aunque hasta ahora no existen reportes que lo hayan mostrado en ninguna célula del sistema nervioso. Si  $I_h$  en las NPLV expresara un componente instantáneo o rápido, debido a la manera utilizada para calcular  $I_h$  (como  $I_{ee} - I_{ini}$ ), sería parte de  $I_{ini}$  (figura 17), induciendo un error de subestimación de  $I_h$ . Si esto fuese cierto  $I_h$  y la corriente sensible a ZD7288  $20\mu M$  ( $I_{ZD}$ ) deberían ser diferentes ( $I_{ZD} > I_h$ ), pero como se mostró en la figura 24,  $I_h$  estimada de cualquiera de las dos maneras, como  $I_{ee} - I_{ini}$  o como  $I_{ZD}$  reprodujo curvas I-V que no fueron significativamente diferentes (figura 24). Sin embargo las curvas I-V promedio de  $I_{ZD}$  muestran una tendencia a ser mayores en todo el rango de voltajes, lo puede interpretarse como que un componente rápido pequeño de  $I_h$  realmente quede incluido en  $I_{ini}$ . Aunque la diferencia entre las curvas no sea significativa existen motivos para pensar que un componente rápido de  $I_h$  está presente y explicaría el efecto de ZD sobre  $I_{ini}$ . La primera es que la curva de  $I_{ZD}$  fue realizada en presencia de ZD7288  $20\mu M$  que bloquea entre el 80 y 90% de  $I_h$  (figura

22C) lo que indica que si se hubiese utilizado una concentración mayor sería posible que la diferencia entre las curvas fuese significativa. Por otra parte la velocidad de activación de  $I_{ZD}$  fue de 24ms a -120mV (figura 24), un valor lo suficientemente rápido como para que una porción de  $I_{ZD}$  pueda superponerse con  $I_{ini}$  ya que esta se midió entre 10 y 40ms del inicio de la hiperpolarización. Estas evidencias apoyan la posibilidad de que  $I_h$  tenga un componente lo suficientemente rápido como para que el cálculo de  $I_h$  esté subestimado ligeramente y por lo tanto ZD7288 inhiba  $I_{ini}$ .

Las características de  $I_{ZD}$  e  $I_{Ba}$  muestran que son corrientes claramente diferentes. Mientras  $I_{Ba}$  se activa rápidamente con un máximo a los pocos milisegundos para luego inactivarse lentamente (figura 21),  $I_{ZD}$  se activa más lentamente (cientos de milisegundos en llegar al máximo) sin sufrir inactivación (figura 26). Las estimaciones de los  $t_{90}$  a -120mV fueron de 35ms para  $I_{Ba}$  y de 180ms para  $I_{ZD}$ . A pesar de estas diferencias, el componente rápido de  $I_{ZD}$  tiene un grado de superposición con el componente lento de  $I_{Ba}$ , lo que reafirma la necesidad de usar bloqueantes de  $I_{Kir}$  para medir  $I_h$ .

#### *Contribución al potencial de reposo*

La aplicación de los bloqueantes ZD7288 (figura 25) o  $Cs^+$  (datos no mostrados) provocaron una hiperpolarización del potencial de reposo 6,9mV y 6mV respectivamente. Esto significa que  $I_h$  contribuye activamente a mantener el potencial de reposo despolarizado unos 7mV en NPLV. La participación de  $I_h$  en el potencial de reposo es coherente con la curva de activación que indica que  $I_h$  estaría activa entre el 5 y 20% en el rango de potenciales de reposo (figura 28).  $I_h$  contribuye al mantenimiento del potencial de reposo en prácticamente todas las células en las que se ha descrito (Pape, 1996).

#### **Propiedades biofísicas de $I_h$**

##### *Limitaciones de la técnica de fijación del voltaje*

Los parámetros biofísicos obtenidos utilizando la técnica de fijación de voltaje con una sola pipeta son especialmente susceptibles a errores y pueden ser importantes en las partes distales de células tan extensas como las piramidales, especialmente con cambios de potencial importantes. Para reducir este error se tomaron algunos recaudos

(ver materiales y métodos) pero a pesar de estos la fijación de voltaje en los procesos lejanos de estas neuronas es imposible de controlar. Esta limitación puede evitarse mediante la realización de registros dendríticos en modo *cell attached* (Magee, 1998; Stuart y Spruston, 1998), donde se registra la actividad de una muy pequeña porción de membrana, pero que contiene suficiente cantidad de canales como para detectar corrientes macroscópicas. Sin embargo a diferencia de las neuronas piramidales CA1 de hipocampo y de corteza somatosensorial, las dendritas apicales de las neuronas piramidales de la corteza prefrontal poseerían menor calibre y no se encuentran en un mismo plano, dificultando esta estrategia (Day y col., 2005). Probablemente esto explique la casi inexistencia de trabajos de registros dendríticos en NPLV de la corteza prefrontal. Day y colaboradores utilizaron un modelo computacional para estudiar el impacto de una fijación de voltaje deficiente en las mediciones de corrientes mediadas por canales dependientes de voltaje en neuronas piramidales. En concordancia con lo descrito en estudios previos (Rall y col., 1992), observaron que aunque la corriente  $I_h$  de NPLV pudo ser aceptablemente reproducida por el modelo, los voltajes dendríticos de las simulaciones se desviaron significativamente del potencial somático especialmente a los potenciales más hiperpolarizados (-90 a -120mV), concluyendo que las conductancias máximas, la cinética de activación y la dependencia del voltaje registradas a esos potenciales estarían subestimadas utilizando registros somáticos.

Los resultados obtenidos fueron analizados y discutidos en función un importante número de trabajos realizados en condiciones similares y de otras técnicas como *cell-attach* teniendo en cuenta las anteriores limitaciones. Como se muestra a continuación los parámetros biofísicos de  $I_h$  ( $\tau$ ,  $V_{50}$ ,  $E_{Ih}$ ), obtenidos mediante registros somáticos en configuración célula entera fueron similares a los reportados tanto en modo célula y modo *cell-attached* de otras neuronas piramidales.

### *Cinética y amplitud*

La cinética de activación de  $I_h$  presentó las características distintivas de esta corriente, un curso temporal sigmoideo debido a un *delay* de algunos milisegundos y seguidamente un desarrollo lento hasta alcanzar el estado estacionario en aproximadamente 2s (figura 27A) La activación se ajustó significativamente mejor a ecuaciones exponenciales con dos constantes de tiempo, una rápida del orden de los

100ms ( $\tau_R$ ) y otra de más de 1 segundo ( $\tau_L$ ). Otras neuronas también poseen Ih cuya activación responde mejor a dos constantes de tiempo, por ejemplo las neuronas piramidales de corteza somatosensorial (Spain y col., 1987), neuronas piramidales de la corteza visual (Solomon y Nerbonne, 1993a) y neuronas del ganglio de la raíz dorsal (Wang y col., 1997), realizados todos con registros somáticos de la célula entera. En otras células se ha encontrado que la activación de Ih se describió mejor con una exponencial simple, como en neuronas relevo talámicas (McCormick y Pape, 1990b), neuronas piramidales CA1 de hipocampo (Maccaferri y col., 1993; Pedarzani y Storm, 1995), neuronas dopaminérgicas (Mercuri y col., 1995), neuronas de la amígdala (Womble y Moises, 1993) y neuronas del área postrema (Funahashi y col., 2002), también realizados en configuración célula entera. Por lo tanto, aunque la interpretación de la constante de tiempo lenta debe ser cautelosa en los experimentos realizados con un solo electrodo porque puede deberse a un control incompleto del voltaje, los antecedentes sugieren que la presencia de una o más constantes de tiempo depende del tipo celular (Santoro y Tibbs, 1999). En trabajos donde se caracterizó Ih en configuración *cell-attach* de dendritas de células piramidales, la activación se ajustó bien a una exponencial simple tanto en hipocampo (Magee, 1998) como en neuronas piramidales de la corteza somatosensorial (Williams y Stuart, 2000; Berger y col., 2001), sugiriendo que en los trabajos realizados anteriormente con un electrodo somático que informaron dos constantes de tiempo podrían ser erróneos. Sin embargo, algunos estudios (Magee, 1998; Berger y col., 2001) realizaron ajustes a tiempos cortos (~100ms) donde solo se puede determinar la constante rápida (Solomon y Nerbonne, 1993a), por lo tanto no se puede descartar la presencia de una lenta. Además, otra evidencia importante que sugiere la presencia de dos  $\tau$  se obtuvo cuando se expresaron las subunidades HCN1 y HCN2, las encontradas en neuronas piramidales, en ovocitos de *Xenopus*. La activación de la corriente resultante se ajustó mejor a dos  $\tau$  que no se explicarían por dos poblaciones de canales independientes, sino por una nueva población formada por ambas subunidades (Chen y col., 2001; Ulens y Tytgat, 2001a).

