UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE FÍSICA

CÉSAR AUGUSTO CELIS CEBALLOS

**Mecanismos biofísicos que afetam a resistência de
entrada e a constante de tempo da membrana de
neurônios: estudos experimentais e de simulação
computacional.**

Ribeirão Preto - SP
2017

CÉSAR AUGUSTO CELIS CEBALLOS

Mecanismos biofísicos que afetam a resistência de entrada e a constante de tempo da membrana de neurônios: estudos experimentais e de simulação computacional.

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração:

Física aplicada à Medicina e Biologia.

Orientador:

Prof. Dr. Antônio Carlos Roque da Silva Filho.

Versão original

Disponível na FFCLRP-

Ribeirão Preto - SP

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Celis Ceballos, César Augusto

Mecanismos biofísicos que afetam a resistência de entrada e a constante de tempo da membrana de neurônios: estudos experimentais e de simulação computacional. / César Augusto Celis Ceballos; orientador Prof. Dr. Antônio Carlos Roque da Silva Filho. Ribeirão Preto - SP, 2017.

133 f.:il.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-graduação em Física aplicada à Medicina e Biologia) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2017.

1. Neurônio. 2. corrente sublimiar. 3. resistência de entrada.
4. constante de tempo.

Nome: CELIS CEBALLOS, César Augusto

Título: Mecanismos biofísicos que afetam a resistência de entrada e a constante de tempo da membrana de neurônios: estudos experimentais e de simulação computacional.

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: ____/____/____.

Banca Examinadora

Prof. Dr. : _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. : _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. : _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. : _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. : _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

RESUMO

CEBALLOS, C. A. C. **Mecanismos biofísicos que afetam a resistência de entrada e a constante de tempo da membrana de neurônios: estudos experimentais e de simulação computacional.** 2017. 133 f. Tese (Doutorado - Programa de Pós-graduação em Física aplicada à Medicina e Biologia) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto - SP, 2017.

As correntes sublimiáres determinam propriedades da membrana neuronal, tais como a resistência de entrada (R_{in}) e a constante de tempo (τ_m). Nesta tese, estudamos mecanismos pelos quais duas correntes sublimiáres (corrente ativada por hiperpolarização, I_h , e corrente de sódio persistente, I_{NaP}) determinam R_{in} e τ_m em dois tipos de neurônio: neurônio fusiforme do núcleo coclear dorsal e célula piramidal da região CA1 do hipocampo. A tese está dividida em três partes: a primeira estuda como a I_h atua concomitantemente com a corrente de potássio retificadora de entrada (I_{KIR}) para manter R_{in} estacionária entre neurônios fusiformes com heterogeneidade de disparo (silenciosos, sem disparos espontâneos, e ativos, com disparos espontâneos regulares). Na segunda parte, usa-se uma combinação de modelagem computacional com a técnica experimental de *dynamic-clamp* em neurônios piramidais de fatias hipocámpais para mostrar que a criação de uma região de inclinação negativa na curva I/V (condutância de inclinação negativa) pela ativação rápida da I_{NaP} é responsável pelo aumento de R_{in} e τ_m e pela amplificação e prolongamento dos potenciais pós-sinápticos das células. Finalmente, a terceira parte estabelece o mecanismo pelo qual a I_{NaP} e I_h controlam a τ_m da célula. Para isso, propomos um novo conceito denominado “condutância de inclinação dinâmica” que leva em consideração a cinética das correntes e explica os efeitos observados das cinéticas de

I_{NaP} e I_h sobre τ_m . Com base nos resultados, prevemos que uma I_h com cinética rápida atenua e encurta os potenciais pós-sinápticos excitatórios muito mais que uma I_h com cinética lenta.

Palavras-chave: 1. Neurônio. 2. corrente sublimiar. 3. resistência de entrada. 4. constante de tempo.

ABSTRACT

CEBALLOS, C. A. C. **Biophysical mechanisms that affect the membrane input resistance and time constant of neurons: experimental and computational studies..** 2017. 133 f. Thesis (Ph.D. - Postgraduate program in Physics applied to Medicine and Biology) - Faculty of Philosophy, Sciences and Literature, University of São Paulo, Ribeirão Preto - SP, 2017.

Subthreshold currents determine the neuronal membrane properties, such as the input resistance (R_{in}) and the membrane time constant (τ_m). In this thesis, we studied the mechanisms by which two subthreshold currents (the hyperpolarization-activated current, I_h , and the persistent sodium current, I_{NaP}) determine R_{in} and τ_m in two types of neurons: the fusiform neuron of the dorsal cochlear nucleus and the pyramidal cell of the CA1 region of the hippocampus. The thesis is divided in three parts: the first part studies how I_h acts concomitantly with the inwardly rectifying potassium current (I_{KIR}) to equalize R_{in} among fusiform neurons with firing heterogeneity (quiet, without spontaneous firing and active, with regular spontaneous firing). In the second part, we used a combination of computational modeling with the experimental technique dynamic clamp in pyramidal cells of hippocampal slices to show that the creation of a negative slope region in the I/V curve (negative slope conductance) by the fast activation of the I_{NaP} is responsible for the increase of R_{in} and τ_m , and for the amplification and prolongation of postsynaptic potentials in these cells. Finally, the third part establishes the mechanism whereby I_{NaP} and I_h control τ_m in the cell. For this, we propose a new concept called “dynamic slope conductance”, which takes into consideration the current kinetics and explains the observed effects of I_h and I_{NaP} kinetics on τ_m . Based on the results, we predict that an I_h current with fast

kinetics attenuates and shortens excitatory postsynaptic potentials strongly than an I_h current with slower kinetics.

Key-words: 1. Neuron. 2. Subthreshold current. 3. Input resistance. 4. Time constant.

LISTA DE FIGURAS

1.1	Resistência de entrada e constante de tempo da membrana. A. O carregamento da capacitância segue uma função exponencial e a magnitude da mudança do potencial é determinada pela resistência de entrada. B. A injeção de várias correntes despolarizantes e hiperpolarizantes muda o potencial de membrana. C. Curva V-I da parte B. A inclinação da linha reta determinado por uma regressão linear corresponde à resistência de entrada.	6
1.2	A. Corte coronal do núcleo coclear dorsal com a sua localização. B. Célula fusiforme e a sua localização na camada fusiforme. C. Perfil eletrofisiológico característico da célula fusiforme. Figura modificada de [Paxinos e Watson 2007].	7
1.3	A. Corte coronal do hipocampo dorsal com a sua localização. B. Célula piramidal da região CA1 e sua localização na camada piramidal. C. Perfil eletrofisiológico de uma célula piramidal do CA1. Figura modificada de [Paxinos e Watson 2007].	10
1.4	Curva IV da I_{NaP} e de uma corrente de vazamento, mostrando a região da condutância de inclinação negativa. B. Feedback positivo entre a despolarização e a variável de ativação que aumenta regenerativamente as correntes de entrada e cria uma região de condutância de inclinação negativa.	14
1.5	Circuito elétrico equivalente de uma porção de membrana. Contém a capacitância de membrana em paralelo com os canais iônicos (correntes resistivas) e correntes injetadas por eletrodos. Modificado de [Sterratt et al. 2011].	20

3.1	A. Curvas V-I. Tamanho da barra: 200 ms horizontal, 5 mV vertical. B. Rampa no modo de current-clamp antes (cinza) e depois (preto) da aplicação de TTX, mostrando que 100 nM bloqueia o disparo. Tamanho da barra: 1 s horizontal, 25 mV vertical. C. Registros no modo de voltage-clamp antes (cinza) e depois (preto) da aplicação de TTX. Tamanho da barra: 1 s horizontal, 200 pA vertical. D. Subtração das curvas em C, o que corresponde a I_{NaP} . Tamanho da barra: 1 s horizontal, 100 pA vertical.	27
3.2	Circuito elétrico do modelo computacional da célula fusiforme. g são as condutâncias e E os potenciais de reversão. A seta indica condutâncias variáveis dependentes da voltagem. C é a capacitância da membrana.	29
3.3	Esquema básico do sistema de dynamic-clamp.	36
3.4	Perfil eletrofisiológico de neurônios fusiformes ativo e silencioso. Note o disparo regular e a presença de sag característico desse tipo de neurônio. Também observe o afterhyperpolarization depois do disparo.	37
3.5	A. Curvas VI representativas experimentais de registros obtidos de PYR. B. Curvas VI representativas de simulações. Note que no final dos registros foi injetada um aEPSC (parte superior) ou uma corrente despolarizante (parte inferior).	38
3.6	Curvas VI representativas obtidas de simulações de modelos de neurônio com uma corrente de vazamento e uma I_{NaP} (A) ou I_h (B e C). Note que no final dos registros foi injetada uma corrente despolarizante (A e B) ou um aEPSC (C).	40

- 4.1 A resistência de entrada da membrana é similar entre neurônios fusiformes silenciosos e ativos. **A.** Exemplo de uma resposta de um neurônio fusiforme a hiperpolarizações. A seta grossa assinala o ponto onde foi medido o potencial de membrana usado para calcular a resistência de entrada da membrana. As setas finas mostram os potenciais de membrana no estado estacionário usados para calcular o sag. **B.** Gráfico mostrando a resposta do potencial da membrana no estado estacionário quando uma corrente negativa DC foi injetada nos neurônios fusiformes silenciosos (n=16) e ativos (n=14). **C.** Valores das resistências de entrada da membrana obtidos pela regressão linear dos dados em B. **D.** Gráfico mostrando a dependência da amplitude do sag com a corrente injetada (n=15 cada um). 42
- 4.2 I_h em neurônios fusiformes do NCD. **A.** Exemplo das correntes ativadas pela hiperpolarização da membrana. A I_h foi estimada como a diferença entre o início e o estado estacionário da corrente. **B.** Relação corrente-voltagem da I_h em neurônios fusiformes silenciosos e ativos. **C.** Valores das condutâncias de inclinação da I_h em neurônios fusiformes silenciosos e ativos. * $p < 0,05$. **D.** Correlação da resistência de entrada da membrana com a g_h dos neurônios silenciosos e ativos. 44
- 4.3 A injeção de uma g_h artificial afeta diferentemente a resistência de entrada da membrana de neurônios fusiformes silenciosos e ativos do NCD. **A.** Exemplo do efeito da injeção de uma g_h artificial de 5 nS na resposta de uma corrente hiperpolarizante. **B.** Efeito da injeção de uma g_h artificial de 5 nS na resistência de entrada da membrana de neurônios ativos. * $p < 0,05$. **C.** Efeito da injeção de uma g_h artificial de 5 nS na resistência de entrada da membrana de neurônios silenciosos. **D.** Efeito da injeção de uma g_h artificial de 5 nS na resistência de entrada imediata da membrana de neurônios fusiformes ativos e silenciosos. **E.** Efeito da injeção de uma g_h artificial de valores crescentes na resistência de entrada da membrana normalizada de neurônios ativos e silenciosos (n=7 cada um). 46

- 4.4 A I_{KIR} afeta o PMR mais do que a I_h em um modelo de neurônio fusiforme. A. Exemplo da resposta do modelo de neurônio à despolarização e hiperpolarização. B. Diagrama de condutâncias da g_h versus g_{KIR} afetando o PMR (codificado por cores). C. g_{leak} versus g_h . D. g_{KIR} versus g_{leak} . A linha azul representa a transição do estado silencioso (acima) para o estado ativo (abaixo). 47
- 4.5 Espaço de parâmetros da condutância de vazamento versus o seu potencial de reversão afetando o PMR (codificado por cores), usando valores de g_{KIR} típicos de um neurônio ativo (esquerda) e silencioso (direita). A linha azul representa a transição dos modos de disparo de silencioso (abaixo) para ativo (acima). 48
- 4.6 Influência da g_{KIR} no impacto da g_h na resistência de entrada da membrana em respostas a hiperpolarizações. A. Exemplo da resposta dos modelos de neurônios fusiforme silencioso e ativo a hiperpolarizações sucessivas. B. Diagrama de condutâncias da g_h versus g_{KIR} afetando a resistência de entrada da membrana (codificado por cores). C. Dois exemplos mostrando o efeito do aumento da g_h na resistência de entrada da membrana em dois modelos: um com valor de g_{KIR} típico de neurônios silenciosos (vermelho) e outro com valor de g_{KIR} típico de neurônios ativos (azul). D. Diagrama de condutâncias da g_h versus g_{KIR} afetando o sag (codificado por cores). E. Dois exemplos mostrando o efeito do aumento da g_h no sag em dois modelos: um com valor de g_{KIR} típico de neurônios silenciosos (vermelho) e outro com valor de g_{KIR} típico de neurônios ativos (azul). 49

- 4.7 Simulações computacionais da dependência da voltagem da R_{in} e τ_m . A. Aproximação de uma curva I-V da I_{NaP} (preto) usando uma condutância negativa e linear (cinza) na região limitada pelas linhas tracejadas. B. Dependência da voltagem das mudanças do potencial de membrana em resposta a correntes de 10 pA. C. Dependência da voltagem do tempo de subida das respostas em B. As amplitudes estão normalizadas pela máxima resposta. D. Dependência da voltagem da R_{in} . E. Dependência da voltagem da τ_m . F. Coeficiente de correlação de Pearson de τ_m e R_{in} . $R^2 = 1$ 52
- 4.8 A. Exemplos representativos de EPSPs obtidos de simulações computacionais para I_{NaP} com ativação rápida ($\tau_{NaP} = 0,1$ ms) e com ativação lenta ($\tau_{NaP} = 100$ ms). $V = -67$ mV. aEPSC foi desenhado abaixo do traçado. B. Amplitude dos EPSPs para um modelo contendo somente uma corrente linear (sem I_{NaP}) ou um modelo contendo uma corrente linear junto com uma I_{NaP} de ativação rápida ($\tau_{NaP} = 0,1$ ms) para diferentes potenciais de membrana. C. Igual que em B, exceto que o modelo usado tinha I_{NaP} de ativação lenta ($\tau_{NaP} = 100$ ms). Inset. Zoom do gráfico. Tamanho da barra: vertical 0,005 mV, horizontal 5 mV. D. Área normalizada pela amplitude dos EPSPs para um modelo contendo somente uma corrente linear (sem I_{NaP}) ou um modelo contendo uma corrente linear junto com uma I_{NaP} de ativação rápida ou lenta ($\tau_{NaP} = 0,1$ ou 100 ms, respectivamente). 53
- 4.9 A. Curva I-V média da I_{NaP} ($n = 10$) obtida pela subtração das correntes geradas por um comando de rampa lento com aCSF controle (preto) e durante a perfusão com TTX (100 nM) (cinza). Inset. Traçados representativos de correntes. Tamanho da barra: vertical 200 pA, horizontal 1 s. B. Condutância de inclinação da I_{NaP} (G_{NaP}) obtida das curvas I-V em A ($n = 9$). C. Condutância de corda da I_{NaP} (g_{NaP}) ($n = 10$). D. Condutância diferencial da I_{NaP} (G_{NaP}^{Der}) obtida da subtração de g_{NaP} da G_{NaP} ($n = 9$). E. Valores absolutos de G_{NaP} , g_{NaP} e G_{NaP}^{Der} 55

- 4.10 A. Dependência da voltagem da R_{in} antes (Ctrl) e depois da aplicação de TTX e durante a aplicação de uma aI_{NaP} na presença de TTX ($n = 6$). B. Curvas I-V da ag_{NaP} , aG_{NaP} e aI_{NaP} (esquerda). Gráfico expandido focando na região do potencial de membrana na qual a aG_{NaP} foi aplicada ($-80 \text{ mV} < V_m < -70 \text{ mV}$) (direita). Note-se que todas as três correntes são despolarizantes. C. Dependência da voltagem da R_{in} na presença de TTX, antes (TTX) e depois da aplicação da aG_{NaP} ($n = 9$). D. Dependência da voltagem da R_{in} na presença de TTX, antes (TTX) e depois de aplicação da ag_{NaP} ($n = 8$). 57
- 4.11 A. Parte superior, respostas de voltagem do mesmo neurônio a uma corrente injetada antes (controle) e depois da aplicação de TTX. Parte inferior, os mesmos traçados normalizados. A corrente injetada foi 20 pA. B. Dependência da voltagem da τ_m antes (controle) e depois de TTX ($n = 11$). C. Dependência da voltagem da τ_m na presença de TTX, antes (TTX) e depois da aplicação da aG_{NaP} . ($n = 10$). D. Dependência da voltagem da τ_m na presença de TTX, antes (TTX) e depois da aplicação da ag_{NaP} . ($n = 11$). E. Gráfico de dispersão entre a R_{in} vs τ_m para o grupo controle para todos os potenciais de membrana. A linha reta é o ajuste da regressão linear. 58

- 4.12 A. Área normalizada pela amplitude dos aEPSPs para registros controle (Ctrl) e na presença de TTX. B. Média dos aEPSPs normalizados de todas as células testadas no caso controle em -70 mV e -80 mV, depois de TTX ($V = -70$ mV) e com TTX e aG_{NaP} ($V = -70$ mV). O aEPSC foi desenhado abaixo dos traçados. C. Área normalizada dos aEPSP na presença de TTX, antes (TTX) e depois da aplicação da aG_{NaP} . D. Média dos aEPSPs normalizados de todas as células testadas no caso controle, TTX, e com TTX e uma aI_{NaP} com constante de tempo de ativação/desativação rápida e lenta ($\tau_{NaP} = 0.1$ ou 100 ms, respectivamente) (todos registrados em $V = -70$ mV). O aEPSC foi desenhado abaixo dos traçados. A fase de decaimento inicial rápida dos aEPSPs é principalmente causada pela queda da voltagem devido à resistência em serie. 60
- 4.13 A. Curva I-V teórica da I_{NaP} . B. Condutância de inclinação da I_{NaP} (G_{NaP}) obtida de duas maneiras diferentes: Primeiro, pela relação da IV (dI/dV) (G_{NaP} sim) e segundo, usando as equações 3.9 e 3.10 (G_{NaP} teor). O gráfico também mostra a condutância de corda g_{NaP} e a condutância diferencial G_{NaP}^{Der} . C. G_{NaP} , g_{NaP} e G_{NaP}^{Der} na região sublimiar. $E_{Na} = 70$ mV e $\bar{g}_{NaP} = 1$ nS. D. Curva I-V teórica da I_h . E. e F. são igual que em B. e C. porém para a I_h . $E_h = -30$ mV e $\bar{g}_h = 1$ nS. 62
- 4.14 Simulações computacionais da τ_m dependente de voltagem para um modelo de neurônio com somente uma corrente de vazamento e uma I_{NaP} . A. A mudança do potencial de membrana é dependente de voltagem. B. A evolução temporal na subida da voltagem também é dependente da voltagem. As curvas foram obtidas normalizando os traçados de A. C. Valores da τ_m dependente de voltagem medidas de simulações (τ_m sim) e comparadas com valores obtidas das relações matemáticas $\tau_m = R_{in}C$ (τ_m clássica) e da $\tau_m = C/(g_L + G_{NaP}(V_m))$ (τ_m G_{dyn}). 67

- 4.15 Simulações computacionais de um modelo de neurônio com uma corrente de vazamento e uma I_h . A. Dependência da voltagem da τ_m com $\tau_h = 20, 100$ e 1000 ms. A τ_m medida de simulações é indicada por simbolos vazios (triângulo, diamante e círculo), a τ_m calculada assumindo a relação $\tau_m = R_{in}C$ (τ_m clássico) e $\tau_m = C/(g_L + g_h)$ (τ_m corda) é indicada por cruzeiros e quadrados, respectivamente. Finalmente, a τ_m calculada assumindo a relação $\tau_m = C/G_{dyn}$ (τ_m G_{dyn}) é indicada por simbolos preenchidos (triângulo, diamante e círculo). B. Assumindo a relação $\tau_m = C/(g_L + g_h + X(V))$, a $X(V)$ foi isolada e seus valores foram obtidos. C. Valores da $G^{der}(V)$. D. Assumindo a relação $X(V) = Y(V)G_h^{der}(V)$, a $Y(V)$ foi isolada e seus valores foram obtidos. E. Valores do fator α obtidos da média dos valores de $Y(V)$ 68
- 4.16 Simulações computacionais de um modelo de neurônio com somente uma corrente de vazamento e uma I_h com τ_h de 20, 100 e 1000 ms. A. Valores da τ_m dependente de voltagem com $g_L = 3$ nS. B. Valores da τ_m dependente de voltagem com $g_L = 30$ nS. A τ_m medida das simulações é indicada por simbolos vazios (triângulo, diamante e círculo). A τ_m calculada da relação $\tau_m = C/G_{dyn}$ (τ_m G_{dyn}) é indicada por simbolos preenchidos (triângulo, diamante e círculo). C. Fator α obtido das simulações com $\bar{g}_h = 10$ nS e g_L com valores 3, 10 e 30 nS. D. Fator α obtido das simulações com $g_L = \bar{g}_h = 10$ ou 20 nS e com valores de $\tau_L = 30, 7,5$ e 15 mS. E. Fator α obtido das simulações com $g_L = \bar{g}_h = 3, 10$ ou 30 nS e com valores da razão $g_L/\bar{g}_h$ 1 e 3. . . 70

- 4.17 Simulações computacionais de um modelo de neurônio com uma corrente de vazamento e uma I_h com τ_h 20, 100 e 1000 ms. A τ_m medida de simulações é indicada por símbolos vazios (triângulo, diamante e círculo). A τ_m calculada pela relação $\tau_m = C/(g_L + g_h + \alpha G_h^{der})$ (τ_m G_{dyn}) é indicada por símbolos preenchidos (triângulo, diamante e círculo), onde o fator α foi determinado usando $\alpha = 1 - e^{-\tau_L/\tau_h}$. A. A τ_m dependente de voltagem de simulações onde $\tau_L = 45$ ms. B. Igual a A, mas com $\tau_L = 15$ ms. C. Igual a A, mas com $\tau_L = 5$ ms. 74
- 4.18 Simulações computacionais das condutâncias de inclinação dinâmica da I_h e I_{NaP} para diferentes razões de τ_L/τ_{act} de 0,1, 0,5, 1, 2 e 5. . . 75
- 4.19 A. Traçados representativos de EPSPs para os potenciais de membrana -60 e -80 mV e para τ_h rápida e lenta. B. Amplitude dos EPSPs obtidos de simulações computacionais para uma I_h de ativação rápida ($\tau_h = 10$ ms) e ativação lenta ($\tau_h = 500$ ms) para diferentes potenciais de membrana. C. Área de EPSPs e D. Área normalizada pela amplitude de EPSPs. 76

LISTA DE TABELAS

3.1	Propriedades passivas e dimensões do modelo computacional da FUS	28
3.2	Variável de ativação/inativação dependente do potencial de membrana das correntes iônicas	30
3.3	Densidade de condutância máxima (g_X), potencial de reversão das correntes iônicas (E_{rev}), constante de tempo de ativação (τ_{at}) e de inativação (τ_{inat}).	30
3.4	Propriedades passivas e dimensões do modelo computacional da célula piramidal CA1	32
3.5	Densidade de condutância máxima (g_X) e potencial de reversão das correntes iônicas (E_{rev}).	33
3.6	Densidade de condutância máxima (g_X) e potencial de reversão das correntes iônicas (E_{rev}).	33
4.1	Constantes de tempo de ativação τ_{at} e desativação τ_{des} da I_h de neurônios silenciosos e ativos. * $p < 0.05$, teste t não pareado (comparado com os neurônios ativos).	43
4.2	Sinal da G^{Der} para a I_{NaP} e I_h	61
4.3	Combinações de g_L , C e τ_L usadas com o intuito de estabelecer por intermédio de qual desses parâmetros (i.e., g_L e/ou τ_L) a condutância de vazamento é capaz de influenciar o fator α	71

LISTA DE ABREVIATURAS

R_{in}	Resistência de entrada da membrana (<i>membrane input resistance</i>).
τ_m	Constante de tempo da membrana (<i>membrane time constant</i>).
NCD	Núcleo coclear dorsal (<i>dorsal cochlear nucleus</i>).
CA1	Região CA1 do hipocampo (<i>Hippocampus CA1 region</i>).
FUS	Neurônio fusiforme do núcleo coclear dorsal (<i>Fusiform neuron from dorsal cochlear nucleus</i>).
PYR	Neurônio piramidal da região CA1 do hipocampo (<i>Pyramidal neuron from hippocampus CA1 region</i>).
EPSC	Corrente pós-sináptica excitatória (<i>excitatory postsynaptic current</i>).
EPSP	Potencial pós-sináptico excitatório (<i>excitatory postsynaptic potential</i>).
IPSP	Potencial pós-sináptico inibitório (<i>inhibitory postsynaptic potential</i>).
aEPSC	Corrente pós-sináptica excitatória artificial (<i>artificial excitatory postsynaptic current</i>).
aEPSP	Potencial pós-sináptico excitatório artificial (<i>artificial excitatory postsynaptic potential</i>).
aCSF	Líquido cefalorraquidiano artificial (<i>artificial cerebrospinal fluid</i>).
PMR	Potencial de membrana em repouso (<i>resting membrane potential</i>).
PA	Potencial de ação (<i>action potential</i>).

TTX Tetrodotoxina (*tetrodotoxin*).

LISTA DE SÍMBOLOS

I_{NaP}	Corrente de sódio persistente.
I_h	Corrente catiônica ativada por hiperpolarização.
I_{Leak}	Corrente de vazamento.
I_{KIR}	Corrente de potássio retificadora de entrada.
G_X	Condutância de inclinação da corrente X.
g_X	Condutância de corda da corrente X.
G_{Der}^X	Condutância diferencial da corrente X.
G_{Dyn}^X	Condutância de inclinação dinâmica da corrente X.

SUMÁRIO

Lista de Figuras	ix
Lista de Tabelas	xviii
Lista de Abreviaturas	xix
Lista de Símbolos	xxi
1 Introdução	1
1.1 Correntes iônicas sublimiáres dependentes de voltagem	2
1.1.1 Corrente persistente de sódio (I_{NaP})	2
1.1.2 Corrente catiônica ativada pela hiperpolarização (I_h)	3
1.1.3 Corrente de potássio retificadora de entrada (I_{KIR})	4
1.1.4 Variabilidade na expressão dos canais iônicos	4
1.1.5 Propriedades sublimiáres	5
1.2 Núcleo Coclear Dorsal	6
1.3 Células fusiformes	7
1.4 Hipocampo	10
1.5 Células piramidais do CA1	10
1.6 Condutâncias negativas	13
1.6.1 Condutância negativa e propriedades sublimiáres	17
1.6.2 A condutância negativa amplifica os potenciais pós-sinápticos	19
1.7 Formalismo de <i>Hodgkin e Huxley</i>	20
2 Objetivos	22

3	Métodos	24
3.1	Preparo de fatias de tronco cerebral e registro eletrofisiológico	24
3.2	Preparo de fatias de hipocampo e registro eletrofisiológico	25
3.3	Modelo computacional da célula fusiforme	28
3.4	Modelo computacional da célula piramidal do CA1	31
3.5	Condutância/Resistência de corda e de inclinação	34
3.6	Dynamic-clamp	34
3.7	Análise de dados	36
3.7.1	Experimentos com as células fusiformes	36
3.7.2	Experimentos com as células piramidais do hipocampo	37
3.7.3	Simulações do estudo da influência da cinética na constante de tempo da membrana	38
3.8	Estatística	39
4	Resultados	41
4.1	A corrente I_h contrabalança a resistência de entrada	41
4.1.1	Neurônios ativos e silenciosos têm resistências de entrada similares	41
4.1.2	Neurônios ativos expressam uma I_h maior	41
4.1.3	Neurônios ativos são mais sensíveis a mudanças da g_h	43
4.1.4	Modelo computacional, potencial de membrana de repouso e resistência de entrada	45
4.2	A condutância negativa prolonga as depolarizações sublimiares	50
4.2.1	Condutância de inclinação G_{NaP}	50
4.2.2	G_{NaP} aumenta a constante de tempo da membrana	50
4.2.3	Uma I_{NaP} rápida é necessária para amplificar o EPSP	51
4.2.4	A componente diferencial da G_{NaP} é a componente predominante	53
4.2.5	A G_{NaP} é suficiente para aumentar a R_{in}	54
4.2.6	Constante de tempo da membrana	56
4.2.7	A G_{NaP} amplifica os EPSPs	58
4.3	A cinética das correntes influencia a constante de tempo da membrana	59
4.3.1	Condutância diferencial G^{Der}	61

4.3.2	Constante de tempo da membrana e correntes rápidas e lentas	64
4.3.3	Condutância de inclinação dinâmica: um novo conceito	65
4.3.4	A I_{NaP} pode ser tratada como uma corrente muito rápida . .	66
4.3.5	A I_h e a condutância de inclinação dinâmica	67
4.3.6	Fator α e constante de tempo de vazamento da membrana . .	69
4.3.7	Aproximação matemática do fator α	72
4.3.8	Condutância de inclinação dinâmica da I_{NaP} e da I_h	74
4.3.9	A cinética da I_h influencia na atenuação dos EPSPs	74
5	Discussão	77
5.1	A corrente h contrabalança a resistência de entrada	77
5.2	A condutância negativa prolonga as depolarizações sublimiares	81
5.3	A cinética das correntes influencia a constante de tempo da membrana	86
	Referências	91

INTRODUÇÃO

A atividade de uma rede neuronal não é simplesmente determinada pelas interações excitatórias e inibitórias entre os neurônios, também depende fortemente das propriedades elétricas intrínsecas dos neurônios. Cada neurônio responde de forma diferente quando uma corrente despolarizante ou hiperpolarizante é injetada nele, ou usando o jargão da eletrofisiologia, cada neurônio tem um padrão de disparo característico. Esse padrão é determinado pela interação de correntes iônicas transmembrana, que determinam tanto as propriedades ativas (e.g. potencial de ação) quanto as propriedades passivas (e.g. resistência de entrada) [Hammond 2014].