La constante de activación rápida observada en este trabajo ( $\tau_R$  ~170ms a -90mV) coincide con la observadas en neuronas piramidales de corteza visual a temperatura ambiente entre (Solomon y Nerbonne, 1993a) y con las registradas en otras regiones de la corteza a temperaturas más fisiológicas tomando en cuenta que Ih presenta un  $Q_{10}$  entre 2,5 y 4,5 (Spain y col., 1987; Magee, 1998; Santoro y Tibbs, 1999; Williams y

Stuart, 2000). La constante de activación rápida que poseen las neuronas piramidales se diferencia de otras neuronas especialmente subcorticales como tálamo y cerebro medio que presentan activaciones más lentas (McCormick y Pape, 1990b; Mercuri y col., 1995). El componente rápido de  $I_h$  determinaría que esta corriente tenga un mayor impacto en los eventos rápidos que ocurren en una neurona no solo por su velocidad, sino también porque en general contribuye con una mayor proporción a la corriente total que la lenta (60-80% dependiendo del potencial). Como consecuencia de estos se observó en células piramidales que eventos rápidos como potenciales de acción (Spain y col., 1991) y EPSPs (Magee, 1999) pueden ser regulados por  $I_h$  especialmente cuando son evocados en trenes de aproximadamente 100ms de duración. La constante de tiempo lenta podría influenciar eventos de un orden temporal mayor como por ejemplo la adaptación en frecuencia de potenciales de acción y la AHP de duración media y larga (Spain y col., 1987; Schwandt y col., 1988).

La velocidad de activación y la amplitud de  $I_h$  calculadas en este trabajo (170ms y 220 pA con un pulso de -50 a -90mV a temperatura ambiente) sugieren que en las NPLV de la CPF  $I_h$  también podría tener un rol en fenómenos relativamente rápidos además de su contribución al mantenimiento del potencial de reposo. Por lo tanto la presencia de dos constantes de tiempo durante la activación de  $I_h$  en estas neuronas reflejaría que esta corriente tendría un mecanismo complejo con dos componentes que pueden actuar a escalas de tiempo claramente distintas y por lo tanto pueden regular fenómenos diferentes.

#### *Rango de activación y $V_{50}$*

La curva de activación de  $I_h$  en el estado estacionario en función del voltaje obtenida de las corrientes de cola relativas, ajustó bien a la ecuación de Boltzmann. Como ya se mencionó en la sección anterior, la dependencia del voltaje muestra que  $I_h$  estaría activa entre un 5 y un 25% en el rango del potencial de reposo. El rango de activación de  $I_h$  en estas neuronas es muy similar al descrito en otras células piramidales, comienza a activarse a -50/-60mV y alcanza la conductancia máxima alrededor de -110/-120mV (Pape, 1996), inclusive con lo reportado en registros realizados en modo *cell-attach* sobre neuronas piramidales (Williams y Stuart, 2000; Berger y col., 2001). Recientemente se caracterizó por primera vez la corriente de canal

único de sistema nervioso en neuronas piramidales CA1 de hipocampo (Simeone y col., 2005), donde se confirmaron valores similares de dependencia del voltaje.

El voltaje de activación media ( $V_{50}$ , figura 28) en las NPLV de la corteza prefrontal fue de  $83,6 \pm 1\text{mV}$  con una pendiente ( $m$ ) de  $11,4 \pm 0,7$ . El  $V_{50}$  es muy similar a lo descrito en corteza somatosensorial ( $-82\text{mV}$ ) (Spain y col., 1987) y visual ( $-81\text{mV}$ ) (Solomon y Nerbonne, 1993b) mediante registros somáticos; y unos  $10\text{mV}$  más despolarizado que lo descrito mediante *cell-attach* en dendritas de neuronas piramidales de corteza somatosensorial ( $-92\text{mV}$  y  $-95\text{mV}$ ) (Williams y Stuart, 2000; Berger y col., 2001) e hipocampo ( $-90\text{mV}$ ) (Magee, 1998). La caracterización de las propiedades de canal único de  $I_h$  del soma de células CA1 de hipocampo mostraron un  $V_{50}$  de  $-81\text{mV}$  (Simeone y col., 2005). Este parámetro fue prácticamente independientes de la temperatura (Williams y Stuart, 2000). Estos datos indican una diferencia del  $V_{50}$  debida a la localización celular, como se reportó en células CA1 de hipocampo mediante *cell-attach* donde se mostraron valores de  $V_{50}$  de  $-82\text{mV}$  en los *patch* somáticos y  $-90\text{mV}$  en los *patch* dendríticos (Magee, 1998). Esta diferencia entre del  $V_{50}$   $I_h$  en el soma y las dendritas no fue reportada en neuronas piramidales de corteza, pero por las diferencias observadas entre los trabajos de registros somáticos de célula entera (Spain y col., 1987; Solomon y Nerbonne, 1993b) y dendríticos (Magee, 1998; Williams y Stuart, 2000; Berger y col., 2001) es posible que también exista, ya que como se mencionó al inicio de esta sección los registros somáticos subestiman el aporte de corrientes dendríticas. Dos explicaciones posibles para esta diferencia son una distribución asimétrica de las subunidades que se expresan en estas estructuras (HCN1 y HCN2) o una concentración citoplasmática diferente de algún regulador como el AMPc. Sin embargo no hay al momento evidencias que sustenten alguna de hipótesis. La distribución de ambas subunidades se superpone, especialmente en las dendritas de células piramidales.

La pendiente de las curvas de activación obtenidas en los trabajos mostrados en el párrafo anterior varió entre 6 y 13, también consistente con la calculada en este trabajo en las NPLV de la CPF (11,4). Este valor de pendiente de la curva de activación se reveló como una de las más altas indicando un fuerte dependencia del voltaje, que llega a ser casi el doble que en la corteza somatosesorial y visual, pero dentro del rango los valores descriptos tanto en tejidos como con las subunidades HCN1 y HCN2 expresadas en ovocitos (Ulens y Siegelbaum, 2003).

El potencial de reversión estimado para  $I_h$  ( $E_{Ih}$ ) en las NPLV fue de  $-17,6 \pm 2,4$ mV, y se ubicó en el límite superior del rango de los valores reportados en diversos grupos de neuronas,  $-50$ mV y  $-20$ mV (Pape, 1996), a concentraciones normales de iones intra y extracelulares. En neuronas piramidales de corteza visual e hipocampo se reportaron  $E_{Ih}$  de  $-22$ mV y  $-17$ mV respectivamente (Maccaferri y col., 1993; Solomon y Nerbonne, 1993b), mientras que en corteza somatosensorial se reportaron valores cercanos a  $-50$ mV (Spain y col., 1987; Berger y col., 2001). El valor de  $E_{Ih}$  obtenido es consistente con una corriente llevada por iones  $K^+$  y  $Na^+$ . La diferencia entre el  $E_{Ih}$  y el potencial de reposo de estas neuronas ( $\sim 50$ mV) sugiere que en condiciones de reposo  $I_h$  cuenta con un importante *driving force* y que por lo tanto con una pequeña proporción de canales activados podrían generar una  $I_h$  que contribuya significativamente al potencial de reposo.

### **Regulación por nucleótidos cíclicos**

La regulación de  $I_h$  a través de los niveles de AMPc es una de las propiedades que la hacen más interesante. Los efectos de receptores asociados a proteínas G sobre  $I_h$  a través de la regulación de la concentración de AMPc, pero independientes de fosforilaciones, ha sido reportado en una gran cantidad de de neuronas, por ejemplo en neuronas talamocorticales (Pape y McCormick, 1989; McCormick y Pape, 1990a), en neuronas dopaminérgicas del VTA (Jiang y col., 1993; Liu y col., 2003), en bastones fotorreceptores de la retina (Akopian y Witkovsky, 1996), en motoneuronas (Larkman y Kelly, 1997), en neuronas de la región CA1 de hipocampo (Gasparini y DiFrancesco, 1999; Bickmeyer y col., 2002), etc. Sin embargo, la modulación de  $I_h$  por monoaminas en neuronas piramidales de la corteza cerebral ha sido difícil de observar a pesar de que en la corteza se expresan varios tipos de receptores de dopamina, serotonina y noradrenalina, y llegan terminales con los tres tipos de monoaminas. Solo dos trabajos reportaron un efecto de la serotonina sobre  $I_h$ . Ambos mostraron que la serotonina aumentó la activación de  $I_h$ , uno en corteza somatosensorial (Spain, 1994) y otro en CPF pero solo durante una ventana de 5 a 15 días postnatales (Zhang, 2003). Al mismo tiempo otros estudios en CPF no han reportado efectos de monoaminas sobre  $I_h$  a pesar

de que esta corriente estaba presente en las neuronas registradas (Yang y Seamans, 1996; Berger y col., 2001), sugiriendo cierta insensibilidad diferencial de  $I_h$  en estas células (Kole y col., 2006).

Durante el desarrollo de esta tesis se estudió la posible modulación de  $I_h$  por dopamina y serotonina sobre la amplitud de  $I_h$  a  $-90$  o  $-120$ mV pero ninguna de las dos mostró tener efecto en un número importante de experimentos realizados (datos no mostrados). En algunas neuronas la serotonina aumentó  $I_{ini}$ , y a juzgar porque su efecto fue bloqueado en presencia de  $Ba^{2+}$   $200\mu M$ , se trató de una corriente de  $K^+$  aunque no fue posible distinguir si el efecto estaba mediado por  $I_{Kir}$  o  $I_{K_{leak}}$  (experimentos no mostrados). La ausencia de regulación de serotonina sobre  $I_h$  podría explicarse porque fue estudiado en una ventana temporal (15-20 días postnatales) donde la respuesta a de estas células serotonina estaría reducida por baja expresión de algunos de sus receptores (Zhang, 2003), aunque también se ha descrito que el efecto de la serotonina depende del subtipo de neurona piramidal (Spain, 1994). La falta de sensibilidad a dopamina debe enmarcarse en un contexto más complejo que con otras monoaminas. Existen decenas de trabajos mostrando efectos de este neurotransmisor sobre diferentes aspectos de la fisiología de las neuronas corticales pero muchas veces antagónicos (Penit-Soria y col., 1987; Geijo-Barrientos y Pastore, 1995; Yang y Seamans, 1996; Gullledge y Jaffe, 1998; Seamans y col., 2001; Seamans y Yang, 2004), y no parece haber una causa que explique esta variabilidad.