Existe um amplo repertório de canais iônicos expressos em neurônios do sistema nervoso central que podem ser categorizados em relação ao tipo de íon ao qual é permeável, da droga ou toxina que o bloqueia e da cinética (*gating*) do canal. Os principais tipos de canais iônicos podem ser classificados quanto a sua permeabilidade iônica como canais seletivos a: sódio, potássio, cálcio e cloreto, ou a cátions ou ânions. Os estados de abertura e fechamento dos canais iônicos apresentam características diversas. Dessa forma, alguns canais mudam a sua probabilidade de abertura e fechamento de acordo com o potencial de membrana e são chamados de canais dependentes de voltagem. Dependendo do potencial de membrana no qual o canal é ativado (i.e. quando ele abre e permite a condução de correntes iônicas transmembrana), canais iônicos são classificados como canais com correntes sublimiares ou supralimiais. As correntes supralimiais são aquelas ativadas acima do limiar de disparo do potencial de ação (PA) do neurônio,

geralmente próximo de -50 mV, enquanto as sublimiáres são aquelas ativadas abaixo do limiar de disparo do PA. Também existem canais não dependentes de voltagem, ou seja, em que a sua probabilidade de abertura e fechamento não depende do potencial de membrana e alguns deles são conhecidos como canais com correntes de vazamento [Enyedi e Czirjak 2010].

Tanto as correntes sublimiáres dependentes de voltagem quanto as correntes de vazamento desempenham um papel importante na determinação das propriedades integrativas dos sinais sinápticos. Dois parâmetros que permitem a caracterização das propriedades sublimiáres de um neurônio são a resistência de entrada (R_{in}) e a constante de tempo da membrana (τ_m). De acordo com a teoria do cabo passivo [Koch 1998], a R_{in} está relacionada com a magnitude da mudança do potencial de membrana quando uma corrente é aplicada no neurônio e segue a lei de Ohm: $\Delta V = R_{in}\Delta I$, enquanto a τ_m está relacionada com a dinâmica temporal da carga do capacitor da membrana e segue a seguinte relação matemática: $\tau_m = R_{in}C$, onde C é a capacitância de membrana do neurônio.

1.1 Correntes iônicas sublimiáres dependentes de voltagem

Existem dois tipos de correntes sublimiáres dependentes de voltagem: aquelas que despolarizam e aquelas que hiperpolarizam a membrana. Dois tipos de correntes sublimiáres despolarizantes são: corrente persistente de sódio (I_{NaP}) e a corrente catiônica ativada por hiperpolarização (I_h). Um tipo de corrente hiperpolarizante é a corrente de potássio retificadora de entrada (I_{KIR}).

1.1.1 Corrente persistente de sódio (I_{NaP})

A I_{NaP} é uma corrente sublimiar dependente de voltagem e não inativante, a qual é expressa em vários tipos de neurônios [Crill 1996, French et al. 1990, DelNegro et al. 2002, Leao et al. 2005, Leao et al. 2012, Magistretti, Ragsdale e Alonso 1999, Stafstrom et al. 1985, Raman, Gustafson e Padgett 2000, Pennartz, Bierlaagh e Geurtsen 1997]. A I_{NaP} é ativada e desativada rapidamente ($\tau < 250\mu s$), porém tem uma inativação muito lenta, mantendo ativa por centenas de milisegundos

[French et al. 1990, Carter et al. 2012]. A I_{NaP} é gerada pelas mesmas subunidades de tipo Na_V que produzem a corrente de sódio transiente, e depende da interação das subunidades $Na_V \alpha$ com as subunidades β [Aman et al. 2009, Qu et al. 2001]. A I_{NaP} é bloqueada total e reversivelmente por tetrodotoxina (TTX). A I_{NaP} afeta substancialmente a excitabilidade neuronal amplificando as despolarizações próximas do limiar de disparo produzindo disparo espontâneo [Leao et al. 2012, Raman, Gustafson e Padgett 2000, Pennartz, Bierlaagh e Geurtsen 1997], e as mutações das subunidades Na_V que aumentam a expressão da I_{NaP} estão relacionadas com as epilepsias [Stafstrom 2007].

Tal como a dependência da voltagem da corrente de sódio transiente dependente de voltagem, a I_{NaP} tem uma relação I-V não monotônica originada da interação entre a dependência da voltagem da ativação do canal e do potencial de reversão da corrente de Na^+ , porém com uma curva de ativação deslocada na direção de hiperpolarização [Izhikevich 2007, Ghigliazza e Holmes 2004]. Por causa disso, a relação I-V da I_{NaP} apresenta uma condutância de inclinação negativa (dI/dV) durante a fase de ativação da curva [Yamada-Hanff e Bean 2015, Izhikevich 2007, Ghigliazza e Holmes 2004, Stafstrom, Schwindt e Crill 1982]. Apesar do aumento da condutância do canal, a I_{NaP} aumenta R_{in} e τ_m na região da condutância de inclinação negativa [Fernandez, Malerba e White 2015, Yamada-Hanff e Bean 2015, Wilson 2005, Yamada-Hanff e Bean 2013, Economo, Martinez e White 2014, Jacobson et al. 2005, Yaron-Jakubovitch et al. 2008, Buchanan et al. 1992, Waters e Helmchen 2006], porém a relação causal da condutância negativa com esses efeitos ainda não foi determinada.

1.1.2 Corrente catiônica ativada pela hiperpolarização (I_h)

A I_h é uma corrente gerada pelos íons Na^+ e K^+ e é dependente da voltagem e do tempo. Essa corrente é ativada pela hiperpolarização, tem uma ativação lenta e é desativada em potenciais despolarizados tais como aqueles atingidos durante o disparo do potencial de ação. A I_h é bloqueada pela droga ZD7288 na concentração de 20 μm [Yamada-Hanff e Bean 2015]. A I_h é mediada pelos canais HCN que são formados por 4 subunidades (conhecidas como HCN1, HCN2, HCN3 e HCN4) cada uma dotando o canal com diferente cinética [Dougherty et al. 2013]. A constante de

tempo de ativação da I_h abrange uma faixa de valores desde dezenas de milisegundos até alguns segundos [Dougherty et al. 2013, Ceballos et al. 2016].

Várias funções da I_h têm sido estabelecidas e hipotetizadas. A I_h favorece o disparo espontâneo mantendo o potencial de membrana despolarizado o suficiente para permitir a ativação de outros canais despolarizantes, e.g. I_{NaP} [Paál et al. 2003, Rodrigues e Oertel 2006]. Além disso, a ativação da I_h reduz a R_{in} do neurônio [Rusznák et al. 2013, Rodrigues e Oertel 2006].

Curiosamente, os neurônios do tronco auditivo apresentam altos níveis de I_h [Banks, Pearce e Smith 1993, Bal e Oertel 2000, Cuttle et al. 2001, Koch e Grothe 2003, Leao et al. 2006]. Nesses neurônios, a I_h tem uma função que parece ser importante para o processamento de informação auditiva: a diminuição da τ_m devido à redução da R_{in} , o que garante uma rápida resposta aos estímulos entrantes e ajuda a manter a fidelidade temporal [Koch e Grothe 2003, Leao et al. 2006, Golding, Ferragamo e Oertel 1999, Yamada et al. 2005]. Igualmente, a redução da R_{in} e da τ_m devido à I_h tem sido observada em neurônios corticais [Magee 1998, Yamada-Hanff e Bean 2015]

1.1.3 Corrente de potássio retificadora de entrada (I_{KIR})

A I_{KIR} é uma corrente de potássio sensível a concentrações micromolares de $BaCl_2$ com uma relação corrente-voltagem (I/V) que mostra retificação de entrada (em potenciais mais hiperpolarizados que o potencial de reversão do potássio em torno de -90 mV). Ou seja, os canais retificadores de entrada conduzem mais eficientemente quando o potencial de membrana é mais negativo que o potencial de reversão do íon potássio. A I_{KIR} é ativada em potenciais próximos do potencial de membrana de repouso (PMR) e por isso ajuda a mantê-lo próximo do potencial de reversão do potássio [Hibino et al. 2010, Leao et al. 2012].

1.1.4 Variabilidade na expressão dos canais iônicos

Evidências experimentais e teóricas sugerem que a expressão dos níveis de diferentes canais iônicos e condutâncias varia entre neurônios que fazem parte de uma mesma população neuronal [Marder e Goaillard 2006], mostrando que propriedades de disparo similares podem ser obtidas através de diferentes combinações de

densidades de canais iônicos. Por outro lado, correlações específicas e coordenadas na expressão dos canais iônicos mantêm constante o comportamento neuronal elétrico [Goldman et al. 2001, Schulz, Goaillard e Marder 2006, Schulz, Goaillard e Marder 2007, Sobie 2009, Taylor, Goaillard e Marder 2009, Ransdell, Nair e Schulz 2013, Khurana et al. 2011], sugerindo que mecanismos compensatórios agem mantendo estáveis as propriedades fisiológicas dos neurônios [O’Leary et al. 2013]. Adicionalmente, o papel de uma condutância específica na excitabilidade da membrana e nas propriedades sublimiáres depende da dinâmica das outras condutâncias também expressas no neurônio [Day et al. 2005, Ma e Koester 1996, Marder, O’Leary e Shruti 2014]. Portanto, a modulação de uma condutância específica pode ter um grande impacto nas propriedades de membrana dos neurônios dependendo do ambiente de canais iônicos neles expresso [Marder, O’Leary e Shruti 2014].

1.1.5 Propriedades sublimiáres

Em uma membrana puramente passiva, a condutância de vazamento determina a R_{in} e a τ_m (Fig. 1.1) de modo que o aumento da condutância de vazamento diminui R_{in} e τ_m [Enyedi e Czirjak 2010, Dagostin et al. 2015, Koch 1998, Zhou et al. 2009]. Porém, os neurônios expressam correntes dependentes de voltagem que são ativadas em potenciais de membrana sublimiáres que também influenciam a R_{in} e τ_m , de modo que o comportamento dos neurônios nunca é puramente passivo e, conseqüentemente, R_{in} e τ_m se tornam dependentes de voltagem [Fernandez, Malerba e White 2015, Klink e Alonso 1997, Nisenbaum e Wilson 1995, Surges, Freiman e Feuerstein 2004, Yamada-Hanff e Bean 2015]. Sendo assim, a teoria do cabo passivo é insuficiente para explicar as propriedades de membrana sublimiáres do neurônio. As correntes dependentes de voltagem caracterizam os neurônios com a capacidade de ajustar a sua R_{in} e τ_m de acordo com o seu papel fisiológico. Por exemplo, regulando a expressão e/ou a cinética dos canais iônicos sublimiáres os neurônios podem se comportar como detectores de coincidência ou integradores [Konig, Engel e Singer 1996].

Figura 1.1: Resistência de entrada e constante de tempo da membrana. A. O carregamento da capacitância segue uma função exponencial e a magnitude da mudança do potencial é determinada pela resistência de entrada. B. A injeção de várias correntes despolarizantes e hiperpolarizantes muda o potencial de membrana. C. Curva V-I da parte B. A inclinação da linha reta determinado por uma regressão linear corresponde à resistência de entrada.

1.2 Núcleo Coclear Dorsal

O Núcleo Coclear Dorsal (NCD) é uma estrutura que faz parte do sistema auditivo, especificamente dos núcleos cocleares que são a primeira estação da via auditiva central e integra entradas acústicas com entradas sensoriais multimodais que vêm de diversas áreas do cérebro, mas principalmente dos nervos trigêmeo e facial [Fujino e Oertel 2003, Pilati et al. 2012, Oertel e Young 2004]. As fibras do nervo auditivo levam informação acústica da cóclea para os núcleos cocleares [Fujino e Oertel 2003]. Acredita-se que as vias neurais envolvidas com o NCD servem para detectar pistas espectrais para a localização de som [Oertel e Young 2004, May 2000, Young e Davis 2002] e para filtrar o ruído autogerado [Shore e Zhou 2006, Requarth e Sawtell 2011, Singla et al. 2017].

As células fusiformes (FUS) fazem parte dos neurônios principais do NCD. Estas células são neurônios glutamatérgicos que integram a atividade de dois sistemas de entrada, um correspondente às fibras do nervo auditivo (informação auditiva) e outro correspondente às fibras paralelas (informação sensorial multimodal). Essas duas entradas excitam as FUS.

Figura 1.2: A. Corte coronal do núcleo coclear dorsal com a sua localização. B. Célula fusiforme e a sua localização na camada fusiforme. C. Perfil eletrofisiológico característico da célula fusiforme. Figura modificada de [Paxinos e Watson 2007].

1.3 Células fusiformes

A FUS tem um corpo celular com forma de fuso ou triangular de aproximadamente $25\ \mu\text{m}$ de diâmetro [Osen 1969] e seus axônios projetam-se para o núcleo central do colículo inferior via a estria acústica dorsal [Cant e Benson 2003]. Quando estimuladas com a injeção de um pulso de corrente positiva, as FUS exibem um padrão regular de disparo [Pilati et al. 2012]. Estudos *in vitro* e *in vivo* mostram que as FUS disparam espontaneamente PAs na ausência de estimulação externa (i.e. sob bloqueio dos sinais sinápticos) [Pilati et al. 2012, Paál et al. 2003, Leao et al. 2012, Zugaib, Ceballos e Leao 2016]. Numerosos estudos *in vitro* e *in vivo* com animais anestesiados e acordados têm mostrado que as FUS existem em um de dois estados intrínsecos qualitativamente diferentes: um estado silencioso, onde o potencial de membrana permanece próximo do PMR, e um estado espontaneamente ativo, onde PAs são disparados espontaneamente [Leao et al. 2012]. Além disso, registros *in vivo* e *in vitro* indicam que as FUS ativas disparam com taxas entre 10-90 Hz [Leao et al. 2012, Waller e Godfrey 1994, Wei et al. 2010, Zhang e Oertel 1994].

A geração dos estados silencioso e ativo das FUS é devida a propriedades intrínsecas, pois bloqueadores de receptores sinápticos glutamatérgicos, GABAérgicos e glicinérgicos não alteram as propriedades do disparo das FUS [Leao et al. 2012]. As FUS expressam diferentes condutâncias iônicas sublimiáres que produzem os estados silencioso e ativo [Leao et al. 2012]. Sabe-se que os dois estados de atividade são gerados por diferentes níveis de uma condutância de potássio retificadora de entrada sensível a $BaCl_2$ (I_{KIR}). A variabilidade nas condutâncias máximas da I_{KIR} gera variações do PMR. As FUS silenciosas têm correntes KIR significativamente maiores do que FUS ativas. As FUS ativas têm o PMR mais despolarizado do que FUS silenciosas. A baixa condutância da I_{KIR} despolariza o PMR para voltagens acima do limiar de ativação de canais de sódio persistente (NaP). Assim que os canais NaP são ativados, o PMR fica instável e o disparo espontâneo é acionado [Leao et al. 2012]. Portanto, o estado de atividade de FUS, silencioso ou ativo, é determinado pelo PMR gerado por variações da I_{KIR} [Leao et al. 2012].

A expressão de canais NaP é similar em FUS silenciosas e ativas [Leao et al. 2012]. O bloqueio dos canais NaP por riluzol abole o disparo espontâneo de FUS ativas, indicando que os canais NaP são necessários na geração do disparo espontâneo. Porém, o bloqueio dos canais NaP não evita que o neurônio possa disparar PAs evocados pela injeção de corrente [Leao et al. 2012].

Um estudo desenvolvido por [Leao et al. 2012] mostrou que depois do bloqueio da I_{KIR} , da I_{NaP} e da I_h , o PMR das FUS ficou próximo de -55 mV. Isso é devido à presença de uma corrente de vazamento mista permeável a Na^+ e K^+ [Ceballos et al. 2016]. A condutância dessa corrente é independente da voltagem, então a corrente depende linearmente do potencial de membrana. Para potenciais de membrana sublimiáres, essa corrente de vazamento é despolarizante e contribui na geração do disparo espontâneo das FUS. Essa corrente de vazamento mantém despolarizado o potencial da membrana das FUS ativas, produzindo o disparo espontâneo característico delas, enquanto a despolarização devido a I_{Leak} é contrabalançada por uma I_{KIR} mais forte nas FUS silenciosas, o que previne o seu disparo espontâneo. Porém, a variabilidade intrínseca da I_{Leak} não determina os estados silenciosos e ativos das células fusiformes, o que é feito pela interação entre a I_{Leak} e a I_{KIR} .

Correntes de vazamento permeáveis a sódio têm sido identificadas em vários tipos de neurônios [Raman, Gustafson e Padgett 2000, Lu et al. 2007, Khaliq e Bean 2010, Lazarenko et al. 2010, Lu e Feng 2011] gerando atividade marcapasso mantendo constantemente despolarizado o potencial de membrana. Interessantemente, neurônios do núcleo cerebelar profundo, os quais seriam o equivalente às FUS [Oertel e Young 2004], também apresentam uma corrente de vazamento permeável ao sódio que mantém o potencial de membrana constantemente despolarizado gerando atividade de disparo espontânea [Raman, Gustafson e Padgett 2000]. Um canal que apresenta as propriedades de uma corrente de vazamento permeável ao sódio foi identificado (NALCN; [Lu et al. 2007, Ren 2011]) e é o candidato mais provável para a componente de sódio da condutância de vazamento das células fusiformes do NCD.

A I_h tem sido registrada nas FUS exibindo uma corrente de entrada de ativação lenta quando uma corrente hiperpolarizante é injetada [Paál et al. 2003]. Essa corrente é altamente sensível à aplicação extracelular de cloreto de cério e ZD7288 [Paál et al. 2003]. A I_h é ativada em potenciais de membrana mais negativos do que -60 mV e tem um potencial de reversão que fica entre -25 e -50 mV. Como resultado desse potencial de reversão mais positivo do que o PMR, a ativação da I_h despolariza o potencial de membrana [Rusznák et al. 2013]. No PMR, 3,5% da condutância máxima da I_h está disponível nas FUS [Rusznák et al. 2013, Paál et al. 2003, Apostolides e Trussell 2014, Tang e Trussell 2015].

A I_h contribui na geração do disparo espontâneo de FUS ativas [Paál et al. 2003]. O bloqueio da I_h hiperpolariza o PMR e diminui a frequência de disparo espontâneo, porém não a elimina por completo [Paál et al. 2003, Rusznák et al. 2013, Ceballos et al. 2016]. Então, a I_h não é a corrente determinante para o disparo intrínseco de FUS, pois PAs espontâneos ainda são registrados depois do bloqueio completo dessa corrente.

Um estudo recente [Ceballos et al. 2016] mostrou que a inibição da I_h com ZD7288 afeta o PMR igualmente nas FUS ativas e silenciosas, hiperpolarizando ambos os neurônios igualmente. Porém, esse bloqueio aumentou a R_{in} em maior quantidade nas FUS ativas do que nas silenciosas.

1.4 Hipocampo

O hipocampo é uma das estruturas que faz parte do sistema límbico dos mamíferos. Tem forma alongada, em forma de meia lua com seu eixo se estendendo em formato de "C". O hipocampo tem uma estrutura laminar e se divide nas regiões CA1, CA2, e CA3. O hipocampo é uma área de associação do córtex cerebral e está intimamente envolvido com processos de memória. Uma das camadas é a camada piramidal na qual se encontram os corpos celulares das células piramidais. As células piramidais do CA3 inervam as células piramidais do CA1 com sinapses glutamatérgicas [vanStrien, Cappaert e Witter 2009]. Essa projeção é conhecida como fibras do Schaffer [Amaral e Lavenex 2007, vanStrien, Cappaert e Witter 2009] que é a principal entrada excitatória da região CA1.

Figura 1.3: A. Corte coronal do hipocampo dorsal com a sua localização. B. Célula piramidal da região CA1 e sua localização na camada piramidal. C. Perfil eletrofisiológico de uma célula piramidal do CA1. Figura modificada de [Paxinos e Watson 2007].

1.5 Células piramidais do CA1

Os neurônios piramidais estão entre os neurônios que têm sido mais extensamente estudados do cérebro inteiro. As células piramidais do CA1 (PYR) fazem parte dos neurônios principais dessa região e projetam seus axônios para os córtices entorrinal, perirrinal, pré-frontal; para a amígdala, o estriado ventral, o hipotálamo e o septo lateral [Amaral e Lavenex 2007, vanStrien, Cappaert e Witter 2009]. Esses neurônios se caracterizam por ter uma soma com forma piramidal ou ovoide, um dendrito apical calibroso e vários dendritos basais finos. Os corpos celulares das PYR têm um diâmetro de $15\ \mu\text{m}$ [Megias et al. 2001] e estão arranjados dentro da camada piramidal com espessura de 3 a 6 células.

As PYR podem disparar repetidamente com uma taxa de disparo de até centenas de Hz [Schwartzkroin 1975], sendo que a frequência de PAs declina ou se acomoda durante o trem de disparos. Também tem sido observada uma pós-hiperpolarização (AHP, do inglês *afterhyperpolarization*) lenta no fim do trem de disparos [Larsson 2013]. As PYR têm tipicamente uma R_{in} baixa [Yamada-Hanff e Bean 2015]. A resposta de voltagem das PYR é caracterizada pela presença de uma despolarização lenta ou *sag* que aparece quando uma corrente hiperpolarizante é injetada, o que indica a presença da I_h [Dougherty et al. 2013].

As amplitudes dos potenciais pós-sinápticos excitatórios (EPSPs, do inglês *excitatory postsynaptic potential*) variam desde menos de 1 mV até várias dezenas de mV. O tempo de subida do EPSP (geralmente medidos entre 10% e 90% do pico) são da ordem de 5 ms, e o decaimento do EPSP é uma função da τ_m . O limiar de disparo das PYR é próximo de 20-25 mV mais despolarizado do que o PMR de -65 mV até -84 mV [Yamada-Hanff e Bean 2015].

O principal neurotransmissor excitatório do hipocampo é o glutamato [Storm-Mathisen 1977], o qual é liberado pelas fibras de *Schaffer*. A ação do glutamato é principalmente através de receptores ionotrópicos AMPA e NMDA. Os receptores de AMPA medeiam os EPSPs rápidos, enquanto os receptores de NMDA são ativados durante despolarizações intensas. O principal neurotransmissor inibitório do hipocampo é o GABA [Storm-Mathisen 1977] e o principal receptor de GABA é o receptor ionotrópico $GABA_A$, o qual é bloqueado pela picrotoxina. As PYR expressam, dentre suas correntes sublimiáres, a I_h e a I_{NaP} . A I_{NaP} é expressa principalmente no soma das PYR [Stuart e Sakmann 1995], enquanto a I_h é expressa no soma e dendritos das PYR [Dougherty et al. 2013] e a sua densidade de condutância aumenta abruptamente com a distância do soma [Magee 1998].

Por mais de três décadas sabe-se que a amplitude e a duração dos EPSPs são dependentes de voltagem, e que potenciais de membrana despolarizante próximos do limiar de disparo amplificam a amplitude e prolongam o decaimento dos EPSPs [Stafstrom et al. 1985, Deisz, Fortin e Zieglansberger 1991, Thomson, Girdlestone e West 1988]. Uma das consequências do prolongamento do EPSP é a chamada integração sináptica quase perfeita que tem sido observada em diferentes regiões do cérebro [Farries, Kita e Wilson 2010, Prescott e Koninck 2005], a qual produz efeitos

neurofisiológicos relevantes [Branco et al. 2016]. O mecanismo da amplificação da amplitude de EPSPs foi postulado como sendo uma consequência da ativação rápida da I_{NaP} [Yamada-Hanff e Bean 2015, Vervaeke et al. 2006]. Porém, nenhuma explicação satisfatória tem sido fornecida para explicar o prolongamento do EPSP em potenciais despolarizados. De um ponto de vista intuitivo, uma inativação lenta da I_{NaP} poderia explicar a maior duração dos EPSPs em potenciais próximos do limiar de disparo. Porém, a I_h , a qual também é uma corrente de entrada não inativante que está ativada em potenciais sublimiáres, apresenta o efeito oposto, encurtando a duração dos EPSPs e da τ_m [Yamada-Hanff e Bean 2015, Magee 1998]. Como ambas a I_{NaP} e a I_h são correntes despolarizantes e não inativas, isso sugere que nenhum desses aspectos provavelmente é o responsável pelos efeitos opostos do prolongamento da duração de EPSPs.

Entre todas as correntes dependentes de voltagem sublimiáres expressas nas PYR e nas FUS, a I_{NaP} e a I_h se destacam por sua capacidade de controlar o τ_m [Yamada-Hanff e Bean 2015, Dougherty et al. 2013, Hirsch e Oertel 1988]. Quando comparando com a τ_m das PYR e das FUS, a I_{NaP} pode ser classificada como uma corrente extremamente rápida enquanto a I_h seria uma corrente lenta [Yamada-Hanff e Bean 2015, Dougherty et al. 2013, Ceballos et al. 2016, Agar, Green e Sanders 1997]. A I_h tem uma curva IV monotônica com somente condutância de inclinação positiva. Ao contrário da I_{NaP} , a I_h diminui a τ_m provavelmente como resultado da sua condutância de inclinação positiva [Yamada-Hanff e Bean 2015].

Recentes trabalhos teóricos, de simulação e usando a técnica de *dynamic-clamp* mostraram que a habilidade da I_{NaP} para aumentar a τ_m está relacionada com uma ativação rápida [Manuel et al. 2007, Remme e Rinzel 2011]. Interessantemente, a cinética de ativação da I_h nas PYR e nas FUS é muito bem ajustada pela soma de duas funções exponenciais, com as duas constantes de tempo sendo chamadas de rápida e lenta, respectivamente [Dougherty et al. 2013, Ceballos et al. 2016]. Isso pode estar relacionado com a expressão de diferentes subunidades nos canais HCN, por exemplo, HCN1 e HCN2, nas PYR [Dougherty et al. 2013] ou pela localização dos canais no soma e dendritos. Notavelmente, medidas experimentais dessas constantes de ativação da I_h apresentam uma alta variabilidade dos seus valores, por exemplo, nas PYR elas têm valores de ativação

rápida entre 20 and 50 ms e de ativação lenta entre 100 e 500 ms [Surges, Freiman e Feuerstein 2003, Dougherty et al. 2013, Poolos, Bullis e Roth 2006, vanWelie, vanHooft e Wadman 2004].

1.6 Condutâncias negativas

De acordo com a teoria do cabo passivo, um aumento da condutância de membrana produz uma diminuição da resistência de entrada e da constante de tempo da membrana. Ao contrário das correntes de vazamento clássicas, as correntes dependentes de voltagem têm um comportamento não linear o qual pode criar regiões de condutância negativa, apesar do aumento da condutância de membrana (permeabilidade). Uma condutância negativa se opõe a uma condutância passiva da membrana nos efeitos da mesma na resistência de entrada e na constante de tempo da membrana, aumentando os seus valores. Isso afeta substancialmente a amplitude e o decaimento dos potenciais pós-sinápticos na faixa de voltagem da condutância negativa. Esse efeito paradoxal tem sido muito bem descrito no caso da I_{NaP} . A criação de uma região de condutância negativa tem um impacto nas propriedades neuronais da membrana e na integração sináptica. Com o intuito de explicar os efeitos das condutâncias negativas nas propriedades elétricas da membrana, atualmente tem sido desenvolvidas novas aproximações teóricas, entre as quais se destaca a teoria do cabo quase-ativo, a qual é uma extensão da teoria do cabo passivo que inclui as correntes dependentes de voltagem e os seus efeitos nas propriedades sublimiares neuronais.

Os canais iônicos são considerados condutores biológicos da membrana neuronal. Por definição, a condutância de um único canal é positiva seguindo a lei de Ohm. A abertura de canais aumenta a permeabilidade iônica e diminui a resistência (R_m) e a constante de tempo da membrana (τ_m), de acordo com o modelo do cabo passivo das membranas biológicas. Diferentes tipos de neurônios têm diferentes resistências de membrana, as quais afetam a sua excitabilidade e as propriedades integrativas e temporais. Os canais de vazamento de potássio são considerados os determinantes clássicos da R_m [Enyedi e Czirjak 2010].

Correntes ôhmicas lineares tem uma relação linear de corrente-voltagem (IV),

produzindo uma condutância de inclinação positiva (Figura 1.4). Porém, canais dependentes de voltagem apresentam relações não lineares de corrente-voltagem e sob certas condições podem criar regiões de condutância de inclinação negativa através de um *feedback* positivo entre a mudança no potencial de membrana e as variáveis de ativação [Hutcheon e Yarom 2000, Izhikevich 2007, Remme e Rinzel 2011]. Em termos de comportamento da corrente, uma condutância de inclinação negativa significa que uma corrente de entrada aumenta a sua magnitude com a despolarização ou que uma corrente de saída aumenta a sua magnitude com a hiperpolarização. No caso de correntes de entrada, uma condutância de inclinação negativa é gerada quando a corrente é ativada pela despolarização, a qual leva a um *feedback* positivo entre a ativação e a amplitude da corrente através de um mecanismo regenerativo. A fase de ativação das correntes de sódio dependentes de voltagem na região sublimiar é um exemplo típico de uma região de condutância de inclinação negativa (Figura 1.4).

Figura 1.4: Curva IV da I_{NaP} e de uma corrente de vazamento, mostrando a região da condutância de inclinação negativa. B. Feedback positivo entre a despolarização e a variável de ativação que aumenta regenerativamente as correntes de entrada e cria uma região de condutância de inclinação negativa.

O que é exatamente uma condutância de inclinação negativa? A definição infinitesimal ou diferencial da condutância da membrana no estado estacionário é $G_m = dI/dV_{ss}$, onde V_{ss} é o potencial de membrana no estado estacionário. Essa definição é também comumente conhecida como a condutância de inclinação, já que corresponde à inclinação da curva IV do estado estacionário [Johnston e Wu 1994]. A condutância de inclinação no estado estacionário de uma corrente dependente de

voltagem $I_v = g(V, t)(V - E_{rev})$ é obtida derivando a equação da corrente, $G = dI_v/dV_{ss} = g^{chord} + G^{Der}$, onde g_{chord} é a chamada condutância de corda e $G^{Der} = (V - E_{rev})(dg/dV)$ é a chamada condutância diferencial. Interessantemente, a g_{chord} é sempre positiva, enquanto a G^{Der} pode ser positiva ou negativa, e quando a G^{Der} é negativa e maior do que a g_{chord} a condutância de inclinação é negativa [Koch 1998, Wessel, Kristan e Kleinfeld 1999].

A condutância de membrana G_m de uma membrana que contém correntes lineares (I_L) e correntes iônicas dependentes de voltagem (I_V) é obtida derivando a soma das correntes $G_m = \sum G_V + \sum g_L$, onde G_V é a condutância de inclinação das I_V e g_L é a condutância das I_L . O inverso da condutância de membrana é a resistência de membrana ou resistência de inclinação $R_m = 1/G_m$. Em termos experimentais, a R_m também se refere à resistência de entrada (R_{in}), a qual é a soma da resistência da membrana R_m e da resistência em serie R_s do eletrodo de registro.

Os conceitos básicos e a análise matemática da condutância de corda e da condutância de inclinação das correntes dependentes de voltagem têm sido muito bem descritas em vários trabalhos prévios [Finkelstein e Mauro 2011, Johnston e Wu 1994, Koch 1998]. Porém, até recentemente foram desenvolvidas equações explícitas para a condutância de inclinação das correntes dependentes de voltagem. Essas equações usam o formalismo de *Hodgkin-Huxley* para descrever as correntes e a equação de *Boltzmann* para descrever a cinética de ativação e inativação [Ghigliazza e Holmes 2004, Remme e Rinzel 2011]. Isso permitiu a possibilidade de uma aproximação analiticamente tratável dos efeitos da condutância de inclinação negativa.

Os estudos de [Remme e Rinzel 2011] mostraram os efeitos da I_{NaP} na propagação de entradas sinápticas através de cabos dendríticos usando a teoria do cabo quase-ativo, a qual é uma extensão da teoria do cabo passivo. Essa aproximação se fundamenta na linearização das condutâncias dependentes de voltagem do cabo fixando o valor do potencial de membrana V_R . O método foi primeiro empregado por [Sabah e Leibovic 1969] e um trabalho posterior de [Koch 1984] esclareceu certos princípios gerais dos cabos quase-ativos.

Essa aproximação permitiu a classificação da I_{NaP} como corrente

regeneradora, a qual age como um feedback positivo e amplifica as mudanças do potencial de membrana, amplificando os EPSPs. A eficácia da I_{NaP} em modular a forma do EPSP é determinada pela constante de tempo de ativação: quanto mais rápida, mais forte é o efeito na amplitude e decaimento do EPSP [Remme e Rinzel 2011]. Esses efeitos são controlados pelo parâmetro adimensional μ

$$\mu = \gamma(V_R - E_{rev}) \frac{\partial s^\infty(V_R)}{\partial V}, \quad (1.1)$$

onde V_R é o potencial de membrana fixado no qual é feita a linearização, s^∞ é a variável de ativação no estado estacionário, γ é a razão entre a condutância máxima da corrente e a condutância de vazamento, e a derivada parcial caracteriza a inclinação da curva de ativação no V_R . O parâmetro μ caracteriza a força do *feedback* positivo da I_{NaP} . Os parâmetros centrais que determinam qualitativamente os efeitos da I_{NaP} no EPSP são o parâmetro μ , a constante de tempo de ativação τ_{act} e a densidade de corrente relativa γ . O parâmetro μ é negativo para correntes regenerativas ou amplificadoras tais como a I_{NaP} , a qual é ativada por despolarização (i.e., a derivada parcial é positiva) e tem um potencial de reversão despolarizado (relativo ao V_R) [Goldberg, Deister e Wilson 2007]. Essas correntes são chamadas de correntes amplificadoras devido à resposta amplificada nas baixas frequências relativas ao cabo passivo [Hutcheon e Yarom 2000].

A constante de tempo da ativação da corrente amplificadora é central na determinação do grau no qual essa corrente afeta a forma da EPSP. Por exemplo, uma corrente relativamente lenta ($\tau_{act} \gg \tau_m$) não é capaz de reagir a transientes de voltagem e simplesmente age como uma corrente passiva na escala temporal de um EPSP, atenuando e encurtando os EPSPs. O efeito de uma corrente ativa com cinética lenta na forma do EPSP é causado pela sua contribuição da condutância de corda, devido a que τ_{act} é tipicamente muito lenta para afetar significativamente a forma do EPSP. Por outro lado, uma corrente muito rápida ($\tau_{act} \ll \tau_m$) muda continuamente no estado estacionário com a voltagem e, então, age eficazmente através da condutância de inclinação negativa [Remme e Rinzel 2011]. Uma desvantagem da aproximação linear é que é somente válida para pequenas mudanças de voltagem; quanto maiores as mudanças de voltagem, mas a linearização se afasta

do sistema não linear. Então, em princípio essa aproximação é muito apropriada para EPSPs pequenos.

1.6.1 Condutância negativa e propriedades sublimiares

O conceito da condutância de inclinação negativa cria um paradoxo interessante. Se um neurônio despolariza e ativa uma condutância de entrada dependente de voltagem, a qual apresenta uma região de condutância de inclinação negativa, será que R_m e τ_m diminuem, tal como esperado devido ao aumento da condutância iônica (i.e. permeabilidade), ou aumentam devido à condutância de inclinação negativa? Observações iniciais [Hirsch e Oertel 1988, Stafstrom, Schwindt e Crill 1982] relacionaram a presença de uma condutância de inclinação negativa gerada pela I_{NaP} com um aumento da R_m . Estudos posteriores mostraram que a I_{NaP} pode ser ativada durante um EPSP, prolongando o seu decaimento [Hirsch e Oertel 1988, Stafstrom et al. 1985]. [Thomson, Girdlestone e West 1988] mostraram que a amplitude e a duração de EPSPs é dependente de voltagem e que a despolarização do potencial de membrana para valores próximos do limiar de disparo amplifica a amplitude e a duração dos EPSPs. Posteriormente, foi estabelecido que esses efeitos são mediados pela I_{NaP} [Andreasen e Lambert 1999, Deisz, Fortin e Zieglgansberger 1991, Lipowsky, Gillessen e Alzheimer 1996, Schwindt e Crill 1995, Stuart e Sakmann 1995, Urban, Henze e Barrionuevo 1998]. A I_{NaP} é geralmente aceita como uma corrente amplificadora, a qual aumenta a R_m e amplifica os EPSPs por sua condutância de inclinação negativa em voltagens sublimiares [Stafstrom, Schwindt e Crill 1982] (Figure 1.4).

Tem sido observado em vários tipos de neurônios que a R_m e τ_m aumentam de uma forma dependente da voltagem e que esse efeito é abolido pela aplicação de TTX [Agrawal et al. 2001, Curti et al. 2008, Economo, Martinez e White 2014, Fernandez, Malerba e White 2015, Hirsch e Oertel 1988, Klink e Alonso 1993, Stafstrom, Schwindt e Crill 1982, Yamada-Hanff e Bean 2015]. Esses resultados sugerem que uma região de condutância de inclinação negativa gerada pela I_{NaP} causou essa aumento paradoxal da R_m . Recentemente, [Yamada-Hanff e Bean 2015] mostraram que nas PYR a ativação da I_{NaP} aumenta simultaneamente a R_m e τ_m enquanto a I_h , que não produz uma região de condutância de inclinação

negativa, diminui a R_m e τ_m . O aumento ou diminuição desses parâmetros se correlaciona com regiões de condutância de inclinação negativa e positiva das curvas IV, respectivamente. Resultados similares foram obtidos por [Hirsch e Oertel 1988] nas FUS de camundongos onde observaram um aumento da R_m com a despolarização que foi abolida com TTX. Além disso observaram uma diminuição concomitante da R_m e τ_m com a hiperpolarização, em paralelo com a desativação da I_{NaP} , que é expressa nesses neurônios [Leao et al. 2012].

Mais evidências convincentes de que o aumento da R_m é o resultado da condutância de inclinação negativa vêm do trabalho de [Fernandez, Malerba e White 2015]. Neste experimento, uma condutância artificial linear negativa e positiva foi injetada usando um sistema de *dynamic-clamp* em células estreladas do córtex entorrinal onde foi observado que a condutância negativa aumentou a R_m enquanto a condutância positiva diminui a R_m . Em uma situação como essa, as condutâncias de inclinação (positiva e negativa) de cada corrente (linear e dependente de voltagem) são simplesmente somadas algebricamente e é essa soma que determina a R_m seguindo a regra matemática: $R_m = 1/G$ [Buchanan et al. 1992, Moore, Buchanan e Murphey 1994, Yoshii, Moore e Christensen 1988]. Desta forma, na região sublimiar a condutância de inclinação negativa da I_{NaP} se opõe à condutância de inclinação positiva da corrente de vazamento, o que leva a uma diminuição da condutância de inclinação positiva total e aumenta a R_m .

A impedância elétrica de neurônios caracteriza a sua resposta da voltagem a entradas senoidais de corrente com frequência variável. A impedância é uma extensão no domínio da frequência do conceito da resistência e relaciona as amplitudes e as fases dos sinais de entrada e saída [Hutcheon e Yarom 2000]. Tem sido observado que a I_{NaP} aumenta a impedância de neurônios [Boehlen et al. 2012, Curti et al. 2008, Economo, Martinez e White 2014, Gutfreund e Segev 1995, Hu, Vervaeke e Storm 2002, Hutcheon, Miura e Puil 1996a, Hutcheon, Miura e Puil 1996b, Jacobson et al. 2005, Klink e Alonso 1997, Manuel et al. 2007, Pape e Driesang 1998, SaintMleux e Moore 2000, Sun et al. 2014, Wu et al. 2005, Yang et al. 2009, Yaron-Jakoubovitch et al. 2008]. O aumento na impedância da membrana é uma função do potencial da membrana, aumentando com a despolarização à medida que se aproxima do limiar de disparo. [Buchanan et al. 1992] mostraram

que a ativação da I_{NaP} gera um aumento na impedância o que leva diretamente à amplificação dos EPSPs.

1.6.2 A condutância negativa amplifica os potenciais pós-sinápticos

É sabido que a amplitude e duração dos EPSPs são dependentes da voltagem e que a despolarização do potencial de membrana em valores próximos do limiar de disparo amplifica a amplitude e a duração dos EPSPs [Deisz, Fortin e Zieglgansberger 1991, Thomson, Girdlestone e West 1988, Zsiros e Hestrin 2005]. A amplificação dos EPSPs pela I_{NaP} tem sido observada consideravelmente em neurônios do neocórtex [Andreasen e Lambert 1999, Carter et al. 2012, Deisz, Fortin e Zieglgansberger 1991, Fricker e Miles 2000, Gonzalez-Burgos e Barrionuevo 2001, Hirsch e Gilbert 1991, Lipowsky, Gillessen e Alzheimer 1996, Rotaru, Lewis e Burgos 2007, Schwindt e Crill 1995, Stafstrom et al. 1985, Stuart e Sakmann 1995, Thomson, Girdlestone e West 1988, Zsiros e Hestrin 2005], hipocampo [Urban, Henze e Barrionuevo 1998, Vervaeke et al. 2006], córtex entorrinal [Economo, Martinez e White 2014, Rosenkranz e Johnston 2007], núcleo coclear dorsal [Hirsch e Oertel 1988], núcleo subtalâmico [Farries, Kita e Wilson 2010], hipotálamo [Branco et al. 2016], bulbo olfatório [Liu e Shipley 2008], corno dorsal da medula espinhal [Prescott e Koninck 2005], oliva superior medial [Scott, Mathews e Golding 2010] e na substância negra pars compacta [Yamashita e Isa 2004]. Na maioria desses experimentos, o bloqueio da I_{NaP} com TTX aboliu a dependência da voltagem da amplitude e da área dos EPSPs.

Interessantemente, a I_{NaP} também amplifica os potenciais pós-sinápticos inibitórios (IPSPs) em neurônios piramidais do neocórtex [Stuart 1999, Williams e Stuart 2003], neurônios piramidais hipocámpais [Hardie e Pearce 2006] e em células estreladas do córtex entorrinal medial [Economo, Martinez e White 2014]. Isso sugere que a condutância de inclinação negativa da I_{NaP} amplifica as mudanças da voltagem independentemente da direção em que acontece a mudança, i.e. amplifica tanto a despolarização quanto a hiperpolarização da membrana.

1.7 Formalismo de Hodgkin e Huxley

As propriedades elétricas que determinam o potencial de membrana de um neurônio provêm da separação de cargas iônicas pela membrana celular. Os meios intracelular e extracelular contêm diferentes concentrações de íons tais como potássio (K^+), sódio (Na^+) e cálcio (Ca^{2+}), que através do fluxo destas cargas pelos canais iônicos compõe a base elétrica de atividade dos neurônios.

O potencial de membrana para o qual uma espécie de íon está em equilíbrio eletroquímico e não se produzem contribuições líquidas de correntes para esse íon é determinado pela equação de *Nernst*:

$$E_{rev} = \frac{RT}{zF} \ln\left(\frac{[X]_{out}}{[X]_{in}}\right), \quad (1.2)$$

onde R é a constante universal dos gases, T é a temperatura em escala absoluta (K), z é a valência do íon, F é a constante de *Faraday* X é o íon correspondente e $[X]_{out}$ e $[X]_{in}$ são as concentrações extracelular e intracelular do íon, respectivamente.

As correntes presentes na membrana de um neurônio são de dois tipos: correntes capacitivas devidas às cargas acumuladas dos lados interno e externo da membrana e correntes resistivas devidas aos canais iônicos que permitem a passagem transmembrana dos íons e correntes injetadas por mecanismos externos como eletrodos (Figura 1.5).

Figura 1.5: Circuito elétrico equivalente de uma porção de membrana. Contém a capacitância de membrana em paralelo com os canais iônicos (correntes resistivas) e correntes injetadas por eletrodos. Modificado de [Sterratt et al. 2011].

A equação que determina a mudança do potencial de membrana em função

destas correntes é:

$$C \frac{dV}{dt} = I_{ion} + I_{inj}, \quad (1.3)$$

onde C é a capacitância de membrana da célula, V é a voltagem de membrana e I_{ion} e I_{inj} são as correntes iônica e injetada respectivamente.

A forma matemática para representar as correntes produzidas pelo fluxo de íons através de canais cuja condutância depende do potencial de membrana, seguindo o formalismo de *Hodgkin e Huxley* é:

$$I_{ion} = g_{ion} n^a h^b (V - E_{ion}), \quad (1.4)$$

onde n e h são as variáveis de ativação e inativação da condutância, E_{ion} é o potencial de *Nernst* (também chamado de reversão) determinado pela equação de *Nernst*, g_{ion} é a condutância máxima do canal e V é o potencial de membrana. Os expoentes a e b são números inteiros necessários para obter o melhor ajuste entre o modelo e as medidas experimentais da condutância iônica correspondente. As variáveis de ativação e inativação n e h variam no tempo de acordo com uma cinética descrita por uma variável estacionária $n_{\infty}(V)$ e uma constante de tempo característica $\tau_n(V)$. Essa variação é descrita por uma equação do tipo:

$$\frac{dn}{dt} = \frac{n_{\infty} - n}{\tau_n}. \quad (1.5)$$

OBJETIVOS

- Na primeira parte, investigamos o papel da I_h expressa nas FUS no comportamento da R_{in} e na criação dos modos de disparo desses neurônios. Para isso fazemos registros eletrofisiológicos de *patch-clamp* e aplicamos uma I_h artificial usando um sistema de *dynamic-clamp*. Também, usando um modelo computacional aprimorado da FUS e quantificando as variações das condutâncias sublimiares em neurônios individuais, analisamos o impacto da combinação de diferentes conjuntos de condutâncias (I_{NaP} , I_h , I_{Leak} e I_{KIR}) na R_{in} e na criação dos modos de disparo desses neurônios.
- Na segunda parte, estabelecemos os mecanismos biofísicos subjacentes da prolongação do decaimento de EPSPs nas PYR devido ao efeito da condutância negativa da I_{NaP} . Para isso, primeiro derivamos uma expressão analítica para a condutância de inclinação no estado estacionário de correntes dependentes de voltagem não inativantes com o intuito de estabelecer o mecanismo pelo qual a ativação da I_{NaP} aumenta a R_{in} e τ_m do neurônio. Com o intuito de estabelecer a relação entre o aumento da R_{in} e τ_m e a condutância negativa de inclinação da I_{NaP} , usamos simulações computacionais e registros eletrofisiológicos aplicando uma I_{NaP} artificial usando um sistema de *dynamic-clamp*. Finalmente, investigamos o efeito da cinética da I_{NaP} na prolongação do decaimento de EPSPs.
- Na terceira parte, estudamos os mecanismos biofísicos pelos quais as cinéticas da I_{NaP} e da I_h influenciam a τ_m das PYR. Para isso, propomos uma nova solução analítica da condutância de inclinação no estado transiente de

correntes dependentes de voltagem não inativantes (um conceito novo chamado de "condutância de inclinação dinâmica"). Simulações computacionais são usadas para testar as previsões teóricas.

MÉTODOS

3.1 Preparo de fatias de tronco cerebral e registro eletrofisiológico

Camundongos Swiss machos com idade entre 17 e 25 dias pós-natais foram sacrificados depois de serem anestesiados com inalação de isoflurano de acordo com os métodos aprovados pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal (CETEA) da Universidade de São Paulo . Os cérebros foram removidos do crânio e cortados em uma solução gelada cuja composição em mM foi: NaCl (87), $NaHCO_3$ (25), KCl (2,5), NaH_2PO_4 (1,25), $CaCl_2$ (0,5), $MgCl_2$ (7), dextrose (25), sacarose (75), com osmolalidade de 335 mOsm/kg H_2O e pH 7,4 quando borbulhada com a mistura carbogênica (95% O_2 e 5% CO_2). Antes da remoção dos cérebros, o nervo vestibulococlear (VIII nervo craniano) foi cortado para evitar danos ao NCD. Fatias coronais de 200 μm de espessura contendo o NCD com as suas 3 camadas [Oertel e Young 2004] foram feitas usando um vibrátomo (Vibratome 1000 Plus) e incubadas a 35°C durante 45 minutos. Posteriormente deixadas a temperatura ambiente ($\sim 25^\circ C$) em uma solução de registro (conhecido como fluido cerebrospinal artificial - aCSF), cuja composição em mM foi: NaCl (125), KCl (2,5), $NaHCO_3$ (25), NaH_2PO_4 (1,25), dextrose (10), $CaCl_2$ (2), $MgCl_2$ (1), com osmolalidade de 305 mOsm/kg H_2O e pH 7,4 quando borbulhada com a mistura carbogênica (95% O_2 e 5% CO_2).

As FUS foram visualizadas na fatia com um microscópio (Olympus BX51W) com ótica de contraste por interferência diferencial (DIC) e iluminadas com luz infravermelha usando uma objetiva de imersão em água de 40x. Os registros

foram feitos com pipetas confeccionadas a partir de microelétrodos de borosilicato (BF150-86-10, SUTTER INSTRUMENTS) de resistências entre 2 e 5 $M\Omega$ quando preenchidos com uma solução interna cuja composição em mM foi : 113 K-gluconato, 4,5 $MgCl_2$, 14 tris-fosfocreatina, 9 HEPES, 0,1 EGTA, 4 Na-ATP, 0,3 tris-GTP, 10 sacarose, com osmolaridade de 300 mOsmol e pH 7,3 acertado com KOH. Os registros eletrofisiológicos foram feitos nos modos de *voltage* e *current-clamp*.

As FUS foram identificadas com base na sua localização na camada fusiforme, pelas suas propriedades eletrofisiológicas e pela morfologia característica. Registros no modo de *whole-cell* foram realizados em uma temperatura de 33-36°C usando um sistema de aquecimento em linha (Warner Instruments) e a perfusão do aCSF tinha uma velocidade de aproximadamente 1 ml/min.

Os dados foram adquiridos no PATCHMASTER (HEKA) a 20 kHz e filtrados com um filtro passa-baixo a 3 kHz (*Bessel*) usando um amplificador EPC-10 (HEKA Electronics). Os experimentos no modo de *voltage-clamp* foram realizados com um potencial de *holding* de -65 mV, enquanto os experimentos no modo de *current-clamp* foram realizados com $I = 0$ em FUS silenciosas e com injeção de corrente negativa DC (entre -20 a -200 pA) em FUS ativas.

A resistência de acesso foi monitorada durante todo o experimento a partir do tamanho e da forma do transiente capacitivo em resposta a um pulso de voltagem de 5 mV. Registros com resistência de acesso maiores de 20 $M\Omega$ foram descartados. Todos os registros foram feitos na presença de antagonistas dos receptores de $GABA_A$ e glicina: picrotoxina (PTX, 20 μM) e estriquinina (STR, 1 μM). As drogas foram preparadas em alíquotas 1000 vezes concentradas e diluídas na solução de perfusão no dia do experimento. PTX e STR foram obtidas da Sigma.

3.2 Preparo de fatias de hipocampo e registro eletrofisiológico

O procedimento foi similar ao explicado na seção anterior. Ratos Wistar machos com idade entre 18 e 22 dias pós-natais foram sacrificados depois de serem anestesiados com inalação de isoflurano de acordo com os métodos aprovados pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal (CETEA) da Universidade de São

Paulo. Os cérebros foram removidos do crânio e cortados em uma solução gelada cuja composição em mM foi: NaCl (87), $NaHCO_3$ (25), KCl (2,5), NaH_2PO_4 (1,25), $CaCl_2$ (0,2), $MgCl_2$ (7), dextrose (25), sacarose (75), com osmolalidade de 335 mOsm/kg H_2O e pH 7,4 quando borbulhada com a mistura carbogênica (95% O_2 e 5% CO_2). Fatias coronais de 300 μm de espessura contendo o hipocampo dorsal foram feitas usando um vibrátomo (Vibratome 1000 Plus) e incubadas a 35°C durante 45 minutos e posteriormente deixadas a temperatura ambiente (25°C) em uma solução de registro (aCSF), cuja composição em mM foi: NaCl (120), KCl (2,5), $NaHCO_3$ (25), NaH_2PO_4 (1,25), dextrose (20), $CaCl_2$ (2), $MgCl_2$ (1), com osmolalidade de 310 mOsm/kg H_2O e pH 7,4 quando borbulhada com a mistura carbogênica (95% O_2 e 5% CO_2).

As PYR foram visualizadas na fatia com um microscópio (Olympus BX51W) com ótica de contraste por interferência diferencial (DIC) e iluminadas com luz infravermelha usando uma objetiva de imersão em água de 40x. Os registros foram feitos com pipetas confeccionadas a partir de microelétrodos de borosilicato (BF150-86-10, SUTTER INSTRUMENTS) de resistências entre 4 e 6 $M\Omega$ quando preenchidos com uma solução interna cuja composição em mM foi: 138 K-gluconato, 8 KCl, 10 Na_2 -fosfocreatina, 10 HEPES, 0,5 EGTA, 4 Mg-ATP, 0,3 Na-GTP, com osmolaridade de 295 mOsmol e pH 7,4 acertado com KOH. Os registros eletrofisiológicos foram feitos nos modos de *voltage* e *current-clamp*. Nos experimentos de *voltage-clamp*, a resistência em série foi compensada 80%.

As PYR foram identificadas com base na sua localização na camada piramidal da região CA1 do hipocampo, pelas suas propriedades eletrofisiológicas e pela morfologia característica (soma triangular e dendrito apical comprido). Registros no modo de *whole-cell* foram realizados em uma temperatura de 33-36°C usando um sistema de aquecimento em linha (SCIENTIFICA) e a perfusão do aCSF tinha uma velocidade de aproximadamente 1 ml/min.