Para estudiar si la ausencia de modulación por monoaminas se debía a que  $I_h$  en estas neuronas era insensible a los nucleótidos cíclicos se utilizó el 8Br-AMPC, un análogo del AMPc. Cuando el 8Br-AMPC fue incluido en la solución de pipeta y las neuronas fueron registradas por períodos de aproximadamente 30min, se observó un aumento significativo de la amplitud de  $I_h$  a  $-90$ mV respecto de las neuronas registradas en la solución control (figura 30). De esta forma se previno el decaimiento o *run down* de  $I_h$  observado en la solución control sin sistema regenerador de ATP. Analizando las curvas de activación se observó que hubo un corrimiento significativo de la curva unos 6mV a la derecha. El 8Br-AMPC no aumentó significativamente la corriente máxima a  $-120$ mV un resultado que apoya un mecanismo de acción que no involucra un aumento de la conductancia máxima sino un cambio en la sensibilidad al voltaje. Estos resultados indican que  $I_h$  en estas células es sensible a los nucleótidos cíclicos, pero a juzgar por el decaimiento significativo a partir de  $\sim 20$ min con la solución control, y su prevención con



8Br-AMPC, la concentración intracelular de nucleótidos cíclicos sería suficiente para mantener la curva de activación de  $I_h$  a potenciales relativamente positivos. Por lo tanto un aumento de AMPc mediado por neurotransmisores podría no ser efectivo para correr aún más la curva hacia la derecha.

El grado de sensibilidad a los nucleótidos cíclicos observado como el corrimiento de la curva de activación aproximadamente +6mV es similar al observado en sistemas de expresión con ambas subunidades, HCN1 y HCN2, donde se mostró que el AMPc corrió la curva de activación de esta subunidad entre +7 y +14mV, mientras que HCN1 sola fue de 0 a +4mV (Chen y col., 2001; Ulens y Tytgat, 2001b). Sin embargo contrasta con lo descrito por Kole y colaboradores (2006) que describieron que  $I_h$  en dendritas de neuronas piramidales de la corteza somatosensorial medida por cell-attach fue resistente a concentraciones saturantes de 8Br-AMPC en la pipeta.

La extensión de la dendrita apical de las neuronas piramidales y la concentración de canales HCN en estas dendritas también podrían explicar la dificultad encontrada para detectar la regulación por monoaminas especialmente si el efecto es moderado, ya que como se discutió anteriormente una dendrita apical tan prominente hace virtualmente imposible controlar el voltaje en las partes lejanas mediante registros somáticos precisamente donde los canales HCN estarían más concentrados.

### **Contribución de $I_h$ al AHP**

La contribución de  $I_h$  al AHP se había estudiado en neuronas piramidales de hipocampo y corteza somatosensorial mediante registros electrofisiológicos y el modelado matemático de los parámetros obtenidos. Esos estudios concluyeron que  $I_h$  puede contribuir al AHP especialmente a la fase de repolarización (Schwindt y col., 1988; Storm, 1989). En el presente trabajo se observó que ZD7288 o  $\text{Cs}^+$  inhibían el AHP, sugiriendo que  $I_h$  contribuyendo también a la generación y no solo a la repolarización del AHP, como había sido mostrado en neuronas talamocorticales (McCormick y Pape, 1990b). Para estudiar el grado de participación de  $I_h$  en las AHP de las NPLV de la CPF primero se midió la amplitud de la AHP a tres potenciales y se encontró que a -80mV era significativamente mayor que a -70 o -60mV, un resultado inconsistente con que el AHP estuviera mediado por canales de  $\text{K}^+$ . Luego, utilizando bloqueantes de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  se encontró que estos reducían totalmente la AHPm a -60mV, parcialmente a -70mV y no tenían efecto a -80mV, confirmando que a

potenciales hiperpolarizados no hay contribución de canales  $K_{Ca}$ . Cuando se pasó el bloqueante de  $I_h$  ZD7288 se obtuvo un resultado opuesto, la amplitud de la AHPm se inhibió totalmente a -80 y -70mV mientras que no se vio afectada a -60mV. Estos resultados muestran que  $I_h$  puede contribuir al AHPm incluso en el potencial de reposo junto con canales  $K_{Ca}$  y reemplazar totalmente las corrientes de  $K^+$  a -80mV. En neuronas de la región CA1 de hipocampo recientemente se a publicado un resultado similar. En estas células la amplitud de la AHP a potenciales despolarizados estaría controlado por  $I_M$  mientras que a potenciales hiperpolarizados por  $I_h$ , como lo observado en esta tesis (Gu y col., 2005).

Resulta sencillo entender como  $I_h$  contribuye a la repolarización de la AHP porque es una corriente despolarizante; pero no es intuitivo como puede contribuir a la generación de una hiperpolarización. Esto se puede entender si consideramos una célula que al potencial de reposo  $I_h$  está parcialmente activa y contribuye al mantenimiento del potencial de reposo y la resistencia de membrana (como las estudiadas en este trabajo). La despolarización de la célula mantenida en el tiempo deactiva  $I_h$ , lo que provoca un *sag* hiperpolarizante y aumenta la resistencia de membrana. Cuando el estímulo despolarizante se cierra, el potencial no regresa al valor original sino a uno más hiperpolarizado. Dos factores contribuyen a la fase hiperpolarizante de la AHP: uno, el *sag* producido por la despolarización previa llevando el potencial a un valor más hiperpolarizado, del cual parte el cierre de la despolarización; dos, durante la deactivación de  $I_h$  por el pulso despolarizante aumenta la resistencia de membrana permitiendo un mayor cambio del potencial para el mismo pulso de corriente, pero ahora hiperpolarizante. Luego, a medida que  $I_h$  se activa con la propia hiperpolarización contribuye a la repolarización del potencial dando como resultado un AHP muy similar al clásico mediado por  $K_{Ca}$  (figura 5). A diferencia de la contribución de  $I_h$  a la repolarización (fase de subida) de la AHP, su contribución a hiperpolarización (fase de bajada) no implica el pasaje de corriente iónica sino que su propia deactivación genera el efecto hiperpolarizante hasta el comienzo de su activación (Nicoll y col., 1993; Magee, 1999; Robinson y Siegelbaum, 2003).

El mismo principio es el que explica como  $I_h$  reduce la duración de los EPSP evitando una mayor sumación temporal cuando ocurren a una frecuencia suficiente (Nicoll y col., 1993; Magee, 1999); y de manera similar se puede aplicar al efecto de  $I_h$  sobre los BAP que motivaron la siguiente parte de este trabajo.

La contribución de  $I_h$  permitiría que una célula cuyo potencial de reposo está unos pocos milivoltios hiperpolarizada respecto del reposo siga teniendo una AHPm igual o mayor que a potenciales más despolarizados. Como se mencionó en la introducción todas las NPLV poseen adaptación de la frecuencia de disparo, una característica que estaría mediada por la AHPm y regula su excitabilidad limitando la frecuencia de potenciales de acción. La contribución de  $I_h$  al AHPm a potenciales relativamente hiperpolarizados le permite a la célula conservar esta característica de su patrón de disparo en un rango de voltaje en donde la contribución de los canales  $K_{Ca}$ , clásicos mediadores del AHP, ya no podrían contribuir. Como se mostró en la figura 35, inclusive a potenciales dentro del rango del reposo de estas neuronas (-70mV) los canales  $K_{Ca}$  ya comenzarían a tener menor peso sobre el AHP mientras  $I_h$  contribuiría significativamente.

### **Efecto de $I_h$ sobre los potenciales propagados en la dendrita apical**

Como se mencionó anteriormente el efecto de  $I_h$  sobre los potenciales transmitidos por la dendrita apical de las neuronas piramidales ha sido estudiado en los EPSP con resultados novedosos que ayudan a entender mejor la integración sináptica (Magee, 1999; Williams y Stuart, 2000), pero sin embargo el efecto de  $I_h$  sobre un fenómeno descrito recientemente con importantes implicancias, como son los potenciales de acción propagados activamente del soma hacia las dendritas (BAP), no ha sido investigado salvo muy someramente en el mismo trabajo que describió el efecto de  $I_h$  sobre la integración de EPSP (Magee, 1998). Actualmente se cree que la mayor importancia de los BAP reside en su coincidencia temporal con los EPSP lejanos y que de esta forma generen cambios en la eficacia sináptica (Magee y Johnston, 1997), o alcancen el umbral de potenciales de  $Ca^{2+}$  dendríticos con la posibilidad de que estos cambien las propiedades de disparo de las neuronas piramidales (Stuart y Hausser, 2001). En el trabajo que estudiaron el efecto de  $I_h$  en los BAP, lo hacen en presencia de  $Cs^+$  y encuentran un aumento leve de la duración del los BAP registrados en la dendrita apical de células CA1 de hipocampo (Magee, 1998).

En estos experimentos se encontró que  $I_h$  regula también el curso temporal de los BAP en NPLV. Para ello utilizamos un indicador fluorescente de la concentración de  $Ca^{2+}$  que también es un buen estimador del grado de despolarización que ocurre en un determinado sitio celular (Waters y col., 2005). Se registró el cambio de fluorescencia en

el soma y la dendrita apical cercana (50-150 $\mu$ M) provocado por un tren de potenciales de acción somáticos a 50Hz, antes y durante la aplicación de ZD7288 o Cs<sup>+</sup>. Luego de la inhibición de Ih, la amplitud de los transitorios de Ca<sup>2+</sup> provocados por los BAP aumentó significativamente (20%) en la dendrita apical, mientras que no cambió en el soma. Estos resultados sugieren que los BAP son influenciados por la presencia de Ih en las dendritas lo suficiente como para modificar la entrada de Ca<sup>2+</sup>. El aumento de la entrada de Ca<sup>2+</sup> durante el bloqueo de Ih estaría relacionado con un aumento de la duración de los BAP, que mantendría más los canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje abiertos durante más tiempo. Es decir que. Ih estaría acortando la duración de los BAP y por lo tanto el tiempo que despolarizan la membrana, y por lo tanto ejercería el control sobre la entrada de Ca<sup>2+</sup> a través de canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje en la dendrita apical proximal (Markram y col., 1995).

El aumento de Ca<sup>2+</sup> observado en estas condiciones no se debió a potenciales de acción dendríticos, ya que la frecuencia utilizada es mucho menor a la frecuencia mínima (frecuencia crítica) para llegar al umbral de potenciales de acción de Ca<sup>2+</sup> dendríticos en estas neuronas en ausencia de EPSP. La frecuencia crítica de estas neuronas es bastante variable pero oscila normalmente entre 60 y 200Hz (Larkum y col., 1999b). Algunas células en las que, en registros somáticos, se observaron potenciales regenerativos de Ca<sup>2+</sup> luego del bloqueo de Ih, no fueron incluidas en el análisis. Sin embargo estas células (no mostradas) indican que al bloquear Ih es más probable que los BAP generen potenciales de acción de Ca<sup>2+</sup> dendríticos.

Este mecanismo fue confirmado recientemente registrando la propagación de un tren de BAP en presencia de ZD7288 donde observaron que, al igual que ocurre con los EPSP, también los BAP aumentan la sumación temporal manteniendo el potencial de membrana despolarizado durante más tiempo (Berger y col., 2003). Previamente se había reportado en NPLV que la entrada de Ca<sup>2+</sup> inducida por BAP es mediada solamente por canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje (Markram y col., 1995). Berger y colaboradores (2004) mostraron además que el bloqueo de Ih reduce la frecuencia crítica de potenciales de acción somáticos necesaria para alcanzar el umbral de disparo de potenciales regenerativos de Ca<sup>2+</sup> en la dendrita apical. Es decir que Ih reduce la posibilidad de que un potencial de acción somático alcance el umbral de disparo de las dendritas distales.

De esta forma, Ih junto con otras conductancias presentes en las dendritas controlaría el flujo de información somatodendrítico que comunica la vía de salida de

información (el sitio de iniciación de potenciales de acción somáticos) con la vía de entrada de información en las dendritas, que incluye el sitio de iniciación de potenciales de acción de  $\text{Ca}^{2+}$  y los EPSP.

La influencia de  $I_h$  sobre los BAP podría estar repercutiendo sobre los procesos que dependen de estos (ver introducción), como el BAC-*firing*, que por coincidencia de EPSP y BAP se genera un potencial de  $\text{Ca}^{2+}$  que induce el disparo en ráfagas en el soma (Larkum y col., 1999a), la plasticidad sináptica también mediada por coincidencia de BAP y EPSP (Magee y Johnston, 1997), o la liberación de neurotransmisores de las dendritas (Zilberter, 2000).

Un aspecto que ha sido poco estudiado hasta el momento es la posibilidad de que segundos mensajeros controlen los BAP (Tsubokawa, 2000; Gullledge y Stuart, 2003). Esta posibilidad toma más relevancia con la influencia que se mostró de  $I_h$  sobre los potenciales transmitidos a través de la dendrita apical y su sensibilidad al AMPc. Si bien  $I_h$  en las NPLV sería moderadamente sensible al AMPc (indujo un corrimiento de 6 mV de la curva de activación), las dendritas por ser compartimientos pequeños, podrían presentar cambios importantes y localizados de la concentración de AMPc con un estímulo, haciendo más factible que se induzcan cambios casi máximos de corrimiento de la curva de activación de  $I_h$ . Un estudio de la regulación de los BAP y el sitio de iniciación del potencial de acción por dopamina reportó recientemente resultados negativos (Gullledge y Stuart, 2003). Sin embargo se demostró que la dopamina regula la actividad de canales de  $\text{Na}^+$ , principales responsables de ambos fenómenos (Gorelova y Yang, 2000; Maurice y col., 2001). Es necesario considerar que las técnicas utilizadas pueden no ser las más adecuadas para estudiar la regulación fina y posiblemente localizada, ya que los registros dendríticos seguramente interfieren con los cambios de concentración de mensajeros intracelulares y el análisis de imágenes de  $\text{Ca}^{2+}$  no tiene una adecuada resolución temporal, además representa una medida indirecta de los cambios de potencial (Waters y col., 2005). Estas técnicas han sido y están siendo muy útiles para descubrir y caracterizar los BAP, pero probablemente haya que esperar el mejoramiento de colorantes fluorescentes sensibles al voltaje para poder estudiar los cambios sutiles que podrían ocurrir durante la regulación por neurotransmisores de fenómenos como los BAP.


# **CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

- Las neuronas piramidales de la lámina V de la corteza prefrontal poseen dos corrientes activadas por hiperpolarización,  $I_h$  e  $I_{Kir}$ . Ambas contribuyen activamente al mantenimiento del potencial de reposo de forma antagónica, mientras  $I_h$  despolariza,  $I_{Kir}$  hiperpolariza las neuronas.
- Por las características biofísicas (especialmente la cinética de activación rápida y la dependencia del voltaje) y la moderada sensibilidad a nucleótidos cíclicos,  $I_h$  en neuronas piramidales de lámina V son similares a las propiedades de canales HCN1 y HCN2 coexpresadas en sistemas heterólogos, y a la  $I_h$  descrita en otras regiones de la corteza.
- $I_h$ , junto con canales  $K_{Ca}$ , contribuye a la AHP de duración media dentro del rango de potenciales de reposo de las neuronas piramidales. A potenciales de membrana hiperpolarizados como  $-80\text{mV}$ , la AHP medio está totalmente mediado por  $I_h$ , mientras que a  $-60\text{mV}$  solo contribuyena la AHP los canales  $K_{Ca}$ .
- La presencia de  $I_h$  en estas neuronas reduce la entrada transitoria  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por potenciales de acción retropropagados (BAP), específicamente en la dendrita apical sin afectar la del soma. Esto indica que posiblemente la mayor concentración de canales HCN dendríticos reduce la duración de los BAP. Por lo tanto  $I_h$  contribuye mantener los compartimientos somático y dendrítico eléctricamente más alejados.



Pablo F. Pomata



Daniel J. Calvo

# **BIBLIOGRAFÍA**



## Bibliografía

- Akasu T, Shoji S, Hasuo H (1993) Inward rectifier and low-threshold calcium currents contribute to the spontaneous firing mechanism in neurons of the rat suprachiasmatic nucleus. *Pflugers Arch* 425:109-116.
- Akopian A, Witkovsky P (1996) D2 dopamine receptor-mediated inhibition of a hyperpolarization-activated current in rod photoreceptors. *J Neurophysiol* 76:1828-1835.
- Araki T, Ito M, Oshima T (1961) Potential changes produced by application of current steps in motoneurons. *Nature* 191:1104-1105.
- Arnsten AF (1998) Catecholamine modulation of prefrontal cortical cognitive function. *Trends in Cognitive Science* 2:436-447.
- Bader CR, Macleish PR, Schwartz EA (1979) A voltage-clamp study of the light response in solitary rods of the tiger salamander. *J Physiol* 296:1-26.
- Bal T, McCormick DA (1997) Synchronized oscillations in the inferior olive are controlled by the hyperpolarization-activated cation current  $I(h)$ . *J Neurophysiol* 77:3145-3156.
- Bardo MT, Donohew RL, Harrington NG (1996) Psychobiology of novelty seeking and drug seeking behavior. *Behav Brain Res* 77:23-43.
- Bayliss DA, Viana F, Bellingham MC, Berger AJ (1994) Characteristics and postnatal development of a hyperpolarization-activated inward current in rat hypoglossal motoneurons in vitro. *J Neurophysiol* 71:119-128.
- Beaumont V, Zucker RS (2000) Enhancement of synaptic transmission by cyclic AMP modulation of presynaptic  $I_h$  channels. *Nat Neurosci* 3:133-141.
- Beaumont V, Zhong N, Froemke RC, Ball RW, Zucker RS (2002) Temporal synaptic tagging by  $I(h)$  activation and actin: involvement in long-term facilitation and cAMP-induced synaptic enhancement. *Neuron* 33:601-613.
- Bell DC, Yao H, Saenger RC, Riley JH, Siegelbaum SA (2004) Changes in local  $S4$  environment provide a voltage-sensing mechanism for mammalian hyperpolarization-activated HCN channels. *J Gen Physiol* 123:5-19.
- Bender RA, Brewster A, Santoro B, Ludwig A, Hofmann F, Biel M, Baram TZ (2001) Differential and age-dependent expression of hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated cation channel isoforms 1-4 suggests evolving roles in the developing rat hippocampus. *Neuroscience* 106:689-698.
- Berger T, Larkum ME, Luscher HR (2001) High  $I(h)$  channel density in the distal apical dendrite of layer V pyramidal cells increases bidirectional attenuation of EPSPs. *J Neurophysiol* 85:855-868.
- Berger T, Senn W, Luscher HR (2003) Hyperpolarization-Activated Current  $I_h$  Disconnects Somatic and Dendritic Spike Initiation Zones in Layer V Pyramidal Neurons. *J Neurophysiol* 90:2428-2437.
- Bi GQ, Poo MM (1998) Synaptic modifications in cultured hippocampal neurons: dependence on spike timing, synaptic strength, and postsynaptic cell type. *J Neurosci* 18:10464-10472.
- Bichet D, Haass FA, Jan LY (2003) Merging functional studies with structures of inward-rectifier  $K(+)$  channels. *Nat Rev Neurosci* 4:957-967.
- Bickmeyer U, Heine M, Manzke T, Richter DW (2002) Differential modulation of  $I(h)$  by 5-HT receptors in mouse CA1 hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 16:209-218.
- Bois P, Bescond J, Renaudon B, Lenfant J (1996) Mode of action of bradycardic agent, S 16257, on ionic currents of rabbit sinoatrial node cells. *Br J Pharmacol* 118:1051-1057.
- Bond CT, Herson PS, Strassmaier T, Hammond R, Stackman R, Maylie J, Adelman JP (2004) Small conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^{+}$  channel knock-out mice reveal the identity of calcium-dependent afterhyperpolarization currents. *J Neurosci* 24:5301-5306.
- BoSmith RE, Briggs I, Sturgess NC (1993) Inhibitory actions of ZENECA ZD7288 on whole-cell hyperpolarization activated inward current ( $I_f$ ) in guinea-pig dissociated sinoatrial node cells. *Br J Pharmacol* 110:343-349.