Os dados foram adquiridos no PATCHMASTER (HEKA) a 40 kHz e filtrados com um filtro passa-baixo a 3 kHz (*Bessel*) usando um amplificador EPC-10 (HEKA Electronics). Os experimentos no modo de *voltage-clamp* foram realizados com um potencial de *holding* de -80 mV, enquanto os experimentos no modo de *current-clamp* foram realizados com $I = 0$. Para medir aI_{NaP} , rampas de voltagem foram aplicadas

Figura 3.1: A. Curvas V-I. Tamanho da barra: 200 ms horizontal, 5 mV vertical. B. Rampa no modo de current-clamp antes (cinza) e depois (preto) da aplicação de TTX, mostrando que 100 nM bloqueia o disparo. Tamanho da barra: 1 s horizontal, 25 mV vertical. C. Registros no modo de voltage-clamp antes (cinza) e depois (preto) da aplicação de TTX. Tamanho da barra: 1 s horizontal, 200 pA vertical. D. Subtração das curvas em C, o que corresponde a I_{NaP} . Tamanho da barra: 1 s horizontal, 100 pA vertical.

de -90 mV a -30 mV durante 4 s. Essa despolarização lenta inativava as correntes transientes de sódio deixando somente a I_{NaP} [Yamada-Hanff e Bean 2015]. I_{NaP} foi obtida subtraindo as correntes produzidas pelas rampas antes e depois da perfusão com tetrodotoxina (TTX - 100 nM) (Figura 3.1).

A resistência de acesso foi monitorada através do experimento a partir do tamanho e da forma do transiente capacitivo em resposta a um pulso de voltagem de 5 mV. Registros com resistência de acesso maiores de 20 $M\Omega$ foram descartados. Todos os registros foram feitos na presença de antagonistas dos receptores de $GABA_A$: picrotoxina (PTX, 20 μM). As drogas foram preparadas em alíquotas 1000 vezes concentradas e diluídas na solução de perfusão no dia do experimento. PTX foram obtidas da Sigma e TTX foi obtida da ALOMONE LABS.

As curvas V-I no modo de *current-clamp* foram obtidas injetando pulsos de corrente hiperpolarizantes durante 1 s em incrementos de +20 pA de -400 pA até 0 pA e pulsos de corrente despolarizantes em incrementos de +10 ou +20 pA de 0 pA

até 400 pA (Figura 3.1).

Com o intuito de determinar o efeito da I_{NaP} na amplitude e duração do EPSP, um EPSC artificial (aEPSC) foi injetado através da pipeta de registro enquanto o potencial de membrana mudava de valores. O aEPSCs foi construído usando duas rampas de corrente consecutivas, uma rampa de subida de 2 ms e uma rampa de descida de 5 ms. A máxima amplitude da corrente (200 pA) foi escolhida a fim de obter um aEPSP de aproximadamente 5 mV no potencial de membrana de -90 mV (Figura 3.5).

3.3 Modelo computacional da célula fusiforme

Um modelo de um único compartimento foi construído usando o formalismo de *Hodgkin-Huxley*. O modelo é baseado em uma versão anterior reportada em [Leao et al. 2012]. A geometria do modelo de neurônio foi um cilindro com dimensões e propriedades passivas mostradas na Tabela 3.1.

Parâmetro	Valor
Capacitância específica de membrana (C_m)	1 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$
Diâmetro do compartimento	20 μm
Comprimento do compartimento	20 μm

Tabela 3.1: *Propriedades passivas e dimensões do modelo computacional da FUS*

Nosso modelo obedece a mesma equação de potencial de membrana (Figura 3.2) e contém correntes iônicas dependentes do potencial de membrana identificadas como: corrente rápida de sódio (I_{Na}), corrente de potássio retificadora retardada (I_{KD}), corrente catiônica ativada por hiperpolarização (I_h), corrente persistente de sódio (I_{NaP}), corrente de potássio retificadora de entrada (I_{KIR}), corrente de vazamento mista de Na/K (I_{Leak}). As correntes I_{Na} , I_{KD} , I_{NaP} , I_{KIR} e I_{Leak} foram modeladas do modo descrito em [Leao et al. 2012]. As condutâncias máximas de I_{Na} e I_{KD} foram ajustadas para obter uma taxa de disparo espontânea o mais próxima das observações experimentais (com valores entre 10-90 H [Leao et al. 2012, Waller e Godfrey 1994, Wei et al. 2010, Zhang e Oertel 1994]). Os parâmetros dependentes

de voltagem e da cinética foram determinados por variáveis de ativação e inativação do canal descritas em [Leao et al. 2012], vide Tabela 3.2. Os valores de condutâncias máximas, assim como os potenciais de *Nernst* (ou reversão) das correntes iônicas, por sua vez, estão descritos na Tabela 3.3.

De acordo com a lei de *Kirchoff*, a soma das cinco correntes iônicas (mais a corrente de vazamento) e a corrente capacitiva é dada pela seguinte equação:

$$C_m \frac{dV}{dt} + g_{Na} m^2 h (V - E_{Na}) + g_h (0,5A_{h1} + 0,5A_{h2}) (V - E_h) + g_{NaP} m_{NaP}^3 (V - E_{Na}) + (g_{KD} n^2 + g_{KIR} n_{KIR}) (V - E_K) + g_L (V - E_L) = I_{inj}, \quad (3.1)$$

onde C_m é a capacitância específica de membrana, V é o potencial de membrana, g_{Na} é a densidade de condutância máxima do sódio rápido, m é a variável de ativação do sódio, h é a variável de inativação do sódio e E_{Na} é o potencial de *Nernst* da corrente de sódio; g_{KD} é a densidade de condutância máxima da corrente de potássio retificadora retardada e n é a sua variável de ativação; E_k é o potencial de reversão das correntes de potássio; g_h é a densidade de condutância máxima e E_h é o potencial de reversão da corrente catiônica ativada por hiperpolarização; g_{NaP} é a densidade de condutância máxima da corrente de sódio persistente; g_{KIR} é a densidade de condutância máxima e E_{KIR} é o potencial de reversão da corrente de potássio retificadora de entrada; g_L é a densidade de condutância máxima e E_L é o potencial de reversão da corrente de vazamento. O termo I_{inj} refere-se às correntes injetadas no neurônio.

Figura 3.2: Circuito elétrico do modelo computacional da célula fusiforme. g são as condutâncias e E os potenciais de reversão. A seta indica condutâncias variáveis dependentes da voltagem. C é a capacitância da membrana.

Corrente iônica	Variável de ativação/inativação
$I_{Na} = g_{Na}m^2h(V - E_{Na})$	$m_{\infty}(V) = \frac{1}{e^{-(V+38)/3}}$
	$h_{\infty}(V) = \frac{1}{e^{(V+43)/3}}$
$I_{KD} = g_{KD}n^2(V - E_K)$	$n_{\infty}(V) = \frac{1}{e^{-(V+40)/3}}$
$I_h = g_h(0,5A_{h1} + 0,5A_{h2})(V - E_h)$	$A_{h1,h2}^{\infty}(V) = \frac{1}{e^{(V+87)/8,9}}$
$I_{NaP} = g_{NaP}m^3(V - E_{Na})$	$m_{\infty}(V) = \frac{1}{e^{-(V+55)/2,8}}$
$I_{KIR} = g_{KIR}n_{KIR}(V - E_K)$	$n_{\infty}(V) = \frac{1}{e^{(V+85,48)/12}}$

Tabela 3.2: Variável de ativação/inativação dependente do potencial de membrana das correntes iônicas

Corrente iônica	g_X (mS/cm ²)	E_{rev} (mV)	τ_{at} (ms)	τ_{inat} (ms)
Na	$g_{Na} = 80$	$E_{Na} = +50$	0,05	0,5
h	$g_h = 0,54$	$E_h = -43$		
KD	$g_{KD} = 20$	$E_K = -81,5$	0,5	
NaP	$g_{NaP} = 0,1$	$E_{Na} = +50$	5,3	
KIR	$g_{KIR} = X$	$E_K = -81,5$	0,5	
Vazamento	$g_L = 0,15$	$E_L = -51,32$		

Tabela 3.3: Densidade de condutância máxima (g_X), potencial de reversão das correntes iônicas (E_{rev}), constante de tempo de ativação (τ_{at}) e de inativação (τ_{inat}).

A I_h foi construída com base em uma descrição prévia dessa corrente [Nagtegaal e Borst 2010]. Foram usadas duas variáveis de ativação (Ah_1, Ah_2)

descritas com a mesma dinâmica de estado estacionário ($Ah_\infty(V)$) [Leao et al. 2012] porém com diferentes constantes de tempo ($\tau_{h1}(V), \tau_{h2}(V)$). As equações das constantes de tempo foram extraídas de [Destexhe, Babloyantz e Sejnowski 1993]. As equações da cinética do canal são:

$$\tau_{h1}(V) = 100 + e^{(V+183,6)/30,48} \quad (3.2)$$

$$\tau_{h2}(V) = 700 + \frac{e^{(V+188,6)/11,2}}{1 + e^{(V+105)/5,5}} \quad (3.3)$$

Baseado em dados experimentais [Leao et al. 2012], o modelo de neurônio para os estados ativos e silencioso é diferente somente no valor do g_{KIR} , sendo $g_{KIR} = 0,5$ para o estado ativo e $g_{KIR} = 1$ para o estado silencioso. Os códigos do modelo e as simulações foram rodadas no neurosimulador NEURON, versão 7.1 em computadores *Dell* com processadores *intel* i7 de 4 núcleos. O passo de tempo foi 0,1 ms e o potencial de membrana inicial foi -65 mV.

Os espaços de parâmetros foram obtidos variando os valores das condutâncias de 0 até o dobro do valor padrão (ver Tabela 3.3), somente variando duas condutâncias por vez. Com o intuito de determinar as regiões no espaço de parâmetros onde os neurônios ativos e silenciosos estariam localizados, 1 s de atividade espontânea (i.e. sem injeção de corrente) foi registrado. O potencial de membrana e o tempo dos PAs foram salvos em arquivos e posteriormente analisados usando rotinas escritas para o MATLAB. Para determinar o PMR ambas as condutâncias de sódio (g_{NaP} and g_{Na}) foram colocadas em zero e o PMR foi medido no final de 1 s do registro. Todas as medidas foram realizadas depois de 4 s com o intuito de atingir o estado estacionário. Os arquivos com o modelo e as simulações estão disponíveis com livre acesso no repositório ModelDB (<https://senselab.med.yale.edu/ModelDB/showmodel.cshtml?model=206252>).

3.4 Modelo computacional da célula piramidal do CA1

Consideramos um modelo de neurônio de um único compartimento com somente uma corrente linear (I_L) e uma corrente de sódio persistente (I_{NaP}). O

potencial de membrana é descrito pela equação $CdV/dt = -I_{NaP} - I_L + I(t)$, onde C é a capacitância de membrana e $I(t)$ é uma corrente injetada. No estado estacionário (i.e., $dV/dt = 0$) essa equação implica que $I = I_{NaP} + I_L$. Usando o formalismo de Hodgkin-Huxley para representar as correntes iônicas no regime do estado estacionário obtemos

$$I = g_{NaP}A_{NaP}(V)(V - E_{Na}) + g_L(V - E_L), \quad (3.4)$$

onde g_L e E_L são, respectivamente, a condutância máxima e o potencial de reversão da corrente linear.

A condutância de entrada do nosso modelo é obtida derivando a Eq. 3.4 em função de V :

$$G_{in} = G_{NaP} + g_L, \quad (3.5)$$

onde $G_{NaP} = dI_{NaP}/dV_{ss}$ é a condutância de inclinação da I_{NaP} .

A geometria do modelo de neurônio foi um cilindro com dimensões e propriedades passivas mostradas na Tabela 3.4. A Tabela 3.5 contem as condutâncias máximas e os potenciais de *Nernst* das correntes iônicas. As simulações foram rodadas no neurossimulador NEURON com passo de tempo de 0.01 ms e os dados foram analisados em rotinas escritas para MATLAB.

Parâmetro	Valor
Capacitância específica de membrana (C_m)	$1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$
Diâmetro do compartimento	$70 \mu\text{m}$
Comprimento do compartimento	$70 \mu\text{m}$

Tabela 3.4: *Propriedades passivas e dimensões do modelo computacional da célula piramidal CA1*

Para o estudo da influência da cinética da I_{NaP} e I_h na constante de tempo da membrana, consideramos um modelo de neurônio com um único compartimento contendo uma corrente de vazamento em conjunto com I_{NaP} ou I_h . As seguintes

Corrente iônica	g_X (mS/cm ²)	E_{rev} (mV)
NaP	$g_{NaP} = 6$	$E_{Na} = +50$
Vazamento	$g_L = 10$	$E_L = -90$

Tabela 3.5: Densidade de condutância máxima (g_X) e potencial de reversão das correntes iônicas (E_{rev}).

equações são usadas para representar tanto a I_{NaP} quanto a I_h :

$$I_X(V, t) = \bar{g}_X A_X(V, t)(V - E_X) \quad (3.6)$$

$$\frac{dA_X(V, t)}{dt} = \frac{(A_X^\infty(V) - A_X(V, t))}{\tau_X} \quad (3.7)$$

$$A_X^\infty(V) = \frac{1}{1 + e^{(V - V_{1/2})/k}}. \quad (3.8)$$

Com o intuito de modelar a I_{NaP} , usamos valores de $V_{1/2} = -50$ mV e $k = -6$ mV [Yamada-Hanff e Bean 2015] e para a I_h usamos valores de $V_{1/2} = -82$ mV e $k = 9$ mV [Magee 1998]. A condutância de vazamento foi modelada como explicado acima. A geometria foi a mesma descrita na Tabela 3.4, enquanto os valores de condutâncias máximas e os potenciais de *Nernst* das correntes iônicas estão descritas na Tabela 3.6.

Corrente iônica	g_X (mS/cm ²)	E_{rev} (mV)
h	$g_h = 10$	$E_h = -30$
NaP	$g_{NaP} = 5$	$E_{Na} = +50$
Vazamento	$g_L = 10$	$E_L = -90$

Tabela 3.6: Densidade de condutância máxima (g_X) e potencial de reversão das correntes iônicas (E_{rev}).

O potencial de membrana inicial foi -90 mV e o passo de tempo foi 0.1 ms. As simulações foram rodadas no neurosimulador NEURON e os dados foram analisados em rotinas escritas para MATLAB.

3.5 Condutância/Resistência de corda e de inclinação

Em maior detalhe, a condutância de inclinação no estado estacionário de uma corrente dependente de voltagem não inativante (G_{NI}) é obtida derivando a Eq. 3.6

$$G_{NI} = \frac{dI_{NI}}{dV_{ss}} = \bar{g}_{NI}A_{NI} + \bar{g}_{NI}(V - E_{NI})\frac{dA_{NI}}{dV_{ss}}, \quad (3.9)$$

onde o primeiro termo é a condutância de corda (g_{NI}) e o segundo termo é a condutância diferencial (G_{NI}^{Der}) (Ceballos et al 2017). Mais especificamente, a derivada de $A^\infty(V)$ na Eq. 3.9 pode ser obtida derivando a Eq. 3.8 as $(dA^\infty)/dV = ((A^\infty - 1)A^\infty)/k$. Finalmente, podemos escrever o termo diferencial da condutância de inclinação como:

$$G_{NI}^{Der} = \bar{g}_{NI}A_{NI}^\infty \frac{(A_{NI}^\infty - 1)}{k}(V - E_{NI}). \quad (3.10)$$

Note que a condutância de corda ($g_{NI} = I_{NI}(V - E_{NI})$) é sempre positiva, enquanto a G_{NI}^{Der} pode ser positiva ou negativa.

3.6 Dynamic-clamp

Simulamos a I_h e I_{NaP} usando uma Interface de Aplicação em Tempo Real (*Real Time Application Interface*, *RTAI* em inglês, <http://www.rtai.org>) em um sistema operacional LINUX [Dagostin et al. 2015]. Dois computadores foram usados, um para a aquisição de dados rodando o software PatchMaster (Heka Electronics), e um segundo computador (*dynamic-clamp*) que lê a voltagem do amplificador do *patch-clamp* (EPC-10, HEKA Electronics) e gera comandos de corrente em tempo real cada 50 μs . O computador do *dynamic-clamp* tinha arquitetura x86 (Pentium 4, Intel) no qual foi conectado uma placa de aquisição de dados PCI-6036E (National Instruments) para leitura da voltagem e injeção dos comandos de corrente no neurônio registrado. O outro extremo da placa foi conectado ao sistema de entrada e saída do amplificador de registro [Ceballos et al. 2016]. O software do *dynamic-clamp* em tempo real foi escrito pelo Prof. Dr. R.N. Leão da Universidade Federal do Rio Grande do Norte em GNU-C, e as rotinas para o controle da placa de dados foram programadas usando a Interface de Dispositivos

de Medidas e Controle em Linux (em inglês, *Linux Control and Measurement Device Interface, COMEDI*: <http://www.comedi.org>).

Registros de *dynamic-clamp* foram feitos registrando o potencial de membrana e injetando corrente na célula no modo *current-clamp* através da mesma pipeta (Figura 3.3). Os códigos foram escritos em C e as equações foram resolvidas usando o método de Euler exponencial de primeira ordem com passo de tempo de $50 \mu s$ [Dagostin et al. 2015]. Uma I_{NaP} artificial foi injetada nas PYR perfundidas com aCSF padrão e com aCSF com TTX. A I_{NaP} artificial foi calculada e injetada em tempo real usando as seguintes equações 3.6, 3.7 e 3.8.

A condutância máxima foi $\bar{g}_{NaP} = 5 \text{ nS}$, o potencial de reversão $E_{Na} = +50 \text{ mV}$ e a constante de tempo de ativação $\tau_{NaP} = 2 \text{ ms}$. Em alguns experimentos foi usado um valor mais lento de τ_{NaP} de 100 ms . Os valores de $V_{1/2} = -50 \text{ mV}$ e $k = -6 \text{ mV}$ estiveram em concordância com os dados experimentais de [Yamada-Hanff e Bean 2015]. Correntes lineares artificiais foram simuladas usando o *dynamic-clamp*. Testamos duas correntes lineares: uma com condutância positiva e a outra condutância negativa [Fernandez, Malerba e White 2015, Bose et al. 2014], seguindo a equação $I(V) = g(V - E_{rev})$. No caso da condutância positiva usamos $g = 0.5 \text{ nS}$ e $E_{rev} = 50 \text{ mV}$, e para o caso da condutância negativa usamos $g = -4 \text{ nS}$ e $E_{rev} = -80 \text{ mV}$. Esses valores de condutância foram escolhidos para reproduzir os valores da condutância de inclinação e de corda obtida da relação I-V da I_{NaP} experimental, respectivamente, para a faixa de potencial de membrana entre -75 e -70 mV (veja as Fig. 4.9 B e Fig. 4.9 C). Nos experimentos usando a condutância negativa, retringimos a injeção de corrente do *dynamic-clamp* na faixa entre -80 mV e -60 mV com o intuito de prevenir instabilidades.

Nos experimentos onde a I_h foi injetada nas FUS, foram usadas as mesmas equações descritas no modelo de neurônio. Os valores da condutância máxima foram mudados desde 5 até 40 nS .

A amostragem do potencial de membrana e da corrente calculada foi de 20 kHz . O potencial de membrana foi registrado e o potencial de junção líquida foi corrigido on-line (10 mV) antes das equações serem resolvidas.

Figura 3.3: Esquema básico do sistema de dynamic-clamp.

3.7 Análise de dados

3.7.1 Experimentos com as células fusiformes

Os dados foram corrigidos subtraindo o potencial de junção líquida de 10 mV off-line. As FUS foram classificadas como ativas quando apresentaram disparo espontâneo com uma taxa maior do que 0,5 Hz. As FUS que não apresentaram disparo espontâneo ou que disparavam a uma taxa inferior a 0,5 Hz foram classificadas como silenciosas [Leao et al. 2012] (ver Figura 3.4). A R_{in} foi calculada a partir da inclinação da relação VI, determinada pela regressão linear dos potenciais de membrana medidos no estado estacionário. O *sag* foi medido como a diferença entre o potencial de membrana no estado estacionário e o pico da hiperpolarização.

A I_h foi evocada com hiperpolarizações de 4 s de -60 até -120 mV em incrementos de -20 mV. A I_h foi estimada como a diferença entre o início e o estado estacionário da corrente (ver gráfico 4.2). A ativação e desativação da I_h foi medida ajustando uma função exponencial dupla da ativação da corrente e da desativação

Figura 3.4: Perfil eletrofisiológico de neurônios fusiformes ativo e silencioso. Note o disparo regular e a presença de sag característico desse tipo de neurônio. Também observe o afterhyperpolarization depois do disparo.

da corrente de cauda. A dependência da voltagem da g_h foi calculada usando o pico da amplitude das correntes de cauda depois da repolarização para -60 mV e foi ajustada usando uma função de *Boltzmann*. A condutância de inclinação foi determinada usando a porção linear da relação sublimiar da IV. A R_{in} foi calculada de duas formas: no modo de *current-clamp* usando a inclinação das curvas VI em resposta a correntes com passo de -20 pA de 0 até -100 pA e duração de 4 s, e no modo de *voltage-clamp*. Neste último caso, usamos o inverso da inclinação das curvas IV em resposta a voltagens com passo de -20 mV de -60 até -80 mV, ou seja, na faixa de voltagens próxima ao PMR das FUS [Leao et al. 2012].

3.7.2 Experimentos com as células piramidais do hipocampo

Os dados foram corrigidos subtraindo o potencial de junção líquida de 10 mV off-line. A R_{in} foi medida no modo de *current-clamp* analisando as relações de voltagem-corrente (V-I), antes e depois da aplicação de TTX. O potencial de membrana no estado estacionário foi medido durante os últimos 100 ms do pulso. A R_{in} para um dado potencial de membrana foi determinada pela inclinação da regressão linear de 3 respostas consecutivas no estado estacionário, onde o valor do meio correspondia ao valor de potencial escolhido. A τ_m em diferentes potenciais de membrana foi medida primeiro injetando uma corrente para atingir o potencial de membrana desejado e depois injetando uma corrente adicional (+20 pA) e ajustando uma função exponencial simples aos primeiros 100 ms da mudança da voltagem,

Figura 3.5: *A. Curvas VI representativas experimentais de registros obtidos de PYR. B. Curvas VI representativas de simulações. Note que no final dos registros foi injetada um aEPSC (parte superior) ou uma corrente despolarizante (parte inferior).*

começando o ajuste depois da queda de potencial causada pela resistência em série.

Observamos que o aEPSP apresentou um decaimento com duas fases, uma rápida e uma lenta, sendo a fase rápida muito provavelmente consequência da queda da voltagem pela resistência em série, a qual não foi sensível a mudanças da R_{in} pela aplicação de TTX ou de condutâncias artificiais usando o sistema de *dynamic-clamp*. Devido a isso não conseguimos ajustar o decaimento do aEPSP usando uma função exponencial simples e decidimos avaliar os efeitos no curso temporal do aEPSP medindo o pico da amplitude do aEPSP e a integral temporal (área abaixo da curva) e calculamos a razão da área pelo pico. Os parâmetros nas simulações foram analisados de modo similar, com exceção da R_{in} a qual foi medida como $\Delta V/\Delta I$, onde ΔV foi a mudança da voltagem produzida pela injeção de uma pequena corrente despolarizante (10 pA) (Figura 3.5).

3.7.3 Simulações do estudo da influência da cinética na constante de tempo da membrana

A τ_m dependente da voltagem foi determinada de simulações computacionais analisando as relações de voltagem-corrente (V-I). Um tempo inicial de 4 s foi usado antes de cada estimulação para permitir que as variáveis estivessem no estado

estacionário. Diferentes potenciais de membrana foram obtidos injetando pulsos de corrente de 4 s de duração com incrementos de +10 pA de 300 pA até -100 pA. Uma segunda corrente despolarizante foi injetada 4 s depois do início da primeira injeção de corrente. A τ_m para cada potencial de membrana foi medida fazendo um ajuste de uma função exponencial simples na subida inicial da resposta de voltagem para uma injeção de corrente pequena (+10 pA). Nas simulações de I_{NaP} , o ajuste foi feito nos primeiros 50 ms da subida inicial da voltagem. Já que nas simulações com I_h aparece um *sag*, nesse caso o ajuste foi feito na subida inicial da voltagem até que o valor máximo foi atingido (Figura 3.6 A, B).

Com o intuito de determinar o efeito da cinética da I_h na amplitude e duração do EPSP, um EPSC artificial (aEPSC) foi injetado em diferentes potenciais de membrana obtidos como descrito acima, injetando pulsos de corrente de 1 s de duração. O aEPSC foi injetado 1 s depois do início da primeira injeção de corrente. O aEPSC foi construído usando uma função alfa definida como: $I = -100g_{syn}(t/\tau)e^{-(t-\tau)/\tau}V$, onde $g_{syn} = 1$ nS e $\tau = 5$ ms. O valor de g_{syn} foi escolhido a fim de obter um aEPSP de aproximadamente 5 mV no potencial de membrana de -90 mV (Figura 3.6 C). Os dados foram analisados usando algoritmos em MATLAB.

3.8 Estatística

Nos experimentos com as FUS, a R_{in} foi submetida a um teste de normalidade (D'Agostino e Pearson) e já que não apresentou uma distribuição normal ($p < 0,0001$, $n=120$), os dados foram analisados usando testes não-paramétricos (Mann-Whitney). Os outros parâmetros tiveram menos dados do que os necessários para realizar testes de normalidade ($\ll 100$) e então foram tratados como distribuições normais e as suas médias foram comparadas com testes t pareados e não pareados. Porém, a comparação dos dados usando ambos os testes paramétricos ou não-paramétricos não afetou nossas conclusões. Comparações múltiplas foram realizadas com ANOVA de uma via e o teste de comparação múltipla de Tukey. O nível de significância foi estabelecido em 0,05. Correlações foram determinadas usando um ajuste de regressão linear. As análises estatísticas foram realizadas

Figura 3.6: *Curvas VI representativas obtidas de simulações de modelos de neurônio com uma corrente de vazamento e uma I_{NaP} (A) ou I_h (B e C). Note que no final dos registros foi injetada uma corrente despolarizante (A e B) ou um aEPSC (C).*

usando GraphPad Prism.

Nos experimentos com as PYR, os dados foram analisados usando rotinas escritas em Igor Pro (WAVEMETRICS, Portland, OR) e MATLAB (THE MATHWORKS, Natick, MA). Os dados foram apresentados como média $\pm$ EPM. A diferença entre as médias foi comparada estatisticamente usando ANOVA de uma via de medidas repetidas, ANOVA de duas vias de medidas repetidas e ajuste de regressão linear GraphPad Prism (GRAPHPAD SOFTWARE, La Jolla, CA). O nível de significância foi estabelecido em 0,05.

RESULTADOS

4.1 A corrente I_h contrabalança a resistência de entrada

4.1.1 Neurônios ativos e silenciosos têm resistências de entrada similares

Sabe-se que as FUS silenciosas apresentam uma expressão aumentada da I_{KIR} , o que produziria uma R_{in} menor quando comparado com a R_{in} das FUS ativas. Porém, observamos que ambas, tanto as FUS ativas quanto as silenciosas apresentam R_{in} similares quando R_{in} é medida tanto no modo de *current-clamp* (silenciosa: $77,8 \pm 8M\Omega$; ativa: $89,1 \pm 9M\Omega$; $p = 0,36$; $n = 37$ e 36 respectivamente. Figura 4.1 B,C) quanto no modo de *voltage-clamp* (silenciosa: $95 \pm 12M\Omega$; ativa: $77,1 \pm 10M\Omega$. $p = 0,09$, $n = 21$ e 26 respectivamente) sugerindo a presença de condutâncias compensadoras expressas em quantidade diferente que mantêm a R_{in} constante entre as FUS silenciosas e ativas.