- Broersen LM, Heinsbroek RP, de Bruin JP, Uylings HB, Olivier B (1995) The role of the medial prefrontal cortex of rats in short-term memory functioning: further support for involvement of cholinergic, rather than dopaminergic mechanisms. *Brain Res* 674:221-229.
- Brown H, DiFrancesco D (1980) Voltage-clamp investigations of membrane currents underlying pace-maker activity in rabbit sino-atrial node. *J Physiol* 308:331-351.
- Budde T, White JA, Kay AR (1994) Hyperpolarization-activated Na<sup>(+)</sup>-K<sup>+</sup> current (I<sub>h</sub>) in neocortical neurons is blocked by external proteolysis and internal TEA. *J Neurophysiol* 72:2737-2742.
- Chan CS, Shigemoto R, Mercer JN, Surmeier DJ (2004) HCN2 and HCN1 channels govern the regularity of autonomous pacemaking and synaptic resetting in globus pallidus neurons. *J Neurosci* 24:9921-9932.
- Chen C (2004) ZD7288 inhibits postsynaptic glutamate receptor-mediated responses at hippocampal perforant path-granule cell synapses. *Eur J Neurosci* 19:643-649.
- Chen S, Wang J, Siegelbaum SA (2001) Properties of hyperpolarization-activated pacemaker current defined by coassembly of HCN1 and HCN2 subunits and basal modulation by cyclic nucleotide. *J Gen Physiol* 117:491-504.
- Chevalyere V, Castillo PE (2002) Assessing the role of I<sub>h</sub> channels in synaptic transmission and mossy fiber LTP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:9538-9543.
- Clark S, Jordt SE, Jentsch TJ, Mathie A (1998) Characterization of the hyperpolarization-activated chloride current in dissociated rat sympathetic neurons. *J Physiol* 506 ( Pt 3):665-678.
- Coetzee WA, Amarillo Y, Chiu J, Chow A, Lau D, McCormack T, Moreno H, Nadal MS, Ozaita A, Pountney D, Saganich M, Vega-Saenz de Miera E, Rudy B (1999) Molecular diversity of K<sup>+</sup> channels. *Ann N Y Acad Sci* 868:233-285.
- Connors BW (1994) Intrinsic neuronal physiology and the functions, dysfunctions and development of neocortex. *Prog Brain Res* 102:195-203.
- Connors BW, Gutnick MJ (1990) Intrinsic firing patterns of diverse neocortical neurons. *Trends Neurosci* 13:99-104.
- Cuttle MF, Rusznak Z, Wong AY, Owens S, Forsythe ID (2001) Modulation of a presynaptic hyperpolarization-activated cationic current (I<sub>h</sub>) at an excitatory synaptic terminal in the rat auditory brainstem. *J Physiol* 534:733-744.
- Day M, Carr DB, Ulrich S, Ilijic E, Tkatch T, Surmeier DJ (2005) Dendritic excitability of mouse frontal cortex pyramidal neurons is shaped by the interaction among HCN, Kir2, and K<sub>leak</sub> channels. *J Neurosci* 25:8776-8787.
- Degenetais E, Thierry AM, Glowinski J, Gioanni Y (2002) Electrophysiological properties of pyramidal neurons in the rat prefrontal cortex: an in vivo intracellular recording study. *Cereb Cortex* 12:1-16.
- Delatour B, Gisquet-Verrier P (2000) Functional role of rat prelimbic-infralimbic cortices in spatial memory: evidence for their involvement in attention and behavioural flexibility. *Behav Brain Res* 109:113-128.
- Delatour B, Gisquet-Verrier P (2001) Involvement of the dorsal anterior cingulate cortex in temporal behavioral sequencing: subregional analysis of the medial prefrontal cortex in rat. *Behav Brain Res* 126:105-114.
- DiFrancesco D (1981) A study of the ionic nature of the pace-maker current in calf Purkinje fibres. *J Physiol* 314:377-393.
- DiFrancesco D (1993) Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. *Annu Rev Physiol* 55:455-472.
- DiFrancesco D (1994) Some properties of the UL-FS 49 block of the hyperpolarization-activated current (i<sub>f</sub>) in sino-atrial node myocytes. *Pflügers Arch* 427:64-70.
- DiFrancesco D, Tortora P (1991) Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature* 351:145-147.
- Doan TN, Stephans K, Ramirez AN, Glazebrook PA, Andresen MC, Kunze DL (2004) Differential distribution and function of hyperpolarization-activated channels in sensory neurons and mechanosensitive fibers. *J Neurosci* 24:3335-3343.

- Dounnik CA, Davidson N, Lester HA (1995) The inward rectifier potassium channel family. *Curr Opin Neurobiol* 5:268-277.
- Dunnett SB (1990) Role of prefrontal cortex and striatal output systems in short-term memory deficits associated with ageing, basal forebrain lesions, and cholinergic-rich grafts. *Can J Psychol* 44:210-232.
- Edwards FA, Konnerth A, Sakmann B, Takahashi T (1989) A thin slice preparation for patch clamp recordings from neurones of the mammalian central nervous system. *Pflugers Arch* 414:600-612.
- Enz R, Ross BJ, Cutting GR (1999) Expression of the voltage-gated chloride channel ClC-2 in rod bipolar cells of the rat retina. *J Neurosci* 19:9841-9847.
- Fain GL, Quandt FN, Bastian BL, Gerschenfeld HM (1978) Contribution of a caesium-sensitive conductance increase to the rod photoresponse. *Nature* 272:466-469.
- Felix R, Sandoval A, Sanchez D, Gomora JC, De la Vega-Beltran JL, Trevino CL, Darszon A (2003) ZD7288 inhibits low-threshold Ca(2+) channel activity and regulates sperm function. *Biochem Biophys Res Commun* 311:187-192.
- Franklin KBJ, Paxinos G (1996) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*: Academic Press, San Diego.
- Franz O, Liss B, Neu A, Roeper J (2000) Single-cell mRNA expression of HCN1 correlates with a fast gating phenotype of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated ion channels (I<sub>h</sub>) in central neurons. *Eur J Neurosci* 12:2685-2693.
- Frere SG, Luthi A (2004) Pacemaker channels in mouse thalamocortical neurones are regulated by distinct pathways of cAMP synthesis. *J Physiol* 554:111-125.
- Friedman A, Gutnick MJ (1989) Intracellular Calcium and Control of Burst Generation in Neurons of Guinea-Pig Neocortex in Vitro. *Eur J Neurosci* 1:374-381.
- Funahashi M, Mitoh Y, Matsuo R (2002) Electrophysiological properties of the rat area postrema neurons displaying both the transient outward current and the hyperpolarization-activated inward current. *Brain Res Bull* 58:337-343.
- Funahashi M, Mitoh Y, Kohjitani A, Matsuo R (2003) Role of the hyperpolarization-activated cation current (I<sub>h</sub>) in pacemaker activity in area postrema neurons of rat brain slices. *J Physiol* 552:135-148.
- Funahashi S, Bruce CJ, Goldman-Rakic PS (1989) Mnemonic coding of visual space in the monkey's dorsolateral prefrontal cortex. *J Neurophysiol* 61:331-349.
- Fuster JM (2001) The prefrontal cortex--an update: time is of the essence. *Neuron* 30:319-333.
- Fuster JM, Alexander GE (1971) Neuron activity related to short-term memory. *Science* 173:652-654.
- Gasparini S, DiFrancesco D (1997) Action of the hyperpolarization-activated current (I<sub>h</sub>) blocker ZD 7288 in hippocampal CA1 neurons. *Pflugers Arch* 435:99-106.
- Gasparini S, DiFrancesco D (1999) Action of serotonin on the hyperpolarization-activated cation current (I<sub>h</sub>) in rat CA1 hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 11:3093-3100.
- Geijo-Barrientos E, Pastore C (1995) The effects of dopamine on the subthreshold electrophysiological responses of rat prefrontal cortex neurons in vitro. *Eur J Neurosci* 7:358-366.
- Goldstein SA, Bockenhauer D, O'Kelly I, Zilberberg N (2001) Potassium leak channels and the KCNK family of two-P-domain subunits. *Nat Rev Neurosci* 2:175-184.
- Gorelova NA, Yang CR (2000) Dopamine D1/D5 receptor activation modulates a persistent sodium current in rat prefrontal cortical neurons in vitro. *J Neurophysiol* 84:75-87.
- Gu N, Vervaeke K, Hu H, Storm JF (2005) Kv7/KCNQ/M and HCN/h, but not KCa2/SK channels, contribute to the somatic medium after-hyperpolarization and excitability control in CA1 hippocampal pyramidal cells. *J Physiol* 566:689-715.
- Gulledge AT, Jaffe DB (1998) Dopamine decreases the excitability of layer V pyramidal cells in the rat prefrontal cortex. *J Neurosci* 18:9139-9151.
- Gulledge AT, Stuart GJ (2003) Action potential initiation and propagation in layer 5 pyramidal neurons of the rat prefrontal cortex: absence of dopamine modulation. *J Neurosci* 23:11363-11372.
- Gutnick M, Mody I (1995) *The Cortical Neuron*. New York: Oxford University Press.