4.1.2 Neurônios ativos expressam uma I_h maior

Consistente com essa hipótese, encontramos que as FUS ativas apresentam um *sag* maior (pico do *sag*: $-2,9 \pm 0,5$ mV, silenciosa; $-6,2 \pm 0,8$ mV, ativa. $p < 0,01$; $n = 15$ cada um. Figura 4.1 D), o que sugere a presença de uma I_h maior nas FUS ativas que normaliza a R_{in} de ambos os tipos de neurônio. Com o intuito de testar essa hipótese, medimos a I_h nas FUS ativas e silenciosas para comparar essa condutância entre ambos os tipos neuronais. Em concordância com a presença de uma I_h , observamos uma corrente de entrada de cinética lenta com a aplicação

Figura 4.1: A resistência de entrada da membrana é similar entre neurônios fusiformes silenciosos e ativos. **A.** Exemplo de uma resposta de um neurônio fusiforme a hiperpolarizações. A seta grossa assinala o ponto onde foi medido o potencial de membrana usado para calcular a resistência de entrada da membrana. As setas finas mostram os potenciais de membrana no estado estacionário usados para calcular o sag. **B.** Gráfico mostrando a resposta do potencial da membrana no estado estacionário quando uma corrente negativa DC foi injetada nos neurônios fusiformes silenciosos ($n=16$) e ativos ($n=14$). **C.** Valores das resistências de entrada da membrana obtidos pela regressão linear dos dados em B. **D.** Gráfico mostrando a dependência da amplitude do sag com a corrente injetada ($n=15$ cada um).

de hiperpolarizações sucessivas que atingiam o estado estacionário em 3 segundos (Figura 4.2 A).

A relação corrente-voltagem (IV) da I_h de ambas as FUS ativas e silenciosas é mostrada na Figura 4.2 B, a qual mostra que a I_h em ambos os neurônios tem uma relação IV similar. Usando as correntes de cauda, calculamos as curvas de ativação da I_h e observamos que apresentam parâmetros similares (FUS silenciosas têm uma $V_{1/2}$ de $-86,7 \pm 4,6$ mV e uma inclinação de $8,2 \pm 4$ enquanto a I_h de FUS ativas

tem uma $V_{1/2}$ de $-81,5 \pm 5$ mV e uma inclinação de $7,1 \pm 4$, $p=0,98$). Também calculamos as constantes de tempo de ativação e desativação (rápida e lenta) da I_h de FUS silenciosas e ativas entre -100 e -120 mV.

Já que não observamos diferenças entre as constantes de tempos nesses potenciais, juntamos esses resultados. Exceto para a componente da ativação rápida, nenhum dos outros parâmetros foi significativamente diferente entre as FUS silenciosas e ativas (Tabela 4.1). As FUS ativas apresentaram uma condutância de inclinação maior para a I_h (medida entre -75 e -100 mV) do que as FUS silenciosas (silenciosas: $5,0 \pm 0,5$ nS; ativas: $6,9 \pm 0,5$ nS; $p = 0,02$, teste t não pareado, $n = 17$ e 18 respectivamente; figura 4.2 D). Nossos dados mostraram que, na média, as FUS ativas expressam uma I_h maior do que as silenciosas.

	τ_{at} rápida (ms)	τ_{at} lenta (ms)	τ_{des} rápida (ms)	τ_{des} lenta (ms)
Silenciosos	279 ± 29 (9)	1877 ± 333 (9)	226 ± 29 (9)	1163 ± 154 (9)
Ativos	185 ± 29 (8)	1440 ± 265 (8)	194 ± 34 (6)	1464 ± 354 (6)

Tabela 4.1: Constantes de tempo de ativação τ_{at} e desativação τ_{des} da I_h de neurônios silenciosos e ativos. $*p < 0.05$, teste t não pareado (comparado com os neurônios ativos).

Já foi mostrado que a g_{KIR} se correlaciona positivamente com o PMR dos neurônios fusiformes, em concordância com seu papel principal na regulação do potencial de membrana [Ceballos et al. 2016]. Se a g_h é usada como condutância compensadora da R_{in} aumentada pelo menor g_{KIR} das FUS ativas, então é possível que essa condutância possa se correlacionar com a R_{in} desses neurônios. De fato, quando fizemos a correlação entre a g_h e a R_{in} em FUS silenciosas e ativas, encontramos que a g_h se correlaciona positivamente somente nos neurônios ativos (silenciosos: $r^2 = 0,01$, $p=0,77$; ativos: $r^2 = 0,46$, $p=0,02$; Figura 4.2 E). Esses resultados mostraram que em FUS ativas as variações da g_h contrabalançam a diferença da R_{in} produzida pela expressão menor da g_{KIR} .

4.1.3 Neurônios ativos são mais sensíveis a mudanças da g_h

A sensibilidade maior da R_{in} das FUS ativas ao bloqueio com ZD7288 sugere que elas são mais sensíveis às mudanças da I_h do que as FUS silenciosas [Ceballos et

Figura 4.2: I_h em neurônios fusiformes do NCD. A. Exemplo das correntes ativadas pela hiperpolarização da membrana. A I_h foi estimada como a diferença entre o início e o estado estacionário da corrente. B. Relação corrente-voltagem da I_h em neurônios fusiformes silenciosos e ativos. C. Valores das condutâncias de inclinação da I_h em neurônios fusiformes silenciosos e ativos. * $p < 0,05$. D. Correlação da resistência de entrada da membrana com a g_h dos neurônios silenciosos e ativos.

al. 2016]. Se isso for verdade, a R_{in} das FUS ativas seria mais sensível a aumentos da I_h do que as FUS silenciosas. Para testar essa hipótese mais diretamente, dobramos a

g_h injetando uma g_h artificial (5 nS) em ambas as FUS ativas e silenciosas e medimos a R_{in} antes e depois do aumento artificial da g_h . Encontramos uma diminuição significativa da R_{in} em FUS ativas (Fig 4.3 B. $p=0,0004$, teste de Wilcoxon pareado; $n = 7$) enquanto não foi afetada a R_{in} em FUS silenciosas (Fig. 4.3 B. $p=0,16$, teste de Wilcoxon pareado; $n=7$). Nenhuma mudança na R_{in} foi observada quando a medimos no começo dos pulsos hiperpolarizantes (Figura 4.3 D), de acordo com o esperado para um efeito produzido pela I_h .

Então, testamos até onde a injeção de g_h artificiais com maiores valores poderia afetar a R_{in} das FUS silenciosas e ativas. Curiosamente, dobrando a g_h para 10 nS, foi eficaz em diminuir a R_{in} nas FUS silenciosas (Figura 4.3 E). Quando normalizamos as R_{in} e examinamos os efeitos do aumento da g_h , encontramos que a queda da R_{in} foi similar tanto para FUS ativas quanto para as silenciosas para valores de g_h acima de 10 nS (Figura 4.3 E), atingindo valores próximos de 70% do valor original para 40 nS de g_h . Interessantemente, a injeção de 40 nS de uma g_h artificial em FUS silenciosas produziu uma pequena despolarização do potencial da membrana (de $-58,7 \pm 2$ mV para $-54,2 \pm 1$ mV. $P<0,05$, teste t pareado; $n=7$), porém não gerou disparos espontâneos, mostrando que a I_h não é eficaz para despolarizar a membrana em valores suficientes para produzir o disparo espontâneo característico das FUS ativas.

Concluimos que a R_{in} de FUS ativas é muito sensível à adição de 5 nS de g_h , o que dobra a g_h , enquanto esse mesmo valor não afeta significativamente a R_{in} de FUS silenciosas. Por outro lado, as R_{in} das FUS silenciosas e ativas são igualmente sensíveis a aplicações de g_h artificiais maiores.

4.1.4 Modelo computacional, potencial de membrana de repouso e resistência de entrada

Com o intuito de entender como as variações correlacionadas das correntes sublimiáres afetam as propriedades de membrana sublimiáres e a transição do estado silencioso para o ativo, usamos um modelo computacional contendo as principais condutâncias sublimiáres identificadas (g_{KIR} , g_h , g_{leak}) da célula fusiforme (Figura 4.4 A). Primeiro comparamos como as mudanças da g_h e da g_{KIR} em nosso modelo influenciam o PMR (Figura 4.4 B). Claramente, o PMR é muito mais sensível para

Figura 4.3: A injeção de uma g_h artificial afeta diferentemente a resistência de entrada da membrana de neurônios fusiformes silenciosos e ativos do NCD. A. Exemplo do efeito da injeção de uma g_h artificial de 5 nS na resposta de uma corrente hiperpolarizante. B. Efeito da injeção de uma g_h artificial de 5 nS na resistência de entrada da membrana de neurônios ativos. * = $p < 0,05$. C. Efeito da injeção de uma g_h artificial de 5 nS na resistência de entrada da membrana de neurônios silenciosos. D. Efeito da injeção de uma g_h artificial de 5 nS na resistência de entrada imediata da membrana de neurônios fusiformes ativos e silenciosos. E. Efeito da injeção de uma g_h artificial de valores crescentes na resistência de entrada da membrana normalizada de neurônios ativos e silenciosos ($n=7$ cada um).

mudanças da g_{KIR} do que mudanças da g_h . Por exemplo, para um dado valor da g_h ($0,5 \text{ mS/cm}^2$), o PMR muda de $-52,1$ para $-63,4 \text{ mV}$ quando o g_{KIR} muda de 0 a 1 mS/cm^2 , enquanto mudando a g_h na mesma quantidade somente muda o PMR de $-58,5$ para $-55,6 \text{ mV}$ para um g_{KIR} de $0,5 \text{ mS/cm}^2$.

Também podemos observar, em concordância com seu efeito no PMR, que a g_{KIR} afeta fortemente a transição do estado silencioso ao ativo (linha azul), ao contrário do efeito da g_h . Curiosamente, pode ser visto que o impacto da g_h no PMR é maior nos neurônios silenciosos do que nos ativos (compare a área abaixo e acima da linha azul), o que difere com o que foi observado experimentalmente pela inibição da I_h com ZD7288 [Ceballos et al. 2016]. Na Figura 4.4 C analisamos as variações da g_{leak} e da g_h (fixando a g_{KIR} em $0,5 \text{ mS/cm}^2$). Mais uma vez, as variações da

g_h foram pouco eficazes em afetar o PMR quando comparadas com as variações da g_{leak} , especialmente em neurônios ativos (região acima da linha azul, com valores maiores da g_{leak}). Finalmente, comparamos o impacto da variação da g_{leak} e g_{KIR} no PMR na transição silencioso-ativo (Figura 4.4 D). Observamos que enquanto o aumento da g_{KIR} hiperpolariza o PMR, a g_{leak} é mais eficaz em despolarizar o PMR, pois foi necessário cerca de 4 a 5 vezes mais g_{KIR} para contrabalançar os efeitos da g_{leak} e produzir um neurônio silencioso (acima de linha azul).

Figura 4.4: A I_{KIR} afeta o PMR mais do que a I_h em um modelo de neurônio fusiforme. A. Exemplo da resposta do modelo de neurônio à despolarização e hiperpolarização. B. Diagrama de condutâncias da g_h versus g_{KIR} afetando o PMR (codificado por cores). C. g_{leak} versus g_h . D. g_{KIR} versus g_{leak} . A linha azul representa a transição do estado silencioso (acima) para o estado ativo (abaixo).

Nosso modelo mostrou que a g_{leak} tem um forte efeito despolarizante no PMR. Com o intuito de avaliar a interação do potencial de reversão da corrente de vazamento com a sua condutância (E_{rev} versus g_{leak}) e o seu efeito no PMR, variamos ambas a condutância e o potencial de reversão da g_{leak} fixando a g_{KIR}

em valores típicos de um neurônio ativo e silencioso. A Figura 4.5 mostra que somente para valores do potencial de reversão acima de -50 mV foi possível atingir os valores do limiar de atividade estabelecido pela I_{NaP} (-59/-57 mV). Também para valores de E_{rev} abaixo de -65 mV, o PMR se tornou praticamente insensível às variações da g_{leak} , especialmente em neurônios silenciosos. Mesmo que uma I_{KIR} maior reduza o impacto da g_{leak} na despolarização do PMR (tal como é visto em neurônios silenciosos), isso não previne o seu efeito na geração do disparo espontâneo para altos valores da g_{leak} (Figura 4.5 B). Concluimos que a presença de uma componente de sódio que despolariza o potencial de reversão da g_{leak} é fundamental para a despolarização da membrana que permite a existência de disparo espontâneo nas FUS.

Figura 4.5: Espaço de parâmetros da condutância de vazamento versus o seu potencial de reversão afetando o PMR (codificado por cores), usando valores de g_{KIR} típicos de um neurônio ativo (esquerda) e silencioso (direita). A linha azul representa a transição dos modos de disparo de silencioso (abaixo) para ativo (acima).

Finalmente, estudamos a relação das variações da g_h e da g_{KIR} na R_{in} . O modelo mostrou que de forma similar ao observado experimentalmente, para uma maior g_{KIR} menor é o efeito da g_h na R_{in} (Figura 4.6 B). A Figura 4.6 C mostra a relação da R_{in} e a g_h em duas situações: primeiro com um baixo valor da g_{KIR} , típico de neurônios ativos, e segundo, com um alto valor da g_{KIR} , típico de neurônios silenciosos. Em concordância com o observado experimentalmente, g_h tem um impacto maior na R_{in} no modelo do neurônio ativo do que no modelo de neurônio silencioso.

Observamos em nossos experimentos um *sag* menor depois da hiperpolarização em neurônios silenciosos do que em ativos. Isso poderia ter sido causado por uma redução da g_h nos neurônios silenciosos, mas devido a que as diferenças na g_h observadas entre os neurônios silenciosos e ativos não foi muito grande, decidimos testar se a g_{KIR} maior dos neurônios silenciosos diminui o *sag* nesse neurônios. De fato, nosso modelo mostrou que a influencia da g_h em produzir o *sag* diminui quando a g_{KIR} é maior (Figura 4.6 C,D,E). Nossos dados computacionais e experimentais mostraram que a interação entre a g_h e g_{KIR} não somente controla a R_{in} , mas também afeta respostas dinâmicas da membrana durante hiperpolarizações (e.g. o *sag*).

Figura 4.6: Influencia da g_{KIR} no impacto da g_h na resistência de entrada da membrana em respostas a hiperpolarizações. A. Exemplo da resposta dos modelos de neurônios fusiforme silencioso e ativo a hiperpolarizações sucessivas. B. Diagrama de condutâncias da g_h versus g_{KIR} afetando a resistência de entrada da membrana (codificado por cores). C. Dois exemplos mostrando o efeito do aumento da g_h na resistência de entrada da membrana em dois modelos: um com valor de g_{KIR} típico de neurônios silenciosos (vermelho) e outro com valor de g_{KIR} típico de neurônios ativos (azul). D. Diagrama de condutâncias da g_h versus g_{KIR} afetando o sag (codificado por cores). E. Dois exemplos mostrando o efeito do aumento da g_h no sag em dois modelos: um com valor de g_{KIR} típico de neurônios silenciosos (vermelho) e outro com valor de g_{KIR} típico de neurônios ativos (azul).

4.2 A condutância negativa prolonga as depolarizações sublimiaries

4.2.1 Condutância de inclinação G_{NaP}

Derivando a equação da corrente para I_{NaP} (Eq. 3.6), obtemos a sua condutância de inclinação, G_{NaP} :

$$G_{NaP}(V_{ss}) = \frac{dI_{NaP}}{dV_{ss}} = \bar{g}_{NaP}A_{NaP}^{\infty}(V_{ss}) + \bar{g}_{NaP}(V - E_{Na})\frac{dA_{NaP}^{\infty}}{dV_{ss}}. \quad (4.1)$$

A Eq. 4.1 é composta pela soma de dois termos: o primeiro é a chamada condutância de corda, enquanto o segundo representa a mudança da corrente que acontece devido à dependência com a voltagem da variável de ativação, e é chamada de condutância diferencial [Koch 1998]. A condutância de corda, que representaremos como g_{NaP} é sempre positiva, enquanto a condutância diferencial, que representaremos como G_{NaP}^{Der} pode ser positiva ou negativa [Koch 1998]. Com essas definições, reescrevemos a Eq. 4.1 como:

$$G_{NaP} = g_{NaP} + G_{NaP}^{Der}, \quad (4.2)$$

4.2.2 G_{NaP} aumenta a constante de tempo da membrana

Primeiro mostraremos como uma corrente de vazamento ôhmica mais uma I_{NaP} determinam a R_{in} e τ_m . A I_{NaP} tem uma cinética de ativação rápida quando comparada com a cinética da membrana τ_m , i.e., $\tau_{NaP} \ll \tau_m$. Devido a que a ativação da I_{NaP} tem uma cinética muito rápida [Carter et al. 2012], a sua condutância de inclinação no estado estacionário (G_{NaP}) se iguala à sua condutância de inclinação instantânea. Então, é possível reescrever a Eq. 3.6 como uma corrente linear com uma condutância de inclinação igual a G_{NaP} (veja a Fig 4.7 A):

$$I_{NaP} = G_{NaP}(V - E'_{Na}), \quad (4.3)$$

onde o potencial de reversão E'_{Na} é agora dependente da voltagem, i.e., $E'_{Na} = E'_{Na}(V)$. Porém, se uma corrente pequena δI é injetada, suficientemente pequena para ser assumido que $G_{NaP}(V) = G_{NaP}(V_{ini})$ e $E'_{Na}(V) = E'_{Na}(V_{ini})$, i.e. ambas

as G_{NaP} e E'_{Na} não mudam e são independentes do potencial de membrana e do tempo, essa equação pode ser escrita como:

$$I_{NaP} = G_{NaP}(V_{ini})(V - E'_{Na}(V_{ini})). \quad (4.4)$$

Então, a I_{NaP} se comporta como uma corrente linear e ôhmica para uma injeção de corrente muito pequena δI , e agora a sua condutância de corda é equivalente a G_{NaP} . Nesse caso, a soma das condutâncias passivas é igual à condutância de entrada da membrana tal como na Eq. 3.5:

$$G_T = G_{NaP} + \bar{g}_L. \quad (4.5)$$

Portanto, a contribuição da I_{NaP} na τ_m é através da sua condutância de inclinação G_{NaP} . Isso significa que a condutância de inclinação negativa da I_{NaP} aumenta a τ_m através da diminuição da G_T , enquanto a corrente linear diminui a τ_m através do aumento da G_T .

Fizemos simulações computacionais de um modelo de neurônio contendo uma corrente linear e uma I_{NaP} tal como na Eq. 3.6 (Fig. 4.7). A resposta do neurônio à injeção de uma corrente constante e pequena depende do potencial de membrana inicial, se tornando maior e mais lenta em potenciais de membrana despolarizados (Fig. 4.7 B,C). Então, na presença de uma I_{NaP} , a R_{in} e τ_m são dependentes de voltagem e aumentam com a despolarização (Fig. 4.7 D,E). Mesmo que a R_{in} e τ_m sejam dependentes de voltagem, elas se mantêm correlacionadas numa ampla faixa de voltagens, tal como aconteceria para o caso de uma membrana puramente passiva onde $\tau_m = C_m R_{in}$. Nosso modelo mostrou que essa relação também é válida para uma membrana que contém uma I_{NaP} .

4.2.3 Uma I_{NaP} rápida é necessária para amplificar o EPSP

Em seguida, exploramos como a cinética de ativação da I_{NaP} se relaciona com seus efeitos na amplitude e no curso temporal dos EPSPs. Para isso, realizamos simulações computacionais das respostas à estimulação sináptica usando modelos com cinética de ativação/desativação rápida ($\tau_{NaP} = 0,1$ ms) ou lenta ($\tau_{NaP} = 100$ ms). A Fig. 4.8 A mostra um exemplo de EPSPs produzidos por correntes

Figura 4.7: Simulações computacionais da dependência da voltagem da R_{in} e τ_m . A. Aproximação de uma curva I-V da I_{NaP} (preto) usando uma condutância negativa e linear (cinza) na região limitada pelas linhas tracejadas. B. Dependência da voltagem das mudanças do potencial de membrana em resposta a correntes de 10 pA. C. Dependência da voltagem do tempo de subida das respostas em B. As amplitudes estão normalizadas pela máxima resposta. D. Dependência da voltagem da R_{in} . E. Dependência da voltagem da τ_m . F. Coeficiente de correlação de Pearson de τ_m e R_{in} . $R^2 = 1$.

triangulares na ausência e na presença de I_{NaP} . Para ambas as I_{NaP} rápida e lenta, o decaimento do EPSP foi prolongado quando comparado com um modelo sem I_{NaP} , porém a amplificação foi maior com a I_{NaP} rápida. Na presença da I_{NaP} rápida, a amplitude do EPSP aumenta com a despolarização do potencial de membrana (Fig. 4.8 B). Ao contrário, na presença da I_{NaP} lenta, a amplitude do EPSP diminui sutilmente com a despolarização do potencial de membrana (Fig. 4.8 C). A I_{NaP} com os valores reais de ativação e desativação [Carter et al. 2012] ($\tau_{NaP} = 0.1$ ms) aumentou a área normalizada do EPSP de uma maneira dependente da voltagem (Fig. 4.8 D). Esse efeito foi menos pronunciado com a I_{NaP} com uma ativação/desativação mais lenta ($\tau_{NaP} = 100$ ms; Fig. 4.8 D). Essas simulações mostraram que ambas as I_{NaP} (lenta e rápida) amplificam e prolongam os EPSPs, e que uma ativação rápida é essencial para a amplificação e prolongamento dos EPSPs.

Figura 4.8: A. Exemplos representativos de EPSPs obtidos de simulações computacionais para I_{NaP} com ativação rápida ($\tau_{NaP} = 0,1$ ms) e com ativação lenta ($\tau_{NaP} = 100$ ms). $V = -67$ mV. aEPSC foi desenhado abaixo do traçado. B. Amplitude dos EPSPs para um modelo contendo somente uma corrente linear (sem I_{NaP}) ou um modelo contendo uma corrente linear junto com uma I_{NaP} de ativação rápida ($\tau_{NaP} = 0,1$ ms) para diferentes potenciais de membrana. C. Igual que em B, exceto que o modelo usado tinha I_{NaP} de ativação lenta ($\tau_{NaP} = 100$ ms). Inset. Zoom do gráfico. Tamanho da barra: vertical 0,005 mV, horizontal 5 mV. D. Área normalizada pela amplitude dos EPSPs para um modelo contendo somente uma corrente linear (sem I_{NaP}) ou um modelo contendo uma corrente linear junto com uma I_{NaP} de ativação rápida ou lenta ($\tau_{NaP} = 0,1$ ou 100 ms, respectivamente).

4.2.4 A componente diferencial da G_{NaP} é a componente predominante

A condutância de inclinação é negativa quando a condutância diferencial é também negativa e com maior magnitude do que a condutância de corda, a qual é positiva. Então, claramente na região de condutância de inclinação negativa da I_{NaP} , a condutância diferencial (G_{NaP}^{Der}) é maior em magnitude do que a condutância de corda (g_{NaP}) (veja a Eq. 3.9), porém se desconhece em neurônios reais a magnitude das contribuições de cada componente na condutância de inclinação da I_{NaP} (G_{NaP}) e quão predominante poderia ser a G_{NaP}^{Der} . Então, analisamos experimentalmente as

contribuições de ambos os fatores que contribuem na I_{NaP} nas PYR.

A seguir, determinamos a contribuição relativa da condutância de corda (g_{NaP}) e da condutância diferencial (G_{NaP}^{Der}) na condutância total da I_{NaP} . As PYR expressam I_{NaP} e essa corrente produz uma região de condutância de inclinação negativa [Yamada-Hanff e Bean 2015, French et al. 1990, Carter et al. 2012]. A aplicação de uma rampa lenta (15 mV/s) produziu uma corrente de entrada que começou a se desenvolver em aproximadamente -85 mV e atingiu o pico próximo de -40 mV (Fig. 4.9 A). Essa corrente foi abolida com TTX (100 nM; Fig. 4.9 A) e a corrente sensível a TTX tinha um pico de -537 ± 42 pA no potencial de membrana de -40 mV. Assumindo um potencial de reversão do sódio calculado de $E_{Na} = 70$ mV, calculamos a condutância de corda da I_{NaP} (g_{NaP}) como $4,9 \pm 0,4$ nS em -40 mV. A I_{NaP} tinha um potencial de meia-ativação ($V_{1/2}$) de $-55,6 \pm 0,9$ mV e um fator de inclinação (k) de $6,2 \pm 0,4$ mV ($n = 10$, Fig. 4.9 A), em concordância com trabalhos anteriores [Yamada-Hanff e Bean 2015, Carter et al. 2012].

Medimos então a condutância de inclinação G_{NaP} usando a primeira derivada da corrente (dI/dV) e, conforme esperado, encontramos que G_{NaP} é negativa e dependente de voltagem, aumentando a magnitude com a despolarização ($p = 0,0008$; ANOVA de uma via de medidas repetidas; Fig. 4.9 B). Por outro lado, a condutância de corda g_{NaP} é também dependente da voltagem, mas positiva e 10 vezes menor do que a G_{NaP} ($p = 0,0045$; ANOVA de uma via de medidas repetidas; Fig. 4.9 C). Quando calculamos a condutância diferencial G_{NaP}^{Der} , usando a Eq. 3.9, encontramos que ela é muito similar à G_{NaP} , com magnitude similar, negativa e dependente de voltagem ($p = 0,0003$; ANOVA de uma via de medidas repetidas) (Fig. 4.9 D). A Fig. 4.9 E mostra os valores absolutos de G_{NaP} , g_{NaP} e G_{NaP}^{Der} para diferentes potenciais da membrana, mostrando que a maior contribuição da G_{NaP} é devida à G_{NaP}^{Der} .

4.2.5 A G_{NaP} é suficiente para aumentar a R_{in}

Investigamos o papel da condutância de inclinação negativa da I_{NaP} na R_{in} das PYR. Em concordância com as nossas previsões teóricas e com trabalhos anteriores [Yamada-Hanff e Bean 2015, Economo, Martinez e White 2014], observamos que a R_{in} é dependente de voltagem e a TTX (100 nM)

Figura 4.9: A. Curva I-V média da I_{NaP} ($n = 10$) obtida pela subtração das correntes geradas por um comando de rampa lento com aCSF controle (preto) e durante a perfusão com TTX (100 nM) (cinza). Inset. Traçados representativos de correntes. Tamanho da barra: vertical 200 pA, horizontal 1 s. B. Condutância de inclinação da I_{NaP} (G_{NaP}) obtida das curvas I-V em A ($n = 9$). C. Condutância de corda da I_{NaP} (g_{NaP}) ($n = 10$). D. Condutância diferencial da I_{NaP} (G_{NaP}^{Der}) obtida da subtração de g_{NaP} da G_{NaP} ($n = 9$). E. Valores absolutos de G_{NaP} , g_{NaP} e G_{NaP}^{Der} .

significativamente diminui essa dependência, mostrando o papel da I_{NaP} nela (Fig. 4.10 A, $p < 0,0001$, ANOVA de duas vias de medidas repetidas, $n = 6$). Já que o PMR foi $-78,3 \pm 1,1$ mV, esses resultados mostram que o efeito da I_{NaP} na R_{in} é forte para potenciais de membrana acima do PMR. Para demonstrar que a TTX diminui a R_{in} através da inibição da condutância de inclinação negativa da I_{NaP} , fizemos experimentos com TTX e simultaneamente aplicamos uma I_{NaP} artificial (aI_{NaP}) usando um sistema de *dynamic-clamp*. A Fig. 4.10 A mostra que a aI_{NaP} restaura grande parte da dependência com a voltagem da R_{in} depois da TTX (ANOVA de duas vias de medidas repetidas, $n = 6$), aumentando a R_{in} em potenciais de membrana mais positivos (-75 mV, teste de comparação múltipla de Tukey).

Para confirmar que a capacidade da I_{NaP} para aumentar a R_{in} está

relacionada com a sua condutância negativa, injetamos uma condutância negativa ou positiva usando o sistema de *dynamic-clamp*. Nesses experimentos, a corrente com condutância positiva foi usada para reproduzir a g_{NaP} (ag_{NaP}) enquanto a corrente com condutância negativa foi usada para reproduzir a G_{NaP} (aG_{NaP}) (Fig. 4.10 B). Observamos que a aG_{NaP} foi capaz de restaurar os valores altos da R_{in} associados com a presença da I_{NaP} (TTX vs aG_{NaP} , ANOVA de duas vias de medidas repetidas, $n = 9$; Fig. 4.10 C). Por outro lado, a ag_{NaP} não mudou a R_{in} (Fig. 4.10 D). Quando comparamos os valores das correntes na faixa de voltagem entre -80 e -70 mV para a aG_{NaP} , ag_{NaP} e aI_{NaP} usadas nesses experimentos (Fig. 4.10 B, direita), vale a pena notar que a corrente resultante da ag_{NaP} foi maior do que a corrente resultante da aG_{NaP} e aI_{NaP} , mostrando que o efeito observado na R_{in} reflete a taxa de mudança das correntes (i.e. a condutância de inclinação) e não os valores absolutos (i.e. correntes instantâneas).