- Hagiwara N, Irisawa H, Kasanuki H, Hosoda S (1992) Background current in sino-atrial node cells of the rabbit heart. *J Physiol* 448:53-72.
- Halliwel JV, Adams PR (1982) Voltage-clamp analysis of muscarinic excitation in hippocampal neurons. *Brain Res* 250:71-92.
- Harris NC, Constanti A (1995) Mechanism of block by ZD 7288 of the hyperpolarization-activated inward rectifying current in guinea pig substantia nigra neurons in vitro. *J Neurophysiol* 74:2366-2378.
- Harris NC, Libri V, Constanti A (1994) Selective blockade of the hyperpolarization-activated cationic current (I<sub>h</sub>) in guinea pig substantia nigra pars compacta neurones by a novel bradycardic agent, Zeneca ZM 227189. *Neurosci Lett* 176:221-225.
- Helmchen F, Imoto K, Sakmann B (1996) Ca<sup>2+</sup> buffering and action potential-evoked Ca<sup>2+</sup> signaling in dendrites of pyramidal neurons. *Biophys J* 70:1069-1081.
- Hille B (2001) Ionic channels of excitable membranes. Sunderland: Sinauer.
- Huang CC, Hsu KS (2003) Reexamination of the role of hyperpolarization-activated cation channels in short- and long-term plasticity at hippocampal mossy fiber synapses. *Neuropharmacology* 44:968-981.
- Huang CC, Hsu KS (2006) Presynaptic mechanism underlying cAMP-induced synaptic potentiation in medial prefrontal cortex pyramidal neurons. *Mol Pharmacol* 69:846-856.
- Ito M, Oshima T (1965) Electrical behaviour of the motoneurone membrane during intracellularly applied current steps. *J Physiol* 180:607-635.
- Jiang ZG, Pessia M, North RA (1993) Dopamine and baclofen inhibit the hyperpolarization-activated cation current in rat ventral tegmental neurones. *J Physiol* 462:753-764.
- Kaiser KM, Zilberter Y, Sakmann B (2001) Back-propagating action potentials mediate calcium signalling in dendrites of bitufted interneurons in layer 2/3 of rat somatosensory cortex. *J Physiol* 535:17-31.
- Katz B (1949) Les constantes electriques de la membrane du muscle. *Arch Sci Physiol* 3:285-299.
- Khakh BS, Henderson G (1998) Hyperpolarization-activated cationic currents (I<sub>h</sub>) in neurones of the trigeminal mesencephalic nucleus of the rat. *J Physiol* 510 ( Pt 3):695-704.
- Klein H, Garneau L, Coady M, Lemay G, Lapointe JY, Sauve R (1999) Molecular characterization of an inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel from HeLa cells. *J Membr Biol* 167:43-52.
- Koester HJ, Sakmann B (1998) Calcium dynamics in single spines during coincident pre- and postsynaptic activity depend on relative timing of back-propagating action potentials and subthreshold excitatory postsynaptic potentials. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:9596-9601.
- Kolb B, Sutherland RJ, Whishaw IQ (1983) A comparison of the contributions of the frontal and parietal association cortex to spatial localization in rats. *Behav Neurosci* 97:13-27.
- Kole MHP, Hallermann S, Stuart GJ. (2006) Single I<sub>h</sub> Channels in Pyramidal Neuron Dendrites: Properties, Distribution, and Impact on Action Potential Output. *J Neurosci* 26(6):1677-1687.
- Kubo Y, Baldwin TJ, Jan YN, Jan LY (1993) Primary structure and functional expression of mouse inward rectifier potassium channel. *Nature* 362:127-133.
- Larkman PM, Kelly JS (1997) Modulation of I<sub>h</sub> by 5-HT in neonatal rat motoneurons in vitro: mediation through a phosphorylation independent action of cAMP. *Neuropharmacology* 36:721-733.
- Larkum M, Zhu J, Sakmann B (1999a) A new cellular mechanism for coupling inputs arriving at different cortical layers. *NATURE* 398:338-341.
- Larkum ME, Kaiser KM, Sakmann B (1999b) Calcium electrogenesis in distal apical dendrites of layer 5 pyramidal cells at a critical frequency of back-propagating action potentials. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:14600-14604.
- Lewis A, McCrossan ZA, Abbott GW (2004) MinK, MiRP1, and MiRP2 diversify Kv3.1 and Kv3.2 potassium channel gating. *J Biol Chem* 279:7884-7892.
- Li WC, Soffe SR, Roberts A (2004) A direct comparison of whole cell patch and sharp electrodes by simultaneous recording from single spinal neurons in frog tadpoles. *J Neurophysiol* 92:380-386.

- Linden DJ (1999) The return of the spike: postsynaptic action potentials and the induction of LTP and LTD. *Neuron* 22:661-666.
- Liu Z, Bunney EB, Appel SB, Brodie MS (2003) Serotonin reduces the hyperpolarization-activated current (I<sub>h</sub>) in ventral tegmental area dopamine neurons: involvement of 5-HT<sub>2</sub> receptors and protein kinase C. *J Neurophysiol* 90:3201-3212.
- Lorincz A, Notomi T, Tamas G, Shigemoto R, Nusser Z (2002) Polarized and compartment-dependent distribution of HCN1 in pyramidal cell dendrites. *Nat Neurosci* 5:1185-1193.
- Ludwig A, Zong X, Jeglitsch M, Hofmann F, Biel M (1998) A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature* 393:587-591.
- Luthi A, McCormick DA (1999) Modulation of a pacemaker current through Ca<sup>2+</sup>-induced stimulation of cAMP production. *Nat Neurosci* 2:634-641.
- Maccaferri G, McBain CJ (1996) The hyperpolarization-activated current (I<sub>h</sub>) and its contribution to pacemaker activity in rat CA1 hippocampal stratum oriens-alveus interneurons. *J Physiol* 497 ( Pt 1):119-130.
- Maccaferri G, Mangoni M, Lazzari A, DiFrancesco D (1993) Properties of the hyperpolarization-activated current in rat hippocampal CA1 pyramidal cells. *J Neurophysiol* 69:2129-2136.
- MacDermott AB, Weight FF (1982) Action potential repolarization may involve a transient, Ca<sup>2+</sup>-sensitive outward current in a vertebrate neurone. *Nature* 300:185-188.
- Magee JC (1998) Dendritic hyperpolarization-activated currents modify the integrative properties of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* 18:7613-7624.
- Magee JC (1999) Dendritic I<sub>h</sub> normalizes temporal summation in hippocampal CA1 neurons. *Nat Neurosci* 2:508-514.
- Magee JC (2000) Dendritic integration of excitatory synaptic input. *Nat Rev Neurosci* 1:181-190.
- Magee JC, Johnston D (1997) A synaptically controlled, associative signal for Hebbian plasticity in hippocampal neurons. *Science* 275:209-213.
- Mannikko R, Elinder F, Larsson HP (2002) Voltage-sensing mechanism is conserved among ion channels gated by opposite voltages. *Nature* 419:837-841.
- Maravall M, Mainen ZF, Sabatini BL, Svoboda K (2000) Estimating intracellular calcium concentrations and buffering without wavelength ratioing. *Biophys J* 78:2655-2667.
- Markram H, Helm PJ, Sakmann B (1995) Dendritic calcium transients evoked by single back-propagating action potentials in rat neocortical pyramidal neurons. *J Physiol* 485 ( Pt 1):1-20.
- Markram H, Lubke J, Frotscher M, Sakmann B (1997) Regulation of synaptic efficacy by coincidence of postsynaptic APs and EPSPs. *Science* 275:213-215.
- Maurice N, Tkatch T, Meisler M, Sprunger LK, Surmeier DJ (2001) D1/D5 dopamine receptor activation differentially modulates rapidly inactivating and persistent sodium currents in prefrontal cortex pyramidal neurons. *J Neurosci* 21:2268-2277.
- McCormick DA, Pape HC (1990a) Noradrenergic and serotonergic modulation of a hyperpolarization-activated cation current in thalamic relay neurones. *J Physiol* 431:319-342.
- McCormick DA, Pape HC (1990b) Properties of a hyperpolarization-activated cation current and its role in rhythmic oscillation in thalamic relay neurones. *J Physiol* 431:291-318.
- McCrossan ZA, Abbott GW (2004) The MinK-related peptides. *Neuropharmacology* 47:787-821.
- Mellor J, Nicoll R, Schmitz D (2002) Mediation of Hippocampal Mossy Fiber Long-Term Potentiation by Presynaptic I<sub>h</sub> Channels. *Science* 295:143-147.
- Mercuri NB, Bonci A, Calabresi P, Stefani A, Bernardi G (1995) Properties of the hyperpolarization-activated cation current I<sub>h</sub> in rat midbrain dopaminergic neurons. *Eur J Neurosci* 7:462-469.
- Miller EK (2000) The prefrontal cortex and cognitive control. *Nat Rev Neurosci* 1:59-65.
- Mironov SL, Langohr K, Richter DW (2000) Hyperpolarization-activated current, I<sub>h</sub>, in inspiratory brainstem neurons and its inhibition by hypoxia. *Eur J Neurosci* 12:520-526.
- Moosmang S, Biel M, Hofmann F, Ludwig A (1999) Differential distribution of four hyperpolarization-activated cation channels in mouse brain. *Biol Chem* 380:975-980.

- Moosmang S, Stieber J, Zong X, Biel M, Hofmann F, Ludwig A (2001) Cellular expression and functional characterization of four hyperpolarization-activated pacemaker channels in cardiac and neuronal tissues. *Eur J Biochem* 268:1646-1652.
- Muir JL, Everitt BJ, Robbins TW (1996) The cerebral cortex of the rat and visual attentional function: dissociable effects of mediofrontal, cingulate, anterior dorsolateral, and parietal cortex lesions on a five-choice serial reaction time task. *Cereb Cortex* 6:470-481.
- Nichols CGaL, A. N. (1997) Inward rectifier potassium channels. *Annu Rev Physiol* 59:171-191.
- Nicoll A, Larkman A, Blakemore C (1993) Modulation of EPSP shape and efficacy by intrinsic membrane conductances in rat neocortical pyramidal neurons in vitro. *J Physiol* 468:693-710.
- Noma A, Irisawa H (1976) Membrane currents in the rabbit sinoatrial node cell as studied by the double microelectrode method. *Pflugers Arch* 364:45-52.
- Notomi T, Shigemoto R (2004) Immunohistochemical localization of Ih channel subunits, HCN1-4, in the rat brain. *J Comp Neurol* 471:241-276.
- Okabe K, Inoue Y, Kawarabayashi T, Kajiya H, Okamoto F, Soeda H (1999) Physiological significance of hyperpolarization-activated inward currents (Ih) in smooth muscle cells from the circular layers of pregnant rat myometrium. *Pflugers Arch* 439:76-85.
- Ongur D, Price JL (2000) The organization of networks within the orbital and medial prefrontal cortex of rats, monkeys and humans. *Cereb Cortex* 10:210-219.
- Ono K, Maruoka F, Noma A (1994) Voltage- and time-dependent block of I(f) by Sr<sup>2+</sup> in rabbit sino-atrial node cells. *Pflugers Arch* 427:437-443.
- Pape HC (1994) Specific bradycardic agents block the hyperpolarization-activated cation current in central neurons. *Neuroscience* 59:363-373.
- Pape HC (1996) Queer current and pacemaker: the hyperpolarization-activated cation current in neurons. *Annu Rev Physiol* 58:299-327.
- Pape HC, McCormick DA (1989) Noradrenaline and serotonin selectively modulate thalamic burst firing by enhancing a hyperpolarization-activated cation current. *Nature* 340:715-718.
- Pape HC, Mager R (1992) Nitric oxide controls oscillatory activity in thalamocortical neurons. *Neuron* 9:441-448.
- Pedarzani P, Storm JF (1995) Protein kinase A-independent modulation of ion channels in the brain by cyclic AMP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:11716-11720.
- Penit-Soria J, Audinat E, Crepel F (1987) Excitation of rat prefrontal cortical neurons by dopamine: an in vitro electrophysiological study. *Brain Res* 425:263-274.
- Perkins KL, Wong RK (1995) Intracellular QX-314 blocks the hyperpolarization-activated inward current Iq in hippocampal CA1 pyramidal cells. *J Neurophysiol* 73:911-915.
- Preuss T (1995) Do rats have prefrontal cortex? The Rose-Woolsey-Akert program reconsidered. *Journal of Cognitive Neuroscience* 7:1-24.
- Proenza C, Yellen G (2006) Distinct Populations of HCN Pacemaker Channels Produce Voltage-dependent and Voltage-independent Currents. *J Gen Physiol* 127:183-190.
- Proenza C, Angoli D, Agranovich E, Macri V, Accili EA (2002) Pacemaker channels produce an instantaneous current. *J Biol Chem* 277:5101-5109.
- Qu J, Kryukova Y, Potapova IA, Doronin SV, Larsen M, Krishnamurthy G, Cohen IS, Robinson RB (2004) MiRP1 modulates HCN2 channel expression and gating in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 279:43497-43502.
- Rall W (1967) Distinguishing theoretical synaptic potentials computed for different somadendritic distributions of synaptic input. *J Neurophysiol* 30:1138-1168.
- Rall W, Burke RE, Holmes WR, Jack JJ, Redman SJ, Segev I (1992) Matching dendritic neuron models to experimental data. *Physiol Rev* 72:S159-186.
- Raman IM, Bean BP (1999) Ionic currents underlying spontaneous action potentials in isolated cerebellar Purkinje neurons. *J Neurosci* 19:1663-1674.
- Ransom CB, Sontheimer H (1995) Biophysical and pharmacological characterization of inwardly rectifying K<sup>+</sup> currents in rat spinal cord astrocytes. *J Neurophysiol* 73:333-346.
- Reinmann FaA, F. (1999) Inward rectifying potassium channels. *Curr Opin Cell Biol* 11:503-508.

- Robinson RB, Siegelbaum SA (2003) Hyperpolarization-activated cation currents: from molecules to physiological function. *Annu Rev Physiol* 65:453-480.
- Rodrigues AR, Oertel D (2006) Hyperpolarization-activated currents regulate excitability in stellate cells of the mammalian ventral cochlear nucleus. *J Neurophysiol* 95:76-87.
- Sah P, Faber ES (2002) Channels underlying neuronal calcium-activated potassium currents. *Prog Neurobiol* 66:345-353.
- Sakmann BaN, E (1995) *Single Channel Recording*, second Edition: Plenum Press.
- Santoro B, Tibbs GR (1999) The HCN gene family: molecular basis of the hyperpolarization-activated pacemaker channels. *Ann N Y Acad Sci* 868:741-764.
- Santoro B, Grant S, Bartsch D, ER K (1997) Interactive cloning with the SH3 domain of N-src identifies a new brain specific ion channel protein, with homology to eag and cyclic nucleotide-gated channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:14815-14820.
- Santoro B, Liu DT, Yao H, Bartsch D, Kandel ER, Siegelbaum SA, Tibbs GR (1998) Identification of a gene encoding a hyperpolarization-activated pacemaker channel of brain. *Cell* 93:717-729.
- Santoro B, Chen S, Luthi A, Pavlidis P, Shumyatsky GP, Tibbs GR, Siegelbaum SA (2000) Molecular and functional heterogeneity of hyperpolarization-activated pacemaker channels in the mouse CNS. *J Neurosci* 20:5264-5275.
- Satoh TO, Yamada M (2000) A bradycardiac agent ZD7288 blocks the hyperpolarization-activated current (I<sub>h</sub>) in retinal rod photoreceptors. *Neuropharmacology* 39:1284-1291.
- Sayer RJ, Schwandt PC, Crill WE (1990) High- and low-threshold calcium currents in neurons acutely isolated from rat sensorimotor cortex. *Neurosci Lett* 120:175-178.
- Schiller J, Helmchen F, Sakmann B (1995) Spatial profile of dendritic calcium transients evoked by action potentials in rat neocortical pyramidal neurones. *J Physiol* 487 ( Pt 3):583-600.
- Schiller J, Schiller Y, Stuart G, Sakmann B (1997) Calcium action potentials restricted to distal apical dendrites of rat neocortical pyramidal neurons. *J Physiol* 505 ( Pt 3):605-616.
- Schram G, Pourrier M, Wang Z, White M, Nattel S (2003) Barium block of Kir2 and human cardiac inward rectifier currents: evidence for subunit-heteromeric contribution to native currents. *Cardiovasc Res* 59:328-338.
- Schwandt P, O'Brien JA, Crill W (1997) Quantitative analysis of firing properties of pyramidal neurons from layer 5 of rat sensorimotor cortex. *J Neurophysiol* 77:2484-2498.
- Schwandt PC, Spain WJ, Crill WE (1988) Influence of anomalous rectifier activation on afterhyperpolarizations of neurons from cat sensorimotor cortex in vitro. *J Neurophysiol* 59:468-481.
- Seamans JK, Yang CR (2004) The principal features and mechanisms of dopamine modulation in the prefrontal cortex. *Prog Neurobiol* 74:1-58.
- Seamans JK, Gorelova N, Durstewitz D, Yang CR (2001) Bidirectional dopamine modulation of GABAergic inhibition in prefrontal cortical pyramidal neurons. *J Neurosci* 21:3628-3638.
- Shin KS, Rothberg BS, Yellen G (2001) Blocker state dependence and trapping in hyperpolarization-activated cation channels: evidence for an intracellular activation gate. *J Gen Physiol* 117:91-101.
- Sik A, Smith RL, Freund TF (2000) Distribution of chloride channel-2-immunoreactive neuronal and astrocytic processes in the hippocampus. *Neuroscience* 101:51-65.
- Simeone TA, Rho JM, Baram TZ (2005) Single channel properties of hyperpolarization-activated cation currents in acutely dissociated rat hippocampal neurons. *J Physiol*.
- Sirois JE, Pancrazio JJ, Iii CL, Bayliss DA (1998) Multiple ionic mechanisms mediate inhibition of rat motoneurons by inhalation anaesthetics. *J Physiol* 512 ( Pt 3):851-862.
- Sjostrom PJ, Turrigiano GG, Nelson SB (2003) Neocortical LTD via coincident activation of presynaptic NMDA and cannabinoid receptors. *Neuron* 39:641-654.
- Smith RL, Clayton GH, Wilcox CL, Escudero KW, Staley KJ (1995) Differential expression of an inwardly rectifying chloride conductance in rat brain neurons: a potential mechanism for cell-specific modulation of postsynaptic inhibition. *J Neurosci* 15:4057-4067.
- Solomon JS, Nerbonne JM (1993a) Two kinetically distinct components of hyperpolarization-activated current in rat superior colliculus-projecting neurons. *J Physiol* 469:291-313.