4.2.6 Constante de tempo da membrana

Já tendo determinado que a condutância de inclinação negativa da I_{NaP} é a responsável pelo aumento da R_{in} , exploramos qual componente da I_{NaP} é responsável pelo prolongamento da τ_m . Em concordância com as nossas previsões teóricas e com o que foi observado previamente [Yamada-Hanff e Bean 2015], observamos que a τ_m é dependente de voltagem e aumenta com a despolarização, um efeito abolido com a aplicação de TTX (Fig. 4.11 A, B, ANOVA de duas vias de medidas repetidas, $n = 11$). Igualmente ao observado com a R_{in} , a aplicação de TTX diminui a τ_m significativamente em potenciais mais despolarizados (-75 mV, $p < 0,05$ teste de comparação múltipla de Sidak). Testamos então se a aplicação da aG_{NaP} aumentaria a τ_m na presença de TTX. A Fig. 4.11 C mostra que a aG_{NaP} aumenta a τ_m para valores similares àqueles medidos sem TTX em -75 mV (ANOVA de duas vias de medidas repetidas, $n = 10$; Fig. 4.11 C). Ao contrário, a ag_{NaP} não mudou a τ_m (Fig. 4.11 D, ANOVA de duas vias de medidas repetidas, $n = 11$). Do mesmo modo, tal como foi discutido anteriormente com a R_{in} , a aG_{NaP} e não a ag_{NaP} foi eficaz em influenciar a τ_m , mostrando que a τ_m reflete a taxa de mudança das correntes (i.e. a condutância de inclinação) e não os valores absolutos (i.e. correntes instantâneas).

Figura 4.10: A. Dependência da voltagem da R_{in} antes (Ctrl) e depois da aplicação de TTX e durante a aplicação de uma aI_{NaP} na presença de TTX ($n = 6$). B. Curvas I-V da aI_{NaP} , aG_{NaP} e aI_{NaP} (esquerda). Gráfico expandido focando na região do potencial de membrana na qual a aG_{NaP} foi aplicada ($-80 \text{ mV} < V_m < -70 \text{ mV}$) (direita). Note-se que todas as três correntes são despolarizantes. C. Dependência da voltagem da R_{in} na presença de TTX, antes (TTX) e depois da aplicação da aG_{NaP} ($n = 9$). D. Dependência da voltagem da R_{in} na presença de TTX, antes (TTX) e depois de aplicação da aI_{NaP} ($n = 8$).

Tal como foi discutido acima, a relação $\tau_m = CR_{in}$ é válida para uma membrana passiva. Nossa modelagem sugere que a mesma relação é também válida na presença de uma I_{NaP} , a qual dá uma dependência com a voltagem para a R_{in} e τ_m . Com o intuito de validar nossa modelagem em uma célula real, calculamos o coeficiente de correlação de Pearson entre os valores da R_{in} e τ_m para todos os potenciais de membrana para o grupo controle e observamos uma correlação positiva entre eles ($p < 0.0001$, $R^2 = 0,556$, $n = 12$ neurônios). Além disso, a inclinação da linha obtida pela regressão linear foi 196 pF, o que está em concordância com medidas experimentais da capacitância das PYR [Tamagnini et al. 2015].

Figura 4.11: A. Parte superior, respostas de voltagem do mesmo neurônio a uma corrente injetada antes (controle) e depois da aplicação de TTX. Parte inferior, os mesmos traçados normalizados. A corrente injetada foi 20 pA. B. Dependência da voltagem da τ_m antes (controle) e depois de TTX ($n = 11$). C. Dependência da voltagem da τ_m na presença de TTX, antes (TTX) e depois da aplicação da aG_{NaP} . ($n = 10$). D. Dependência da voltagem da τ_m na presença de TTX, antes (TTX) e depois da aplicação da ag_{NaP} . ($n = 11$). E. Gráfico de dispersão entre a R_{in} vs τ_m para o grupo controle para todos os potenciais de membrana. A linha reta é o ajuste da regressão linear.

4.2.7 A G_{NaP} amplifica os EPSPs

Com o intuito de avaliar o efeito da I_{NaP} e das suas componentes de condutância de corda e de inclinação nas mudanças rápidas do potencial de membrana similares às observadas em potenciais sinápticos, aplicamos EPSCs artificiais (aEPSCs; veja os Métodos) com o objetivo de produzir EPSPs artificiais (aEPSPs). Testamos se a I_{NaP} poderia aumentar a amplitude e o decaimento de um aEPSP medindo a amplitude e a área do aEPSP em diferentes potenciais de membrana antes e depois da aplicação de TTX. A amplitude do aEPSP foi pouco sensível à despolarização, aumentando somente 5% na faixa de voltagem entre -85 mV e -70 mV, porém a aplicação de TTX aboliu essa dependência com a voltagem

mostrando que esse efeito pequeno é produzido provavelmente pela I_{NaP} .

Porém, encontramos que a duração dos aEPSPs (medida como a área normalizada pela amplitude do aEPSP) foi mais sensível à despolarização, aumentando em até 20% na faixa de voltagem entre -85 mV e -70 mV (Fig. 4.12 A,B). A aplicação de TTX aboliu essa dependência com a voltagem confirmando o papel da I_{NaP} na amplificação dos aEPSPs (ANOVA de duas vias de medidas repetidas, $n = 8$; Fig. 4.12 A,B). Então, decidimos comparar a área dos aEPSPs ao invés da sua amplitude.

Testamos se o prolongamento do aEPSP pela I_{NaP} foi causado por sua condutância de inclinação negativa G_{NaP} . Para isso aplicamos uma G_{NaP} artificial na presença de TTX. Como pode ser visto na Fig. 4.12 C,B, a injeção da aG_{NaP} aumenta a área normalizada pela amplitude do aEPSP em 15% de uma maneira independente da voltagem (ANOVA de duas vias de medidas repetidas, $n = 9$). A área normalizada do aEPSP com TTX e depois da aG_{NaP} foi similar àquela observada na condição controle em potenciais próximos de -70/-75 mV, ou seja, um potencial de membrana próximo do qual a I_{NaP} começa a ser ativada. Esses resultados sugerem fortemente que a amplificação de EPSPs pela I_{NaP} é principalmente mediada pela condutância de inclinação negativa.

Nosso modelo mostrou que uma I_{NaP} com uma cinética de ativação/desativação rápida é mais eficaz em amplificar os EPSPs. Com o intuito de testar essa observação teórica, comparamos o efeito de duas I_{NaP} artificiais, uma com constante de tempo de ativação/desativação rápida (2 ms) e outra lenta (100 ms), na duração do aEPSP ($n = 4$ neurônios). Encontramos que somente a I_{NaP} com constante de tempo de ativação/desativação rápida foi eficaz em amplificar o aEPSPs (Figura 4.12 D). Concluímos que em um neurônio real a cinética de ativação/desativação rápida da I_{NaP} é crucial para o seu efeito de amplificação dos EPSPs.

4.3 A cinética das correntes influencia a constante de tempo da membrana

Nos capítulos anteriores foram estudadas duas correntes dependentes de voltagem não inativantes: a I_h e a I_{NaP} , e os seus efeitos nas propriedades

Figura 4.12: A. Área normalizada pela amplitude dos aEPSPs para registros controle (Ctrl) e na presença de TTX. B. Média dos aEPSPs normalizados de todas as células testadas no caso controle em -70 mV e -80 mV, depois de TTX ($V = -70$ mV) e com TTX e aG_{NaP} ($V = -70$ mV). O aEPSC foi desenhado abaixo dos traçados. C. Área normalizada dos aEPSP na presença de TTX, antes (TTX) e depois da aplicação da aG_{NaP} . D. Média dos aEPSPs normalizados de todas as células testadas no caso controle, TTX, e com TTX e uma aI_{NaP} com constante de tempo de ativação/desativação rápida e lenta ($\tau_{NaP} = 0.1$ ou 100 ms, respectivamente) (todos registrados em $V = -70$ mV). O aEPSC foi desenhado abaixo dos traçados. A fase de decaimento inicial rápida dos aEPSPs é principalmente causada pela queda da voltagem devido à resistência em série.

sublimiaries, seja na R_{in} , na τ_m ou nas propriedades dos EPSPs em dois tipos de neurônios, FUS e PYR. Estudamos esses efeitos principalmente de uma maneira experimental e com simulações computacionais. Neste capítulo, estudaremos o efeito dessas correntes na determinação da τ_m e como a cinética dessas correntes é um fator determinante nesse parâmetro. Para isso, usaremos uma abordagem teórica e usaremos simulações computacionais com o intuito de validar nossas hipóteses.

4.3.1 Condutância diferencial G^{Der}

O objetivo desta seção é determinar a contribuição da condutância de corda e da condutância diferencial na condutância de inclinação da I_{NaP} e da I_h . Para isso, simulamos curvas I-V da I_{NaP} e da I_h com o intuito de comparar os valores calculados das condutâncias de inclinação da G_{NaP} e G_h obtidas das equações 3.9 e 3.10 com os valores extraídos da relação IV (dI/dV). Junto a isso, comparamos as G_{NaP} e G_h com as suas duas componentes complementares: a condutância de corda e diferencial. O comportamento da condutância de corda é bem conhecido: ela sempre é positiva e é diretamente proporcional à variável de ativação no estado estacionário.

Ao contrário da condutância de corda, a condutância diferencial tem sido menos caracterizada. Interessantemente, a G^{Der} pode ser positiva ou negativa e isso depende de como a variável de ativação e o potencial de reversão da corrente variam com a voltagem. Usando a regra de sinais na Eq. 3.10 para cada corrente, determinamos o sinal da G^{Der} e os resultados estão condensados na Tabela 4.2. Somente determinamos o sinal da G^{Der} na faixa fisiológica de potenciais de membrana entre $E_k < V < E_{Na}$, onde E_k é o potencial de reversão do potássio e E_{Na} é o potencial de reversão do sódio. A Tabela 4.2 e a Fig 4.13 B, E mostram que a G^{Der} é negativa para a I_{NaP} e positiva para a I_h .

	dA^∞/dV	$V - E_{NI}$	G^{Der}
NaP	+	-	-
H	-	-	+

Tabela 4.2: Sinal da G^{Der} para a I_{NaP} e I_h .

Para a I_h e a I_{NaP} , a G_{NI}^{Der} tende para 0 em duas situações: quando $A^\infty \rightarrow 0$, e quando $A^\infty \rightarrow 1$. Devido a que G_{NI}^{Der} é diretamente proporcional a $(dA_{NI}^\infty)/dV$ e à força eletromotriz (veja a Eq. 3.10), G_{NI}^{Der} pode somente ter valores longe de zero na região na qual a variável de ativação muda significativamente de uma maneira dependente da voltagem e para potenciais de membrana longe do potencial de reversão. Isso significa que para a I_h e a I_{NaP} , a G_{NI}^{Der} contribui significativamente para valores de A^∞ próximos de 0.5. Em outras palavras, enquanto a G_{NaP}^{Der} pode

Figura 4.13: A. Curva I-V teórica da I_{NaP} . B. Condutância de inclinação da I_{NaP} (G_{NaP}) obtida de duas maneiras diferentes: Primeiro, pela relação da IV (dI/dV) (G_{NaP}^{sim}) e segundo, usando as equações 3.9 e 3.10 (G_{NaP}^{teor}). O gráfico também mostra a condutância de corda g_{NaP} e a condutância diferencial G_{NaP}^{Der} . C. G_{NaP} , g_{NaP} e G_{NaP}^{Der} na região sublimiar. $E_{Na} = 70$ mV e $\bar{g}_{NaP} = 1$ nS. D. Curva I-V teórica da I_h . E. e F. são igual que em B. e C. porém para a I_h . $E_h = -30$ mV e $\bar{g}_h = 1$ nS.

contribuir significativamente para potenciais de membrana despolarizados (i.e., para potenciais próximos do limiar de disparo), a G_h^{Der} pode contribuir significativamente para potenciais de membrana hiperpolarizados.

A G_{NI}^{Der} da I_h e da I_{NaP} tem um pico máximo ou mínimo, respectivamente (Figura 4.13 B, E). O pico da I_h é positivo enquanto o pico da I_{NaP} é negativo. A G_{NaP}^{Der} contribui 10 vezes mais para a G_{NaP} do que a g_{NaP} , por outro lado a G_h^{Der} contribui quase na mesma proporção para a G_h do que para a g_h . Nas Figuras 4.13 A, D podemos ver as curvas I-V da I_h e I_{NaP} . Quando comparamos as diferentes correntes, podemos observar que a I_{NaP} simulada apresenta uma curva I-V não monotônica, com uma região de condutância de inclinação negativa em potenciais de membrana hiperpolarizados e uma região de condutância de inclinação positiva em potenciais de membrana despolarizados e uma região de condutância de inclinação zero no pico da I_{NaP} . Por outro lado, a I_h simulada apresenta uma curva I-V monotônica, com condutância de inclinação positiva exclusivamente para potenciais de membrana hiperpolarizados.

As validações numéricas da G_{NaP} e G_h podem ser encontradas nas Figuras 4.13 B, E, respectivamente. Confirmamos que a G_{NaP} e a G_h calculadas das equações (G_{NaP} teor e G_h teor) correspondem perfeitamente à definição básica da condutância de inclinação, i.e. dI/dV das Figuras 4.13 A, B (G_{NaP} sim and G_h sim). Interessantemente, para ambos os casos a condutância de corda não correspondeu à condutância de inclinação na região do meio da condutância de inclinação; porém existe uma correspondência quando a G_{NaP} e a G_h atingem os valores assintóticos, i.e. para potenciais de membrana acima de -10 mV e abaixo de -100 mV para a G_{NaP} e acima de -40 mV e abaixo de -130 mV para a G_h .

As Figuras 4.13 C, F mostram em maior detalhe as curvas na faixa sublimiar entre -90 e -70 mV. Nessa representação podemos ver que a G_{NaP} é principalmente composta pelo termo diferencial G_{NaP}^{Der} , permitindo que a contribuição da condutância de corda g_{NaP} seja desprezível. Igualmente, a G_h é principalmente composta pelo termo diferencial G_h^{Der} , porém nesse a contribuição da condutância de corda g_h é próxima de 25% .

Também é possível observar que a G_{NaP} é negativa e sua magnitude é dependente de voltagem, aumentando com a despolarização do potencial de membrana. Ao contrário, a G_h é positiva e sua magnitude é dependente de voltagem, aumentando com a hiperpolarização do potencial de membrana. A respeito das condutâncias de corda g_{NaP} e g_h , elas são positivas e sua magnitude é dependente de

voltagem, discordando somente no fato de que a g_{NaP} aumenta com a despolarização do potencial de membrana e a g_h aumenta com a hiperpolarização do potencial de membrana. Não obstante, quando medimos os termos diferenciais G_{NaP}^{Der} e G_h^{Der} , encontramos que eles são respectivamente negativo e positivo e que suas magnitudes são dependentes de voltagem, aumentando igualmente com as g_{NaP} e g_h . Concluimos que a G_{NaP} é negativa e composta principalmente pelo termo diferencial enquanto a G_h é positiva e parcialmente composta pelo termo diferencial.

4.3.2 Constante de tempo da membrana e correntes rápidas e lentas

Um modelo de neurônio com um único compartimento com uma corrente de vazamento (I_L) e duas correntes dependentes de voltagem não inativantes e sublimiáres (uma com cinética rápida (I_f) e uma com cinética lenta (I_s)) tem a seguinte equação da membrana:

$$C \frac{dV}{dt} = -I_L - I_f - I_s. \quad (4.6)$$

A evolução temporal da voltagem do modelo é descrita por uma função exponencial simples quando é injetado um pulso de corrente DC, correspondendo à carga do capacitor [Koch 1998]:

$$V(t) = A(1 - e^{-t/\tau_m}) + V_0, \quad (4.7)$$

onde A e V_0 são constantes. Derivando a Eq. 4.7 no tempo e multiplicando por C :

$$C \frac{dV}{dt} = CA \frac{e^{-t/\tau_m}}{\tau_m}. \quad (4.8)$$

Isolando o termo exponencial na Eq. 4.7, obtemos que $e^{-t/\tau_m} = 1 - (V(t) - V_0)/A$, e substituindo na Eq. 4.8:

$$C \frac{dV}{dt} = CA \frac{1 - (V(t) - V_0)}{\tau_m}. \quad (4.9)$$

Igualando as equações 4.9 e 4.6 e derivando em relação a V :

$$\frac{C}{\tau_m} = \frac{dI_L}{dV} + \frac{dI_f}{dV} + \frac{dI_s}{dV}. \quad (4.10)$$

Para a corrente com cinética rápida, a aproximamos por uma com cinética instantânea, i.e., $\tau_f = 0$, de maneira que $d(A_f)/dV = d(A_f^\infty)/dV$, enquanto que para a corrente de cinética lenta, assumimos que A_s não muda com V , de maneira que $A_s = A_s^\infty(V_R)$ e $d(A_s)/dV = 0$. Então;

$$\frac{C}{\tau_m} = g_L + G_f + g_s, \quad (4.11)$$

onde g_s é a condutância de corda da corrente lenta e G_f é a condutância de inclinação da corrente rápida. Isolando a τ_m :

$$\tau_m = \frac{C}{g_L + G_f + g_s}. \quad (4.12)$$

Concluindo, podemos afirmar que a τ_m é determinada pela condutância de inclinação da corrente rápida e pela condutância de corda da corrente lenta.

4.3.3 Condutância de inclinação dinâmica: um novo conceito

Os conceitos de condutância de corda e de condutância de inclinação são fundamentais para explicar os efeitos das correntes dependentes de voltagem não inativantes com ativação muito rápida ou muito lenta, i.e., quando $\tau_{act} \rightarrow \infty$ ou $\tau_{act} \rightarrow 0$, na τ_m . Por exemplo, a Eq. 4.12 prediz que uma corrente muito lenta sempre vai diminuir a τ_m , enquanto uma corrente muito rápida pode diminuir ou aumentar a τ_m dependendo se a condutância de inclinação for positiva ou negativa, respectivamente. Além disso, já que a única diferença na contribuição de uma corrente muito lenta e muita rápida na τ_m é a adição da condutância diferencial, então ampliando o desenvolvimento matemático anterior em uma forma mais geral para incluir qualquer valor de τ_{act} , uma corrente com cinética caracterizada pela constante de tempo de ativação τ_{act} deve contribuir para a τ_m conforme a seguinte relação matemática:

$$G_{dyn} = g_{NI} + \alpha(\tau_{act})G_{NI}^{Der}, \quad (4.13)$$

onde o fator α , que chamaremos de "fator de escala temporal", é dependente da τ_{act} , de modo que quando a $\tau_{act} \rightarrow 0$, $\alpha \rightarrow 1$, e quando a $\tau_{act} \rightarrow \infty$, $\alpha \rightarrow 0$. A G_{dyn} será definida como a "condutância de inclinação dinâmica". Tal como esperado,

$G_{dyn} \rightarrow g_{NI}$ quando $\tau_{act} \rightarrow \infty$ e $G_{dyn} \rightarrow G_{NI}$ quando $\tau_{act} \rightarrow 0$. Então, para um único compartimento com n correntes não inativantes, cada uma com uma constante de tempo de ativação τ_j , a τ_m é obtida usando a equação $\tau_m = \frac{C}{g_L + \sum_j^n G_{dyn}}$. Já que a g_L corresponde à condutância de inclinação dinâmica das correntes de vazamento, é possível generalizar essa equação a uma relação mais geral:

$$\tau_m = \frac{C}{\sum_j^{n+1} G_{dyn}}. \quad (4.14)$$

Nas seguintes seções, usaremos simulações computacionais com o intuito de obter uma forma empírica para o fator α . Esse novo conceito será muito útil para reproduzir quantitativamente os efeitos da I_h com diferentes τ_h na τ_m .

4.3.4 A I_{NaP} pode ser tratada como uma corrente muito rápida

Em concordância com a Eq. 4.12, a I_{NaP} pode ser tratada como uma corrente muito rápida, já que $\tau_{act} \approx 0,1$ ms. Desta forma, prevemos que a I_{NaP} deve aumentar a τ_m através da condutância de inclinação negativa. Para demonstrar essa conjectura, realizamos simulações computacionais com um modelo de neurônio contendo uma corrente de vazamento e uma I_{NaP} e comparamos os valores da τ_m obtidos pelas simulações com valores teóricos obtidos das relações matemáticas: $\tau_m = R_{in}C$ (τ_m clássica) e $\tau_m = C/(g_L + G_{NaP}(V_m))$ (τ_m G_{dyn}), onde V_m é potencial de membrana antes da aplicação do pulso de corrente.

Já que as previsões usando a Eq. 4.12 são somente precisas para δV pequenos, somente analisamos os valores da τ_m para potências de membrana abaixo de -65 mV. Tal como esperado, depois do ajuste dos valores da τ_m obtidos das curvas das simulações (τ_m Sim), observamos que a τ_m é dependente de voltagem e aumenta com a despolarização, em concordância com a ativação da I_{NaP} (Fig 4.14 C). A Figura 4.14 C mostra que os valores das simulações e os valores previstos usando as relações (clássica e G_{dyn}) são próximos um do outro. Esses resultados mostraram que para prever os valores da τ_m é possível assumir que a I_{NaP} é muito rápida (i.e. praticamente instantânea) e conseqüentemente que aumenta a τ_m através da condutância de inclinação negativa.

Figura 4.14: Simulações computacionais da τ_m dependente de voltagem para um modelo de neurônio com somente uma corrente de vazamento e uma I_{NaP} . A. A mudança do potencial de membrana é dependente de voltagem. B. A evolução temporal na subida da voltagem também é dependente da voltagem. As curvas foram obtidas normalizando os traçados de A. C. Valores da τ_m dependente de voltagem medidas de simulações (τ_m sim) e comparadas com valores obtidas das relações matemáticas $\tau_m = R_{in}C$ (τ_m clássica) e da $\tau_m = C/(g_L + G_{NaP}(V_m))$ ($\tau_m G_{dyn}$).

4.3.5 A I_h e a condutância de inclinação dinâmica

Ao contrário da I_{NaP} , a I_h tem uma constante de tempo de ativação mais lenta com valores na faixa de algumas dezenas de ms até alguns segundos. Então, a I_h não pode ser tratada como uma corrente muito rápida nem muito lenta sempre. Ao invés disso, seria mais apropriado tratar essa corrente com valores de cinética entre esses dois extremos. Isso sugere que poderia ser útil prever a influência da I_h na τ_m através da sua condutância de inclinação dinâmica (equações 4.13 e 4.14). Com o intuito de estudar os efeitos da constante de tempo de ativação (τ_h) da I_h na τ_m , rodamos simulações de um modelo de neurônio com uma corrente de vazamento e uma I_h (com $g_L = 10$ nS e $\bar{g}_h = 10$ nS), e variamos os valores de τ_h de 20 ms até 1000 ms. A Fig 4.15 A mostra a dependência com a voltagem da τ_m para diferentes

valores de τ_h .

Tal como esperado, a τ_m diminui com a hiperpolarização, i.e., a τ_m diminui na mesma direção da ativação da I_h . A Fig 4.15 A mostra que para um mesmo potencial de membrana, a τ_m diminui quando a τ_h diminui. Isso sugere que o aumento da velocidade de ativação da I_h , aumenta também a velocidade das mudanças do potencial de membrana. Como a condutância de corda (g_h) é uma função independente do tempo, esses resultados sugerem que a diminuição da τ_m quando a τ_h diminui é devida a uma mudança dependente do tempo da condutância diferencial. Isso é consistente com as assunções nas equações 4.13 e 4.14, onde o fator de escala temporal (fator α) modula a contribuição da condutância diferencial na condutância de inclinação dinâmica dependendo do valor da τ_h .

Figura 4.15: Simulações computacionais de um modelo de neurônio com uma corrente de vazamento e uma I_h . A. Dependência da voltagem da τ_m com $\tau_h = 20, 100$ e 1000 ms. A τ_m medida de simulações é indicada por símbolos vazios (triângulo, diamante e círculo), a τ_m calculada assumindo a relação $\tau_m = R_{in}C$ (τ_m clássico) e $\tau_m = C/(g_L + g_h)$ (τ_m corda) é indicada por cruzeiros e quadrados, respectivamente. Finalmente, a τ_m calculada assumindo a relação $\tau_m = C/G_{dyn}$ ($\tau_m G_{dyn}$) é indicada por símbolos preenchidos (triângulo, diamante e círculo). B. Assumindo a relação $\tau_m = C/(g_L + g_h + X(V))$, a $X(V)$ foi isolada e seus valores foram obtidos. C. Valores da $G^{der}(V)$. D. Assumindo a relação $X(V) = Y(V)G_h^{der}(V)$, a $Y(V)$ foi isolada e seus valores foram obtidos. E. Valores do fator α obtidos da média dos valores de $Y(V)$.

Com o intuito de testar a validade dessa aproximação matemática, tentamos reproduzir os valores da τ_m assumindo varias relações matemáticas intuitivas. Primeiro usamos a relação clássica $\tau_m = R_{in}C$. Também usamos a relação

$\tau_m = C/(g_L + g_h)$, i.e., assumimos que a I_h é lenta. E finalmente, usamos a relação $\tau_m = C/(g_L + g_h + \alpha(\tau_h)G_h^{der})$, onde o termo no denominador é a “condutância de inclinação dinâmica” ou G_{dyn} da I_h , e o fator α é dependente da τ_h . Essa ultima relação assume que a condutância diferencial G^{der} da I_h contribui controlando a τ_m , embora esse controle seja limitado pelo fator α .

O procedimento que foi adotado para obter os valores do fator α pode ser descrito a seguir: assumindo a relação $\tau_m = C/(g_L + g_h + X(V))$, obtivemos os valores de $X(V)$ usando os valores de τ_m , g_L e g_h medidos das simulações. Note que $X(V)$ é dependente de voltagem e que essa dependência com a voltagem é mais forte quando a τ_h é menor (Fig 4.15 B). Então, assumimos que $Y(V) = X(V)/G_h^{der}(V)$, onde $G_h^{der}(V)$ foi obtido da Eq. 3.10 (Fig 4.15 C, D). A dependência forte com a voltagem observada em $X(V)$ quase que desaparece em $Y(V)$ o que fez possível aproximar o fator α como a média de $Y(V)$ (Fig 4.15 E). Desse modo, o fator α é uma função não linear decrescente de τ_h e independente de voltagem (Fig 4.15 E).

Quando é assumida a relação $\tau_m = C/(g_L + g_h)$, os valores previstos são excelentes quando τ_h é maior que 1000 ms. Já quando é assumida a relação $\tau_m = R_{in}C$, os valores previstos são excelentes quando τ_h é menor que 20 ms (Fig 4.15 A). Interessantemente, quando é assumida a relação $\tau_m = C/(g_L + G_{dyn}^h)$, os valores previstos são excelentes para todos os valores de $\tau_h = 20, 100$ e 1000 ms. Esses resultados sugerem que a melhor aproximação é assumir que a I_h controla a τ_m através da condutância de inclinação dinâmica.

4.3.6 Fator α e constante de tempo de vazamento da membrana

Uma vez que já estabelecemos que a condutância de inclinação dinâmica prediz a τ_m muito bem para o caso em que $g_L = 10$ nS, decidimos verificar se a aproximação da G_{dyn} é também valida para predizer a τ_m quando a g_L muda. As figuras 4.16 A, B mostram as simulações de um modelo de neurônio com uma corrente de vazamento e uma I_h , com valores de τ_h de 20, 100 e 1000 ms e com valores de g_L de 3 e 30 nS. Tentamos reproduzir os valores da τ_m usando a relação da condutância de inclinação dinâmica $\tau_m = C/(g_L + G_{dyn})$ ($\tau_m G_{dyn}$).