- Solomon JS, Nerbonne JM (1993b) Hyperpolarization-activated currents in isolated superior colliculus-projecting neurons from rat visual cortex. *J Physiol* 462:393-420.
- Southan AP, Morris NP, Stephens GJ, Robertson B (2000) Hyperpolarization-activated currents in presynaptic terminals of mouse cerebellar basket cells. *J Physiol* 526 Pt 1:91-97.
- Spain WJ (1994) Serotonin has different effects on two classes of Betz cells from the cat. *J Neurophysiol* 72:1925-1937.
- Spain WJ, Schwindt PC, Crill WE (1987) Anomalous rectification in neurons from cat sensorimotor cortex in vitro. *J Neurophysiol* 57:1555-1576.
- Spain WJ, Schwindt PC, Crill WE (1991) Post-inhibitory excitation and inhibition in layer V pyramidal neurones from cat sensorimotor cortex. *J Physiol* 434:609-626.
- Spruston N, Schiller Y, Stuart G, Sakmann B (1995) Activity-dependent action potential invasion and calcium influx into hippocampal CA1 dendrites. *Science* 268:297-300.
- Steriade M (2004) Neocortical cell classes are flexible entities. *Nat Rev Neurosci* 5:121-134.
- Steriade M, Timofeev I, Grenier F (2001) Natural waking and sleep states: a view from inside neocortical neurons. *J Neurophysiol* 85:1969-1985.
- Stocker M, Krause M, Perdarzani P (1999) An apamin-sensitive Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> current in hippocampal pyramidal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:4662-4667.
- Storm JF (1989) An after-hyperpolarization of medium duration in rat hippocampal pyramidal cells. *J Physiol* 409:171-190.
- Stuart G, Hausser M (1994) Initiation and spread of sodium action potentials in cerebellar Purkinje cells. *Neuron* 13:703-712.
- Stuart G, Spruston N (1998) Determinants of voltage attenuation in neocortical pyramidal neuron dendrites. *J Neurosci* 18:3501-3510.
- Stuart G, Spruston N, Sakmann B, Hausser M (1997) Action potential initiation and backpropagation in neurons of the mammalian CNS. *Trends Neurosci* 20:125-131.
- Stuart GJ, Sakmann B (1994) Active propagation of somatic action potentials into neocortical pyramidal cell dendrites. *Nature* 367:69-72.
- Stuart GJ, Hausser M (2001) Dendritic coincidence detection of EPSPs and action potentials. *Nat Neurosci* 4:63-71.
- Stuart GJ, Dodt HU, Sakmann B (1993) Patch-clamp recordings from the soma and dendrites of neurons in brain slices using infrared video microscopy. *Pflügers Arch* 423:511-518.
- Takahashi T (1990) Inward rectification in neonatal rat spinal motoneurons. *J Physiol* 423:47-62.
- Takigawa T, Alzheimer C (1999) G protein-activated inwardly rectifying K<sup>+</sup> (GIRK) currents in dendrites of rat neocortical pyramidal cells. *J Physiol* 517 ( Pt 2):385-390.
- Tanaka E, Higashi H, Nishi S (1991) Membrane properties of guinea pig cingulate cortical neurons in vitro. *J Neurophysiol* 65:808-821.
- Thomas D, Tovey S, Collins T, Bootman M, Berridge M, Lipp P (2000) A comparison of fluorescent Ca<sup>2+</sup> indicator properties and their use in measuring elementary and global Ca<sup>2+</sup> signals. *Cell Calcium* 28:213-223.
- Travagli RA, Gillis RA (1994) Hyperpolarization-activated currents, IH and IKIR, in rat dorsal motor nucleus of the vagus neurons in vitro. *J Neurophysiol* 71:1308-1317.
- Tsubokawa H (2000) Control of Na<sup>+</sup> spike backpropagation by intracellular signaling in the pyramidal neuron dendrites. *Mol Neurobiol* 22:129-141.
- Uchimura N, Cherubini E, North RA (1989) Inward rectification in rat nucleus accumbens neurons. *J Neurophysiol* 62:1280-1286.
- Ulens C, Tytgat J (2001a) Functional heteromerization of HCN1 and HCN2 pacemaker channels. *J Biol Chem* 276:6069-6072.
- Ulens C, Tytgat J (2001b) Gi- and Gs-coupled receptors up-regulate the cAMP cascade to modulate HCN2, but not HCN1 pacemaker channels. *Pflügers Arch* 442:928-942.
- Ulens C, Siegelbaum SA (2003) Regulation of hyperpolarization-activated HCN channels by cAMP through a gating switch in binding domain symmetry. *Neuron* 40:959-970.
- Uylings HBM, Groenewegen HJ, Kolb B (2003) Do rats have a prefrontal cortex? *Behavioural Brain Research* 146:3-17.



- van Welie I, Wadman WJ, van Hooft JA (2005) Low affinity block of native and cloned hyperpolarization-activated Ih channels by Ba<sup>2+</sup> ions. *Eur J Pharmacol* 507:15-20.
- Vemana S, Pandey S, Larsson HP (2004) S4 movement in a mammalian HCN channel. *J Gen Physiol* 123:21-32.
- Villalobos C, Shakkottai VG, Chandy KG, Michelhaugh SK, Andrade R (2004) SKCa channels mediate the medium but not the slow calcium-activated afterhyperpolarization in cortical neurons. *J Neurosci* 24:3537-3542.
- Wainger BJ, DeGennaro M, Santoro B, Siegelbaum SA, Tibbs GR (2001) Molecular mechanism of cAMP modulation of HCN pacemaker channels. *Nature* 411:805-810.
- Wang Z, Van Den Berg RJ, Ypey DL (1997) Hyperpolarization-activated currents in the growth cone and soma of neonatal rat dorsal root ganglion neurons in culture. *J Neurophysiol* 78:177-186.
- Waters J, Schaefer A, Sakmann B (2005) Backpropagating action potentials in neurones: measurement, mechanisms and potential functions. *Prog Biophys Mol Biol* 87:145-170.
- Williams SR, Stuart GJ (2000) Site independence of EPSP time course is mediated by dendritic I(h) in neocortical pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 83:3177-3182.
- Williams SRS, G. J. (1999) Mechanisms and consequences of action potential burst firing in rat neocortical pyramidal neurons. *Journal of Physiology* 521:467-482.
- Wollmuth LP (1995) Multiple ion binding sites in Ih channels of rod photoreceptors from tiger salamanders. *Pflugers Arch* 430:34-43.
- Womble MD, Moises HC (1993) Hyperpolarization-activated currents in neurons of the rat basolateral amygdala. *J Neurophysiol* 70:2056-2065.
- Yang CR, Seamans JK (1996) Dopamine D1 receptor actions in layers V-VI rat prefrontal cortex neurons in vitro: modulation of dendritic-somatic signal integration. *J Neurosci* 16:1922-1935.
- Yang CR, Seamans JK, Gorelova N (1996) Electrophysiological and morphological properties of layers V-VI principal pyramidal cells in rat prefrontal cortex in vitro. *J Neurosci* 16:1904-1921.
- Yang CR, Seamans JK, Gorelova N (1999) Developing a neuronal model for the pathophysiology of schizophrenia based on the nature of electrophysiological actions of dopamine in the prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology* 21:161-194.
- Yu H, Wu J, Potapova I, Wymore RT, Holmes B, Zuckerman J, Pan Z, Wang H, Shi W, Robinson RB, El-Maghrabi MR, Benjamin W, Dixon J, McKinnon D, Cohen IS, Wymore R (2001) MinK-related peptide 1: A beta subunit for the HCN ion channel subunit family enhances expression and speeds activation. *Circ Res* 88:E84-87.
- Yuste R, Denk W (1995) Dendritic spines as basic functional units of neuronal integration. *Nature* 375:682-684.
- Zhang ZW (2003) Serotonin induces tonic firing in layer V pyramidal neurons of rat prefrontal cortex during postnatal development. *J Neurosci* 23:3373-3384.
- Zidichouski JA, Jhamandas JH (1999) Characterization of a hyperpolarizing-activated current in rat lateral parabrachial neurons. *Neuroscience* 89:863-871.
- Zilberter Y (2000) Dendritic release of glutamate suppresses synaptic inhibition of pyramidal neurons in rat neocortex. *J Physiol* 528:489-496.
- Zilberter Y, Kaiser KM, Sakmann B (1999) Dendritic GABA release depresses excitatory transmission between layer 2/3 pyramidal and bitufted neurons in rat neocortex. *Neuron* 24:979-988.