As Figuras 4.16 A, B mostram que quando $g_L = 3$ nS ou quando $g_L = 30$ nS,

Figura 4.16: Simulações computacionais de um modelo de neurônio com somente uma corrente de vazamento e uma I_h com τ_h de 20, 100 e 1000 ms. A. Valores da τ_m dependente de voltagem com $g_L = 3$ nS. B. Valores da τ_m dependente de voltagem com $g_L = 30$ nS. A τ_m medida das simulações é indicada por símbolos vazios (triângulo, diamante e círculo). A τ_m calculada da relação $\tau_m = C/G_{dyn}$ ($\tau_m G_{dyn}$) é indicada por símbolos preenchidos (triângulo, diamante e círculo). C. Fator α obtido das simulações com $\bar{g}_h = 10$ nS e g_L com valores 3, 10 e 30 nS. D. Fator α obtido das simulações com $g_L = \bar{g}_h = 10$ ou 20 nS e com valores de $\tau_L = 30, 7,5$ e 15 ms. E. Fator α obtido das simulações com $g_L = \bar{g}_h = 3, 10$ ou 30 nS e com valores da razão $g_L/\bar{g}_h$ 1 e 3.

os valores previstos são excelentes para todos os valores de $\tau_h = 20, 100$ and 1000 ms. Esses resultados sugerem que nossa aproximação é válida para diferentes valores de g_L . Note que para o potencial de membrana -80 mV, o valor de τ_m aumentou em 100%, de $\tau_h = 20$ ms a 1000 ms para $g_L = 3$ nS. O valor de τ_m também aumentou em 50% para $g_L = 10$ nS (veja a Fig 4.15 E), porém somente aumentou em 15% para $g_L = 30$ nS. Isso sugere que o aumento da condutância de vazamento diminui

a faixa de variação de τ_m para diferentes valores de τ_h e, em consequência, diminui o impacto da τ_h na τ_m .

Na seção anterior, mostramos um exemplo da análise realizada com o intuito de obter o fator α para $g_L = 10$ nS. Agora, com o intuito de determinar se o fator α é afetado pelo valor da condutância de vazamento g_L , rodamos mais duas simulações usando $g_L = 3$ e 30 nS. As curvas do fator α quando $g_L = 3$ nS e quando $g_L = 10$ nS são similares. Porém, quando $g_L = 30$ nS o fator α atinge zero para valores menores de τ_h (Fig 4.16 C). Esses resultados sugerem que o fator α é uma função de τ_h e g_L de modo que o aumento de g_L acelera o decaimento do fator α . Concluindo, nossos resultados sugerem que aumentando-se a condutância de vazamento diminui-se os valores do fator α e, consequentemente, diminui-se o impacto da τ_h na τ_m .

A condutância de vazamento (g_L) pode influenciar o fator α por intermédio de diferentes parâmetros: diretamente através de g_L , ou indiretamente através da razão $g_L/\bar{g}_h$, ou também através da constante de tempo da membrana da condutância de vazamento ($\tau_L = C/g_L$). Primeiro, com o intuito de estabelecer por intermédio de qual desses parâmetros (i.e., g_L e/ou τ_L) a condutância de vazamento é capaz de influenciar principalmente o fator α , rodamos simulações nas quais mudamos g_L , $\bar{g}_h$, C e τ_L . Nessas simulações, os valores de g_L e $\bar{g}_h$ foram os mesmos a fim de manter constante sua razão, i.e. $g_L/\bar{g}_h = 1$. Ao todo, quatro combinações da tríade (g_L , C , τ_L) foram usadas (ver Tabela 4.3).

g_L (nS)	C (pF)	τ_L (ms)
10	300	30
20	150	7,5
20	300	15
10	150	15

Tabela 4.3: Combinações de g_L , C e τ_L usadas com o intuito de estabelecer por intermédio de qual desses parâmetros (i.e., g_L e/ou τ_L) a condutância de vazamento é capaz de influenciar o fator α .

Nossas observações sugerem que o parâmetro mais importante foi τ_L e que o fator α é sensível a este parâmetro e não a g_L , o que pode ser resumido a seguir:

sempre que o valor de τ_L foi fixado (e.g. $\tau_L = 15$ ms), o valor do fator α obtido foi o mesmo, independente dos valores de g_L , veja por exemplo a Fig 4.16 D. Além disso, quando o valor de g_L foi fixado, o fator α foi diferente sempre que τ_L foi diferente de modo que o fator α foi menor quando a τ_L foi menor, o que sugere uma correlação entre eles.

Em seguida, testamos o efeito da razão $g_L/\bar{g}_h$ no fator α . Rodamos simulações mudando os valores de g_L e $\bar{g}_h$, mantendo constante $\tau_L = 15$ ms. Três combinações ($g_L, g_L/\bar{g}_h$) foram usadas: (10 nS, 1), (10 nS, 3), e (30 nS, 3). Nossas observações sugerem que o fator α depende da razão $g_L/\bar{g}_h$ e não de g_L ou $\bar{g}_h$, o que pode ser resumido a seguir: sempre que o valor da razão $g_L/\bar{g}_h$ foi fixado (e.g. $g_L/\bar{g}_h = 3$ ms), o valor do fator α obtido foi o mesmo, independente do valor de g_L , veja por exemplo a Fig 4.16 E. Quando o valor de g_L ou de $\bar{g}_h$ foi fixado, o valor do fator α foi diferente sempre que a razão $g_L/\bar{g}_h$ foi diferente, de modo que o fator α foi menor quando a razão $g_L/\bar{g}_h$ foi menor, o que sugere uma correlação entre eles.

Na Fig 4.16 C, quando o valor de g_L aumenta o valor do fator α diminui. Interessantemente, na Fig 4.16 C, os valores de $\bar{g}_h$ e C foram mantidos constantes ($\bar{g}_h = 10$ nS, $C = 154$ pF), então quando o valor de g_L aumentou, paralelamente a razão $g_L/\bar{g}_h$ também aumentou e τ_L diminuiu. Porém, nossos resultados anteriores (veja acima) mostraram que o fator α foi menor quando τ_L ou a razão $g_L/\bar{g}_h$ foi menor. Isso sugere que τ_L é um parâmetro muito mais influente do que a razão $g_L/\bar{g}_h$ na determinação do fator α .

4.3.7 Aproximação matemática do fator α

Nas seções anteriores mostramos que o fator α é dependente de τ_h , τ_L e da razão $g_L/\bar{g}_h$. Nesta seção, propomos e validamos a aproximação matemática do fator α usando como base os resultados anteriores. Com esse intuito, podemos assumir que a variável de ativação A^∞ evolui no tempo seguindo uma função exponencial. Para uma pequena mudança da voltagem $\Delta V = V_{end} - V_0$, a variável de ativação A^∞ muda de $A^\infty(V_0)$ para $A^\infty(V_{end})$, enquanto A muda de $A^\infty(V_0)$ para A. Então, usando como ponto de início a Eq. 3.7, obtemos uma solução analítica da equação

diferencial:

$$A = A^\infty(V_0) + (A^\infty(V_{end}) - A^\infty(V_0))(1 - e^{-\Delta t/\tau_{act}}). \quad (4.15)$$

Rearranjando os termos e chamando $A - A^\infty(V_0)$ de ΔA e $A^\infty(V_{end}) - A^\infty(V_0)$ de ΔA^∞ , temos:

$$\Delta A = \Delta A^\infty(1 - e^{-\Delta t/\tau_{act}}) \quad (4.16)$$

Com o intuito de obter uma versão o mais simplificada possível do fator α , assumiremos que não depende do potencial de membrana ou de variáveis relacionadas, nem da razão $g_L/\bar{g}_I$ mas que depende de τ_L . Podemos desprezar a contribuição da razão $g_L/\bar{g}_{NI}$, já que mostramos na seção anterior que a τ_L é um parâmetro mais influente do que a razão $g_L/\bar{g}_{NI}$. Portanto, assumimos que $\Delta t = \tau_L$. Transformando a Eq. 4.16 em uma equação diferencial e substituindo Δt por τ_L , obtemos $dA/dV = (dA^\infty)/dV(1 - e^{-\tau_L/\tau_{act}})$, com o fator α sendo,

$$\alpha(\tau_L, \tau_{act}) = 1 - e^{-\tau_L/\tau_{act}}. \quad (4.17)$$

Verificaremos a consistência da Eq. 4.17 usando dois cenários. O primeiro é quando $\tau_{act} \rightarrow 0$, i.e., quando a ativação da corrente é rápida, de forma que $e^{-\tau_L/\tau_{act}} \rightarrow e^{-\infty} \rightarrow 0$, e então $\alpha \rightarrow 1$. O segundo é quando $\tau_{act} \rightarrow \infty$, i.e., quando a ativação da corrente é lenta, de forma que $e^{-\tau_L/\tau_{act}} \rightarrow e^0 \rightarrow 1$, e então $\alpha \rightarrow 0$. Ambos esses resultados são esperados, confirmando a consistência da Eq. 4.17.

A Figura 4.17 mostra os valores de τ_m para diferentes valores de τ_h (20, 100 e 1000 ms) obtidos de simulações (traçados pretos) e valores previstos usando a equação 4.13 e 4.14, onde o fator α foi determinado usando as combinações (g_L, τ_L) : (3 nS, 45 ms), (10 nS, 15 ms) e (30 nS, 5 ms) (Fig 4.17 A, B, C). Interessantemente, as diferenças máximas da τ_m entre os valores simulados e os teóricos foram de 3, 1,17, e 0,3 ms para $\tau_L = 45, 15$ e 5 ms, respectivamente. Isso sugere uma boa concordância quando a aproximação para obter o fator α segue uma função exponencial da razão τ_L/τ_h .

Figura 4.17: Simulações computacionais de um modelo de neurônio com uma corrente de vazamento e uma I_h com τ_h 20, 100 e 1000 ms. A τ_m medida de simulações é indicada por símbolos vazios (triângulo, diamante e círculo). A τ_m calculada pela relação $\tau_m = C / (g_L + g_h + \alpha G_h^{der})$ ($\tau_m G_{dyn}$) é indicada por símbolos preenchidos (triângulo, diamante e círculo), onde o fator α foi determinado usando $\alpha = 1 - e^{-\tau_L/\tau_h}$. A. A τ_m dependente de voltagem de simulações onde $\tau_L = 45$ ms. B. Igual a A, mas com $\tau_L = 15$ ms. C. Igual a A, mas com $\tau_L = 5$ ms.

4.3.8 Condutância de inclinação dinâmica da I_{NaP} e da I_h

Com o intuito de estudar os efeitos da razão τ_L/τ_{act} na condutância de inclinação dinâmica, computamos o efeito da razão τ_L/τ_{act} , com valores de 0,1, 0,5, 1, 2 e 5, em τ_m . Para isso, usamos a Eq. 4.17 para obter os valores do fator α e depois calculamos a condutância de inclinação dinâmica (G_{dyn}) usando a Eq. 4.13. A Figura 4.18 mostra que quando a razão da τ_L/τ_{act} é maior que 5, $G_{dyn} \approx G_{NI}$ e quando a razão da τ_L/τ_{act} é menor que 0,1, $G_{dyn} \approx g_{NI}$. Esses resultados estabeleceram os limites superior e inferior para a razão τ_L/τ_{act} que permitem assumir as situações extremas de uma ativação rápida ou lenta.

4.3.9 A cinética da I_h influencia na atenuação dos EPSPs

Já mostramos que uma I_h com cinética rápida diminui a τ_m mais fortemente do que uma I_h com cinética lenta. Esses resultados sugerem que a cinética de ativação da I_h pode influenciar também a forma do EPSP, i.e., sua amplitude e decaimento, na mesma maneira que a τ_m . Com o intuito de testar o efeito da cinética de ativação da I_h na forma dos EPSPs, rodamos simulações onde um EPSC

Figura 4.18: Simulações computacionais das condutâncias de inclinação dinâmica da I_h e I_{NaP} para diferentes razões de τ_L/τ_{act} de 0,1, 0,5, 1, 2 e 5.

foi injetado enquanto o potencial de membrana mudava. Rodamos simulações com um modelo de neurônio com uma corrente de vazamento e uma I_h usando dois valores de τ_h : um valor rápido de 10 ms e um valor lento de 500 ms. Tal como esperado, a amplitude do EPSP, a area e a area normalizada pela amplitude diminuem para potenciais de membrana mais hiperpolarizados. Interessantemente, observamos que esses parametros foram menores quando a constante de tempo de ativação (τ_h) foi rápida (Fig 4.19 B, C, D). Esses resultados sugerem que a cinética de ativação da I_h afeta a forma de EPSPs de uma maneira que τ_h mais rápidas atenuam os EPSPs de um modo mais forte do que τ_h mais lentas.

Figura 4.19: A. Traçados representativos de EPSPs para os potenciais de membrana -60 e -80 mV e para τ_h rápida e lenta. B. Amplitude dos EPSPs obtidos de simulações computacionais para uma I_h de ativação rápida ($\tau_h = 10$ ms) e ativação lenta ($\tau_h = 500$ ms) para diferentes potenciais de membrana. C. Área de EPSPs e D. Área normalizada pela amplitude de EPSPs.

DISCUSSÃO

5.1 A corrente I_h contrabalança a resistência de entrada

Um estudo anterior [Leao et al. 2012] mostrou que a expressão de uma corrente de potássio retificadora de entrada (I_{KIR}) de grande amplitude é necessária para estabelecer o potencial de membrana abaixo do limiar de disparo, evitando assim o disparo espontâneo nas células fusiformes silenciosas. Em células fusiformes ativas, uma expressão de menor amplitude da I_{KIR} permite que o potencial de membrana permaneça acima do limiar de disparo produzindo assim seu disparo espontâneo característico. Portanto, I_{KIR} determina o estado das células fusiformes: silenciosas ou ativas.

Neste trabalho, foi encontrado que uma I_h sutilmente maior em células fusiformes ativas não afeta substancialmente o PMR, porém diminui sua resistência de entrada o suficiente para compensar pela menor I_{KIR} expressa nessas células. Isso pode ser explicado pela ativação da I_h por hiperpolarização e pelo potencial de reversão acima do PMR. Primeiramente, a ativação da I_h despolariza a membrana, o que simultaneamente desativa a I_h antes da corrente chegar próximo do potencial de reversão, o que cria um *feedback* negativo que diminui o efeito despolarizante da I_h . Além disso, devido ao fato de que as células fusiformes ativas têm um potencial de membrana mais despolarizado do que as silenciosas, uma porcentagem menor da I_h está ativada nelas, o que contrabalança a diferença da magnitude da I_h entre as duas populações de neurônios.

Mesmo que a I_h module o disparo das células fusiformes ativas e o PMR das

células fusiformes, a I_h não determina o tipo de disparo (silencioso ou ativo), já que o bloqueio farmacológico da I_h não torna as células ativas em silenciosas [Ceballos et al. 2016] nem a injeção de 40 nS de uma I_h artificial torna as células silenciosas em ativas. O modelo computacional proposto mostrou que a I_h é mais apropriada para contrabalançar a resistência de entrada do que a I_{Leak} , dado que a I_h afeta menos o PMR; assim, variações nessa condutância teriam menos impacto na transição dos estados ativo/silencioso do que as variações da I_{Leak} . Portanto, variações da I_h são mais apropriadas para contrabalançar as diferenças na resistência de entrada causada pelas variações da I_{KIR} em células fusiformes ativas e silenciosas sem afetar o modo de disparo. Conclui-se que o modelo condiz com as observações experimentais sobre o impacto de I_h , I_{KIR} e I_{Leak} nas propriedades sublimiáres das células fusiformes do NCD.

Neste trabalho foi mostrado que variações coordenadas da I_h mantêm a resistência de entrada constante tanto em células fusiformes silenciosas quanto ativas. A I_h é uma corrente catiônica sublimiar, produzida pelos canais HCN, que despolariza o potencial de membrana em resposta a hiperpolarizações da membrana. A I_h controla o PMR [Bal e Oertel 2000, Doan e Kunze 1999] e a taxa de disparo de vários tipos de neurônios [Maccaferri e McBain 1996, McCormick e Huguenard 1992, Rodrigues e Oertel 2006]. As células fusiformes do NCD expressam a subunidade HCN2, mas não a HCN1 [Koch et al. 2004], o que é consistente com a ativação lenta da I_h observada nos experimentos aqui apresentados.

Atualmente, tem sido observado que em vários tipos de neurônios há condutâncias diferentes que podem variar de modo a existir um balanço homeostático na excitabilidade neuronal [Marder e Prinz 2002, O’Leary et al. 2013]. Mais especificamente, uma certa população neuronal pode manter níveis estáveis no padrão de disparos e em suas propriedades de membrana sublimiáres para cada um dos neurônios através da expressão correlacionada de condutâncias opostas. Por exemplo, os neurônios estomatogástricos de crustáceos apresentam uma variabilidade correlacionada entre a I_h e a I_{KA} (corrente de potássio tipo A), o que mantém o padrão de disparo estável nesses neurônios [Burdakov 2005]. Nos neurônios de Purkinje do cerebelo existem diferentes níveis de expressão das condutâncias, o que produz um padrão de disparo homogêneo [Swensen e Bean 2005].

Em neurônios do núcleo coclear ventral, uma estrutura do sistema auditivo, um padrão de disparo e um PMR estáveis são obtidos pela expressão correlacionada da I_h e uma corrente de potássio de baixo limiar [Cao e Oertel 2011]. Do mesmo modo, neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo apresentam uma expressão correlacionada da I_h e de uma corrente de potássio tipo A, o que produz um padrão de disparo estável [Amendola et al. 2012].

Por outro lado, observamos que as células fusiformes do NCD apresentam uma variabilidade da I_h que afeta apenas sutilmente o potencial de membrana e o padrão de disparo, mas que estabiliza a resistência de entrada, o que pode ser um possível mecanismo de compensação homeostática para a expressão diferente da I_{KIR} entre as células fusiformes silenciosas e ativas [Leao et al. 2012]. Então, as células fusiformes do NCD possuem uma variabilidade correlacionada entre as suas condutâncias sublimiares: uma delas estabelece os diferentes padrões de disparo (I_{KIR}) enquanto a outra (I_h) mantém a resistência de entrada estável [Ceballos et al. 2016]. Essa compensação pode ser importante para manter respostas similares a estímulos sinápticos em ambos os neurônios fusiformes ativos e silenciosos. Especialmente para manter similar a integração sináptica temporal de EPSPs e IPSPs, o que é fundamental para a expressão de plasticidade de longo prazo nesses neurônios [Doiron, Zhao e Tzounopoulos 2011]. Dessa forma, em culturas organotípicas de fatias de hipocampo, a inibição crônica da neurotransmissão excitatória aumenta a expressão da I_h , enquanto a redução da neurotransmissão inibitória diminui a expressão da I_h homeostaticamente. Isso afeta a resistência de entrada e somação temporal de EPSPs e a estabilidade da indução da potenciação de longo prazo [Gasselin, Inglebert e Debanne 2015]. Portanto, foi proposto que a maior expressão da I_h em células fusiformes ativas é uma adaptação homeostática que contrabalança a resistência de entrada em ambos os tipos de neurônios fusiformes, ativos e silenciosos, e que mantém similares as respostas a correntes sinápticas.

Curiosamente, a baixa expressão da I_h em células fusiformes e, consequentemente, o aumento da resistência de entrada e a hiperpolarização do potencial de membrana têm sido relacionados à resiliência ao *tinnitus* em camundongos expostos a ruído, enquanto camundongos nos quais as células fusiformes diminuíram a corrente do canal KCNQ mantendo-se a I_h normal desenvolveram *tinnitus* [Li, Kalappa

e Tzounopoulos 2015]. Isso sugere que alterações no controle homeostático dos parâmetros da membrana podem afetar a resposta das células fusiformes à estimulação com sons de alta intensidade o que isto pode ser decisivo para o desenvolvimento do *tinnitus*.

Tanto o modelo computacional quanto os dados experimentais mostraram que o efeito da g_h afetando a resistência de entrada e o *sag* são dependentes da magnitude da g_{KIR} . Mais especificamente, em células fusiformes silenciosas com altos valores de g_{KIR} o impacto da g_h sobre esse parâmetros é menor do que em células fusiformes ativas. Os dados aqui apresentados mostram que o impacto de uma determinada condutância nas propriedades da membrana é fortemente dependente da magnitude das outras condutâncias. Em outros trabalhos já foi reportado que a I_h afeta a resposta da membrana a correntes sinápticas [Magee 1998, Masi et al. 2015], entretanto estes trabalhos geralmente não levam em conta o impacto das condutâncias nas propriedades da membrana. Além disso, os dados aqui apresentados mostraram que a magnitude do *sag* não é um parâmetro confiável para quantificar a I_h sem ter o conhecimento prévio da magnitude das outras condutâncias presentes no mesmo neurônio.

Finalmente, o modelo proposto estabeleceu que a principal fonte despolarizante das células fusiformes é uma corrente linear parcialmente permeável a sódio. Porém, dado que esta corrente de vazamento afeta fortemente o PMR, ela não poderia mudar junto com a I_{KIR} para contrabalançar a resistência de entrada sem mudar os modos de disparo das células fusiformes. Isto condiz com observações experimentais em que a variabilidade dessa condutância não se correlaciona com os estados de disparo silencioso e ativo [Ceballos et al. 2016]. Porém, o modelo aqui apresentado mostrou que a variabilidade em ambas as condutâncias (I_{KIR} e $I_{Leak-Na}$) e no potencial de reversão da $I_{Leak-Na}$ podem produzir estados de disparo silenciosos e ativos usando valores de g_{KIR} típicos desses estados. Isso mostra que, fisiologicamente, o espaço de parâmetros das variações do g_{leak} (e do seu potencial de reversão) é provavelmente limitado a valores nos quais essa corrente não afeta os modos de disparo das células fusiformes do NCD.

Conclui-se, portanto, que nas células fusiformes do NCD, as condutâncias sublimiáres apresentam uma variabilidade que gera os diferentes estados de disparo,

que estabiliza a resistência de entrada entre os neurônios das duas populações e que despolariza o potencial de membrana. Os resultados mostram que as “instruções” que criam os estados silencioso e ativo nas células fusiformes seguem um conjunto de regras específicas caracterizadas pela correlação na expressão das correntes, ao invés de usarem variações aleatórias dessas condutâncias tendo como resultado o fenótipo característico desse neurônios.

5.2 A condutância negativa prolonga as depolarizações sublimiaries

Neste trabalho foi derivada uma nova expressão analítica da condutância de inclinação da corrente de sódio persistente com o intuito de entender os mecanismos pelos quais a ativação da I_{NaP} aumenta a resistência de entrada e prolonga a constante de tempo da membrana. Usando uma aproximação computacional e experimental, foi estabelecido o mecanismo biofísico pelo qual uma condutância de inclinação negativa aumenta R_{in} e τ_m . Os resultados mostraram que a I_{NaP} aumenta a amplitude e prolonga o tempo de decaimento de EPSPs sublimiaries por intermédio de sua condutância de inclinação negativa. Adicionalmente, foi mostrado que a I_{NaP} se adequa a isto devido a sua cinética de ativação ser rápida, o que permite uma mudança na corrente quase que instantânea em uma região da sua curva I-V com inclinação negativa.

Foi observado que a I_{NaP} endógena aumenta a R_{in} e τ_m de uma maneira dependente da voltagem, tal como reportado anteriormente [Fernandez, Malerba e White 2015, Yamada-Hanff e Bean 2015, Wilson 2005, Yamada-Hanff e Bean 2013, Economo, Martinez e White 2014, Jacobson et al. 2005, Yaron-Jakoubovitch et al. 2008, Buchanan et al. 1992]. Nestes últimos trabalhos, foi sugerido que o aumento paradoxal da R_{in} produzido pela ativação da I_{NaP} era devido a uma região de condutância de inclinação negativa gerada pela I_{NaP} . Por outro lado, estes trabalhos não foram conclusivos sobre o efeito na τ_m . Os experimentos aqui descritos com *dynamic-clamp* mostraram que a injeção de uma condutância negativa linear pura (aG_{NaP}) aumentou ambos R_{in} e τ_m , validando a hipótese de que a habilidade da I_{NaP} para aumentar a R_{in} e τ_m está relacionada com uma região

de condutância de inclinação negativa. Então, o comportamento elétrico da I_{NaP} é suficiente para explicar o aumento observado da R_{in} e τ_m e esses efeitos não necessitam adicionalmente de outra condutância ativada pelo Na^+ ou de outras condutâncias sublimiáres [Hage e Salkoff 2012].

As simulações computacionais determinaram que, dado que a I_{NaP} possui uma cinética rápida de ativação/desativação quando comparada com τ_m , a I_{NaP} atinge o seu estado estacionário tão rapidamente que é capaz de controlar a τ_m com sua condutância de inclinação no estado estacionário (G_{NaP}). As simulações também mostraram que τ_m é diretamente proporcional a R_{in} , independentemente do potencial de membrana, o que condiz com a relação $\tau_m = CR_{in}$ da teoria do cabo clássica, apesar de que I_{NaP} é uma corrente dependente de voltagem.

Estudos anteriores estabeleceram que a condutância de inclinação de correntes dependentes da voltagem não-inativantes pode se decompor como a soma de uma componente passiva (i.e., uma condutância de corda) e uma componente diferencial que depende da dependência da voltagem da ativação da corrente [Koch 1998, Wessel, Kristan e Kleinfeld 1999, Ferreira e Marshall 1985]. Neste trabalho, ambas as componentes foram medidas separadamente, o que permitiu determinar a magnitude das contribuições de cada componente para a condutância de inclinação da I_{NaP} . Foi encontrado que a condutância diferencial da I_{NaP} , G_{NaP}^{Der} , é negativa na fase de ativação da I_{NaP} e que a sua magnitude é 10 vezes maior do que a magnitude da condutância de corda g_{NaP} , tendo como resultado uma G_{NaP} resultante negativa.

Estes resultados solucionam o aparente paradoxo observado em que o bloqueio da corrente de sódio persistente com TTX leva à diminuição da R_{in} e redução da τ_m [Fernandez, Malerba e White 2015, Yamada-Hanff e Bean 2015]. Foi mostrado que, apesar de ser contraintuitivo, o bloqueio de canais pode diminuir a R_{in} quando a corrente apresenta uma região de condutância negativa, como é o caso da I_{NaP} . A componente diferencial da condutância de inclinação não representa uma condutância física (i.e. uma permeabilidade iônica da membrana), mas sim uma componente de adição da dI/dV gerada pela ativação. Porém, para uma corrente com cinética muito rápida, a componente diferencial age como um condutor físico, diferenciando-se somente pelo fato da possibilidade de haver valores negativos de condutância quando dI/dV é negativo, tal como acontece no caso da

I_{NaP} . Nesta circunstância, a condutância de inclinação é mais apropriada do que a condutância de corda para explicar os efeitos na resistência de entrada. A I_{NaP} representa um exemplo perfeito de uma corrente instantânea que influencia a R_{in} e τ_m por intermédio da condutância de inclinação e não com a condutância de corda. Esta separação teórica foi reconhecida previamente [Koch 1998, Jacobson et al. 2005, Remme e Rinzel 2011]. Neste trabalho, apresentou-se o que acredita-se ser a primeira verificação experimental de que uma condutância negativa reproduz o aumento da R_{in} e τ_m observada pela ativação de I_{NaP} endógena.

Neste trabalho, foi proposto que para o caso da I_{NaP} é a condutância de inclinação e não a condutância de corda que é mais relevante para mudanças na R_{in} e τ_m . Neste caso, as condutâncias de inclinação (positivas e negativas) de cada corrente (linear e dependente de voltagem) estariam em paralelo e seriam somadas algebricamente, e seria essa soma resultante que determinaria a R_{in} e τ_m [Moore, Buchanan e Murphey 1994]. É importante destacar que este caso é somente válido para correntes dependentes de voltagem com cinética rápida. Então, na região próxima ao limiar de disparo das células pirâmides do CA1, onde a contribuição da I_h é desprezível comparada com a corrente de vazamento, o G_{NaP} negativo se opõe à condutância de inclinação positiva da corrente de vazamento [Yamada-Hanff e Bean 2015], o que leva a uma diminuição da condutância de inclinação positiva total e leva a um aumento da R_{in} do neurônio.

Estes conceitos podem ser estendidos para entender os efeitos de outras corrente iônicas além da I_{NaP} , as quais também apresentem regiões de condutância de inclinação negativas, tais como canais de Ca^{++} dependentes de voltagem, receptores de NMDA e correntes de potássio retificadoras de entrada. Por exemplo, o aumento anômalo da R_{in} tem sido observado durante a ativação de receptores de NMDA e pode ser explicado como resultado de uma região de condutância de inclinação negativa [Koch 1998, Crunelli e Mayer 1984, Moore, Buchanan e Murphey 1995, Sutor, Jordan e Zieglgansberger 1987, MacDonald, Poriatis e Wojtowicz 1982]. Também tem sido observado um prolongamento do decaimento de EPSPs atribuído à abertura de canais de Ca^{++} [Prescott e Koninck 2005].

Os efeitos observados da condutância negativa sobre a R_{in} e τ_m têm consequências importantes para a neurotransmissão. A ativação da I_{NaP} aumenta

a amplitude e duração dos EPSPs [Stuart e Sakmann 1995, Fricker e Miles 2000, Vervaeke et al. 2006] e aqui foi mostrado que este efeito pode ser completamente reproduzido pela aplicação de uma condutância negativa usando um sistema de *dynamic-clamp*. Esses resultados suportam a hipótese de que a amplificação dos EPSPs exercida pela I_{NaP} é principalmente devida à condutância de inclinação negativa. Os resultados contribuem com o entendimento dos mecanismos por trás da amplificação dos EPSPs, pois o aumento da amplitude e o prolongamento do decaimento de EPSPs podem ser interpretados como uma consequência direta do aumento da R_{in} e τ_m pela condutância de inclinação negativa da I_{NaP} .

Mais evidências que apoiam a hipótese de que a condutância de inclinação negativa da I_{NaP} prolonga o decaimento de EPSPs provêm de uma proposta teórica recente chamada de teoria do cabo quase-ativo que mostra que a I_{NaP} aumenta a amplitude e prolonga o decaimento de EPSPs [Remme e Rinzel 2011]. Além disso, já foi mostrado que a aplicação de uma condutância positiva usando um sistema de *dynamic-clamp* reduziu o prolongamento de EPSPs amplificados pela I_{NaP} [Zsiros e Hestrin 2005]. Porém, esta redução não foi reproduzida pela injeção de uma corrente constante. Também, em uma situação extrema, [Farries, Kita e Wilson 2010] mostraram que a condutância de inclinação negativa da I_{NaP} pode cancelar a condutância de inclinação positiva devido a outras correntes sublimiáres, criando uma região de voltagem com condutância de inclinação zero, estabelecendo uma constante de tempo da membrana extremamente longa (quase infinita) e consequentemente, um decaimento do EPSP muito lento que favorece enormemente a somação temporal dos EPSPs.

As simulações computacionais predizem que uma I_{NaP} com ativação rápida aumentaria a amplitude de EPSPs enquanto uma I_{NaP} com ativação lenta diminuiria a amplitude de EPSPs. Este resultado pode ser explicado devido ao fato de que quando a ativação é rápida, G_{NaP} domina e amplifica o EPSP enquanto quando a ativação é lenta, g_{NaP} domina o que diminui o EPSP [Remme e Rinzel 2011]. Surpreendentemente, as simulações computacionais também predizem que uma I_{NaP} com cinética de ativação/desativação rápida ($\tau_{NaP} = 0,1$ ms) é mais eficaz para prolongar o decaimento de EPSPs do que I_{NaP} com cinética lenta ($\tau_{NaP} = 100$ ms). Isso condiz com dados experimentais que mostram que a cinética da I_{NaP} de células

piramidais do CA1 é extremamente rápida, com valores abaixo de 1 ms [Carter et al. 2012]. Curiosamente, os experimentos de *dynamic-clamp* mostraram que uma I_{NaP} artificial com cinética lenta ($\tau_{NaP} = 100$ ms) não foi eficaz em amplificar EPSPs artificiais no neurônio real. Acredita-se que essa diferença seja devido a que o modelo computacional não incorpora outras condutâncias positivas que se ativam próximas do limiar de disparo, tais como I_M e I_{KA} , as quais podem diminuir o efeito amplificatório da I_{NaP} lenta no neurônio real. Esses resultados suportam a afirmação aqui feita de que é a condutância de inclinação negativa da I_{NaP} e não a cinética lenta que causa o prolongamento do decaimento de EPSPs.

Em geral, a ativação de correntes de entrada poderia amplificar EPSPs enquanto as correntes de saída se opõem aos efeitos amplificadores [Fricker e Miles 2000]. Porém, é difícil prever o efeito de uma determinada corrente no EPSP baseando-se somente no fato da corrente ser de saída ou de entrada. Por exemplo, a ativação da I_h , que é uma corrente de entrada, diminui a amplitude e reduz o tempo de decaimento de EPSPs [Magee 1998] do mesmo modo que é feito por correntes de saída de potássio [Hoffman et al. 1997, Mathews et al. 2010]. Por outro lado, a I_{NaP} , que também é uma corrente de entrada, amplifica os potenciais pós-sinápticos inibitórios (IPSPs) [Stuart 1999, Hardie e Pearce 2006], porém nenhuma corrente de saída conhecida amplifica os IPSPs. Também, mesmo que uma corrente de vazamento seja de entrada ou de saída de acordo com o seu potencial de reversão, ela sempre vai diminuir as amplitudes e reduzir o decaimento de EPSPs e IPSPs. Os resultados fornecem um quadro teórico para entender esses dados experimentais. Enfatizamos que uma análise apropriada requer a dissociação de dois conceitos chave: 1) a direção do fluxo da corrente através do canal, i.e., de entrada ou de saída; e 2) a condutância de inclinação da corrente, i.e., positiva ou negativa. Então, uma corrente com condutância de inclinação negativa e cinética rápida aumenta a resistência de entrada e amplifica ambos EPSPs e IPSPs independente da direção do fluxo da corrente. O contrário também é válido para correntes com condutância de inclinação positiva. Finalmente, a afirmação também é suportada por trabalhos teóricos prévios [Remme e Rinzel 2011].

5.3 A cinética das correntes influencia a constante de tempo da membrana

O propósito deste trabalho foi propor uma nova solução analítica da condutância de inclinação no estado transiente, a qual foi denominada como “condutância de inclinação dinâmica”, de correntes dependentes de voltagem não inativantes. O intuito foi esclarecer os mecanismos pelos quais as cinéticas de ativação da I_{NaP} e da I_h influenciam a τ_m . Foram usadas aproximações matemáticas e simulações computacionais com o objetivo de estabelecer o mecanismo pelo qual a condutância de inclinação dinâmica da I_h diminui a τ_m de acordo com a sua constante de tempo de ativação τ_h . Estudos prévios [Remme e Rinzel 2011], em combinação com os resultados deste trabalho sobre a I_{NaP} , têm estabelecido que correntes dependentes de voltagem não inativantes com cinética rápida influenciam a τ_m pela condutância de inclinação, enquanto correntes com cinética lenta influenciam a τ_m através da condutância de corda. Neste trabalho foi proposto um princípio geral segundo o qual uma corrente dependente de voltagem não inativante com uma constante de tempo de ativação τ_{act} influencia a τ_m pela condutância de inclinação dinâmica (G_{dyn}). Usando este novo conceito, foi possível explicar porque uma I_h com cinética rápida diminui a τ_m mais fortemente do que uma I_h com cinética lenta, além de explicar porque a I_{NaP} aumenta a τ_m pela condutância de inclinação no estado estacionário.

Os resultados mostraram que a condutância diferencial da I_h (G_h^{Der}) e a condutância de corda (g_h) são ambas positivas. Também foi encontrado que a magnitude da G_h^{Der} foi bem maior do que a da g_h , o que resulta em uma condutância de inclinação G_h positiva e predominantemente dominada pela contribuição da condutância diferencial. De fato, de 60% a 80% da G_h é composta por G_h^{Der} .

Quando foi comparada a aproximação matemática com a teoria do cabo quase-ativo [Remme e Rinzel 2011, Remme 2015], percebeu-se que a condutância diferencial G_{Der} permite um método sistemático para classificar as correntes não inativantes como regenerativas ou restaurativas usando um único parâmetro (μ no caso da teoria do cabo quase-ativo). Este último se encaixa perfeitamente nas propriedades regenerativas ou restaurativas estabelecidas em trabalhos anteriores

[Remme e Rinzel 2011, Goldberg, Deister e Wilson 2007]. A propriedade restaurativa está baseada no *feedback* negativo e a propriedade regenerativa está baseada no *feedback* positivo entre a voltagem e a variável de ativação [Izhikevich 2007]. Neste trabalho foi mostrado que o sinal da G_{Der} determina se a corrente é restaurativa (e.g. I_h) ou regenerativa (e.g. I_{NaP}), i.e., G_{Der} é positiva para I_h e negativa para I_{NaP} .

Aqui, foi proposto que uma corrente dependente de voltagem não inativante com uma constante de tempo de ativação τ_{act} influencia a τ_m pela condutância de inclinação dinâmica (G_{dyn}). Nesta generalização estão contidos dois casos específicos bem conhecidos na literatura: primeiro, quando a corrente é muito lenta (e.g. I_h), G_{dyn} é equivalente à g_{chord} , e a τ_m é principalmente determinada pela soma das condutâncias de corda da corrente não inativante lenta e da corrente de vazamento. Segundo, quando a corrente é muito rápida (e.g. I_{NaP}), G_{dyn} é equivalente à $G_{inclinação}$, e a τ_m é principalmente determinada pela soma das condutâncias de inclinação da corrente não inativante rápida e da corrente de vazamento. Neste novo paradigma, as condutâncias de inclinação dinâmicas (positivas e negativas) de cada corrente (linear e dependente de voltagem) estariam em paralelo e seriam somadas algebricamente, e seria essa soma resultante o que determinaria a τ_m , seguindo a regra matemática: $\tau_m = C/G_{dyn}$, (onde C é a capacitância da membrana). É importante destacar que este paradigma é somente válido para correntes dependentes de voltagem não inativantes. Trabalhos futuros serão necessários para desenvolver esse mesmo quadro teórico para incluir o caso de correntes dependentes de voltagem inativantes.

Até esta data, de acordo com o conhecimento do autor desta tese, não existe nenhum estudo mostrando como as correntes dependentes de voltagem afetam a constante de tempo da membrana de neurônios. Neste trabalho, foi ampliada a teoria do cabo clássica introduzindo um novo conceito que foi chamado de “condutância de inclinação dinâmica” com o intuito de prever quantitativamente a constante de tempo da membrana quando I_{NaP} ou I_h estão presentes.

Ainda, os resultados mostraram que a τ_m diminui quando a τ_h diminui. Isto sugere que o aumento da velocidade de ativação da I_h aumenta também a velocidade das mudanças do potencial de membrana. Já que a condutância de corda (g_h) é

uma função independente do tempo, estes resultados sugerem que a diminuição da τ_m quando a τ_h diminui ocorre devido a uma mudança dependente do tempo na condutância diferencial. Isto é consistente com a suposição de que o fator de escala temporal (fator α) modula a contribuição da condutância diferencial na condutância de inclinação dinâmica dependendo do valor da τ_h .

Na tentativa de validar a aproximação matemática proposta, foram reproduzidos satisfatoriamente os valores da τ_m assumindo a relação intuitiva $\tau_m = C/(g_L + g_h + \alpha(\tau_h)G_{der}^h)$, onde o termo no denominador é a “condutância de inclinação dinâmica” ou G_{dyn} da I_h , e o fator α é dependente da τ_h . Esta última relação assume que a condutância diferencial G_{der} da I_h contribui controlando a τ_m , embora esse controle seja limitado pelo fator α , que é uma função decrescente não linear dependente de τ_h .

Concomitantemente, os resultados mostraram que a suposição de que a cinética da I_h é lenta, permitindo que a I_h influencie a τ_m principalmente pela condutância de corda, somente é válida quando $\tau_h > 1000$ ms. Caso contrário, quando $20 < \tau_h < 1000$ ms, foi encontrado que a melhor aproximação possível era quando se assumia que I_h controla τ_m pela condutância de inclinação dinâmica.

Uma característica importante da aproximação proposta é que o fator α não é dependente da voltagem, o que permitiu obter uma função matemática simplificada. Trabalhos futuros podem validar com precisão os limites desta aproximação e podem ampliá-la para uma forma mais exata. É importante destacar que a aproximação é somente válida para a injeção de correntes pequenas o suficiente para produzir pequenas flutuações no potencial de membrana (menores que 1 mV). Esta restrição é muito importante para a I_{NaP} , devido ao comportamento regenerativo da sua condutância de inclinação negativa, porém pode ser desprezada no caso da I_h . Trabalhos futuros podem ampliar essa limitação ao levarem em consideração a injeção de correntes maiores.

Foi determinado que o fator α é uma função dependente da constante de tempo da membrana gerada pela condutância de vazamento, ou seja, $\tau_L = C/g_L$, e também é dependente da razão $g_L/\bar{g}_h$, porém não depende da g_L ou $\bar{g}_h$, de modo que o fator α é menor quando τ_L ou a razão $g_L/\bar{g}_h$ é menor. Mais importante ainda é que τ_L é um parâmetro mais influente do que a razão $g_L/\bar{g}_h$ na determinação do

fator α , de modo que o aumento da condutância de vazamento diminui τ_L , o que simultaneamente diminui o fator α e consequentemente diminui o impacto da τ_h na τ_m . Finalmente, foi obtida boa concordância entre os dados das simulações e os dados teóricos ao utilizar uma aproximação exponencial para o fator α , onde o expoente era a razão τ_L/τ_h .

Quando foram investigados os efeitos da razão τ_L/τ_{act} na condutância de inclinação dinâmica da I_{NaP} e da I_h , foi encontrado que quando a razão τ_L/τ_{act} é maior do que 5 tem-se, $G_{dyn} \approx G_{NI}$ e quando a razão é menor que 0,1 tem-se, $G_{dyn} \approx g_{NI}$. Dado que τ_{NaP} é geralmente menor do que 1 ms [Carter et al. 2012], isto implica que quando a τ_L é maior do que 5 ms, I_{NaP} aumentaria a τ_m com a condutância de inclinação negativa G_{NaP} . Também implica que quando a τ_L é menor do que 0,1 ms, a I_{NaP} diminuiria a τ_m pela condutância de corda g_{NaP} . Porém, poucos neurônios têm uma τ_m tão baixa da ordem de μs (e.g. neurônios Bushy e Octopus do núcleo coclear ventral e neurônios principais da oliva superior medial [Bal e Oertel 2000, Golding, Ferragamo e Oertel 1999, Khurana et al. 2011, Scott, Mathews e Golding 2010]). Então, os resultados predizem que na maioria dos neurônios que expressam a I_{NaP} (dentres os quais estariam o neurônio piramidal do CA1 e o neurônio fusiforme do núcleo coclear dorsal), a τ_m seria aumentada pela condutância de inclinação dinâmica da I_{NaP} .

Em relação à I_h , dado que τ_h pode ser rápido ou lento (desde dezenas de ms até alguns segundos) e sabendo que a maioria dos neurônios apresentam $\tau_m < 100$ ms [Tripathy et al. 2014] (http://neuroelectro.org/ephys_prop/4/), isso implica que somente a I_h rápida (com $\tau_h < 20$ ms) diminui a τ_m pela condutância de inclinação positiva G_h . Também implica que quando a τ_h é muito lenta (mais de 1 s), para a maioria dos neurônios a I_h diminui a τ_m pela condutância de corda g_h . Para a I_h com τ_h com valores intermediários (entre 20 ms e 1 s), a τ_m diminui por causa da condutância de inclinação dinâmica positiva com valores entre g_h e G_h . Então, os resultados predizem que na maioria dos neurônios que expressam a I_h , a τ_m é diminuída por causa da condutância de inclinação dinâmica positiva da I_h . Concluindo, os resultados aqui apresentados sugerem que a I_h sempre vai diminuir a τ_m , independentemente da sua cinética, enquanto a I_{NaP} rápida sempre vai aumentar a τ_m .

Um dos efeitos fisiológicos mais importantes da constante de tempo da membrana é a forma dos EPSPs, principalmente o seu tempo de decaimento [Ceballos, Roque e Leao 2017]. As simulações mostraram que uma I_h com uma cinética de ativação rápida atenua e acelera os EPSPs mais fortemente do que uma I_h com uma cinética de ativação lenta. Além disso, os resultados têm implicações muito relevantes para o entendimento dos efeitos fisiológicos da cinética dos canais HCN na integração sináptica de neurônios. Isto porque as diferentes 4 subunidades HCN contêm a I_h com diferentes valores de cinética de ativação indo desde dezenas de ms até vários segundos. Por exemplo, a subunidade HCN1 permite a ativação mais rápida, seguida da subunidade HCN2 que é um pouco mais lenta e, por último, pela subunidade HCN4 que é a mais lenta [WahlSchott e Biel 2009]. Deste modo, a expressão diferente dessas subunidades permite diferentes cinéticas de ativação da I_h e, conseqüentemente, diferentes τ_m , alterando as propriedades da integração sináptica.

REFERÊNCIAS¹

- [Agar, Green e Sanders 1997]AGAR, E.; GREEN, G.; SANDERS, D. Membrane properties of mouse dorsal cochlear nucleus neurons in vitro. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, v. 8, p. 157–180, 1997.
- [Agrawal et al. 2001]AGRAWAL, N. et al. Persistent sodium channel activity mediates subthreshold membrane potential oscillations and low-threshold spikes in rat entorhinal cortex layer v neurons. *Neuroscience*, v. 102, p. 53–64, 2001.
- [Aman et al. 2009]AMAN, T. et al. Regulation of persistent Na current by interactions between beta subunits of voltage-gated Na channels. *Journal of Neuroscience*, n. 7, p. 2027–42, 2009.
- [Amaral e Lavenex 2007]AMARAL, D.; LAVENEX, P. Hippocampal neuronatomy. In: *The Hippocampus Book*. [S.l.]: New York: Oxford University Press, 2007. p. 37–114.
- [Amendola et al. 2012]AMENDOLA, J. et al. Ca/cAMP-sensitive covariation of I(A) and I(H) voltage dependences tunes rebound firing in dopaminergic neurons. *Journal of Neuroscience*, v. 32, p. 2166–81, 2012.
- [Andreasen e Lambert 1999]ANDREASEN, M.; LAMBERT, J. Somatic amplification of distally generated subthreshold EPSPs in rat hippocampal pyramidal neurones. *Journal of Physiology*, v. 519, p. 85–100, 1999.
- [Apostolides e Trussell 2014]APOSTOLIDES, P. F.; TRUSSELL, L. O. Control of interneuron firing by subthreshold synaptic potentials in principal cells of the dorsal cochlear nucleus. *Neuron*, v. 83, p. 324–330, 2014.

¹De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

- [Bal e Oertel 2000]BAL, R.; OERTEL, D. Hyperpolarization-activated, mixed-cation current ($I(h)$) in octopus cells of the mammalian cochlear nucleus. *Journal of Neurophysiology*, v. 84, p. 806–817, 2000.
- [Banks, Pearce e Smith 1993]BANKS, M. I.; PEARCE, R. A.; SMITH, P. H. Hyperpolarization-activated cation current (I_h) in neurons of the medial nucleus of the trapezoid body: voltage-clamp analysis and enhancement by norepinephrine and cAMP suggest a modulatory mechanism in the auditory brain stem. *Journal of Neurophysiology*, v. 70, p. 1420–1432, 1993.
- [Boehlen et al. 2012]BOEHLEN, A. et al. Contribution of near-threshold currents to intrinsic oscillatory activity in rat medial entorhinal cortex layer II stellate cells. *Journal of Neurophysiology*, v. 109, p. 445–463, 2012.
- [Bose et al. 2014]BOSE, A. et al. The role of linear and voltage-dependent ionic currents in the generation of slow wave oscillations. *Journal of Computational Neuroscience*, v. 37, p. 229–242, 2014.
- [Branco et al. 2016]BRANCO, T. et al. Near-perfect synaptic integration by Nav 1.7 in hypothalamic neurons regulates body weight. *Cell*, v. 165, p. 1749–1761, 2016.
- [Buchanan et al. 1992]BUCHANAN, J. et al. Synaptic potentials and transfer functions of lamprey spinal neurons. *Biological Cybernetics*, v. 67, p. 123–131, 1992.
- [Burdakov 2005]BURDAKOV, D. Gain control by concerted changes in I_A and I_H conductances. *Neural Computation*, v. 17, p. 991–995, 2005.
- [Cant e Benson 2003]CANT, N. B.; BENSON, C. G. Parallel auditory pathways: projection patterns of the different neuronal populations in the dorsal and ventral cochlear nuclei. *Brain research bulletin*, v. 60, p. 457–474, 2003.
- [Cao e Oertel 2011]CAO, X.; OERTEL, D. The magnitudes of hyperpolarization-activated and low-voltage-activated potassium currents co-vary in neurons of the ventral cochlear nucleus. *Journal of neurophysiology*, v. 106, p. 630–640, 2011.

- [Carter et al. 2012]CARTER, B. et al. Transient sodium current at subthreshold voltages: activation by EPSP waveforms. *Neuron*, v. 75, p. 1081–1093, 2012.
- [Ceballos et al. 2016]CEBALLOS, C. et al. Ih equalizes membrane input resistance in a heterogeneous population of fusiform neurons in the dorsal cochlear nucleus. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2016.
- [Ceballos, Roque e Leao 2017]CEBALLOS, C.; ROQUE, A.; LEAO, R. A negative slope conductance of the persistent sodium current prolongs subthreshold depolarizations. *Biophysical Journal*, 2017.
- [Crill 1996]CRILL, W. Persistent sodium current in mammalian central neurons. *Annual Review of Physiology*, v. 58, p. 349–362, 1996.
- [Crunelli e Mayer 1984]CRUNELLI, V.; MAYER, M. Mg²⁺ dependence of membrane resistance increases evoked by NMDA in hippocampal neurones. *Brain Research*, v. 311, p. 392–396, 1984.
- [Curti et al. 2008]CURTI, S. et al. Subthreshold sodium current underlies essential functional specializations at primary auditory afferents. *Journal of Neurophysiology*, v. 99, p. 1683–1699, 2008.
- [Cuttle et al. 2001]CUTTLE, M. F. et al. Modulation of a presynaptic hyperpolarization-activated cationic current (Ih) at an excitatory synaptic terminal in the rat auditory brainstem. *The Journal of Physiology*, v. 534, p. 733–744, 2001.
- [Dagostin et al. 2015]DAGOSTIN, A. et al. Control of phasic firing by a background leak current in avian forebrain auditory neurons. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2015.
- [Day et al. 2005]DAY, M. et al. Dendritic excitability of mouse frontal cortex pyramidal neurons is shaped by the interaction among HCN, Kir2, and K_{leak} channels. *Journal of Neuroscience*, v. 25, p. 8776–8787, 2005.
- [Deisz, Fortin e Zieglgansberger 1991]DEISZ, R.; FORTIN, G.; ZIEGLGANSBERGER, W. Voltage dependence of excitatory postsynaptic

- potentials of rat neocortical neurons. *Journal of Neurophysiology*, v. 65, p. 371–382, 1991.
- [DelNegro et al. 2002]DELNEGRO, C. et al. Persistent sodium current, membrane properties and bursting behavior of pre-Botzinger complex inspiratory neurons in vitro. *Journal of Neurophysiology*, v. 88, p. 2242–2250, 2002.
- [Destexhe, Babloyantz e Sejnowski 1993]DESTEXHE, A.; BABLOYANTZ, A.; SEJNOWSKI, T. J. Ionic mechanisms for intrinsic slow oscillations in thalamic relay neurons. *Biophysical Journal*, v. 65, p. 1538, 1993.
- [Doan e Kunze 1999]DOAN, T.; KUNZE, D. Contribution of the hyperpolarization-activated current to the resting membrane potential of rat nodose sensory neurons. *Journal of Physiology*, v. 514, p. 125–138, 1999.
- [Doiron, Zhao e Tzounopoulos 2011]DOIRON, B.; ZHAO, Y.; TZOUNOPOULOS, T. Combined LTP and LTD of modulatory inputs controls neuronal processing of primary sensory inputs. *Journal of Neuroscience*, v. 31, p. 10579–92, 2011.
- [Dougherty et al. 2013]DOUGHERTY, K. et al. Differential expression of HCN subunits alters voltage-dependent gating of h-channels in CA1 pyramidal neurons from dorsal and ventral hippocampus. *Journal of Neurophysiology*, v. 109, p. 1940–1953, 2013.
- [Economo, Martinez e White 2014]ECONOMO, M.; MARTINEZ, J.; WHITE, J. Membrane potential dependent integration of synaptic inputs in entorhinal stellate neurons. *Hippocampus*, v. 24, p. 1493–1505, 2014.
- [Enyedi e Czirjak 2010]ENYEDI, P.; CZIRJAK, G. Molecular background of leak K⁺ currents: two-pore domain potassium channels. *Physiological Reviews*, v. 90, p. 559–605, 2010.
- [Farries, Kita e Wilson 2010]FARRIES, M.; KITA, H.; WILSON, C. Dynamic spike threshold and zero membrane slope conductance shape the response of subthalamic neurons to cortical input. *Journal of Neuroscience*, v. 30, p. 13180–13191, 2010.

- [Fernandez, Malerba e White 2015]FERNANDEZ, F.; MALERBA, P.; WHITE, J. Non-linear membrane properties in entorhinal cortical stellate cells reduce modulation of input-output responses by voltage fluctuations. *Plos Computational Biology*, 2015.
- [Ferreira e Marshall 1985]FERREIRA, H.; MARSHALL, M. *The Biophysical Basis of Excitability*. [S.l.]: Cambridge University Press, Cambridge., 1985.
- [Finkelstein e Mauro 2011]FINKELSTEIN, A.; MAURO, A. Physical principles and formalisms of electrical excitability. In: *Comprehensive Physiology*. [S.l.]: American physiological society, Bethesda, 2011. p. 161–213.
- [French et al. 1990]FRENCH, C. et al. A voltage-dependent persistent sodium current in mammalian hippocampal neurons. *The Journal of General Physiology*, v. 95, p. 1139–1157, 1990.
- [Fricker e Miles 2000]FRICKER, D.; MILES, R. EPSP amplification and the precision of spike timing in hippocampal neurons. *Neuron*, v. 28, p. 559–569, 2000.
- [Fujino e Oertel 2003]FUJINO, K.; OERTEL, D. Bidirectional synaptic plasticity in the cerebellum-like mammalian dorsal cochlear nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 100, n. 1, p. 265–270, 2003.
- [Gasselín, Inglebert e Debanne 2015]GASSELIN, C.; INGLEBERT, Y.; DEBANNE, D. Homeostatic regulation of h-conductance controls intrinsic excitability and stabilizes the threshold for synaptic modification in CA1 neurons. *Journal of Physiology*, v. 593, p. 4855–4869, 2015.
- [Ghigliazza e Holmes 2004]GHIGLIAZZA, R.; HOLMES, P. Minimal models of bursting neurons: How multiple currents, conductances, and timescales affect bifurcation diagrams. *SIAM Journal on Applied Dynamical Systems*, v. 3, p. 636–670, 2004.
- [Goldberg, Deister e Wilson 2007]GOLDBERG, J.; DEISTER, C.; WILSON, C. Response properties and synchronization of rhythmically firing dendritic neurons. *Journal of Neurophysiology*, v. 97, p. 208–219, 2007.

- [Golding, Ferragamo e Oertel 1999]GOLDING, N. L.; FERRAGAMO, M. J.; OERTEL, D. Role of intrinsic conductances underlying responses to transients in octopus cells of the cochlear nucleus. *The Journal of Neuroscience*, v. 19, p. 2897–2905, 1999.
- [Goldman et al. 2001]GOLDMAN, M. et al. Global structure, robustness, and modulation of neuronal models. *Journal of Neuroscience*, v. 21, p. 5229–5238, 2001.
- [Gonzalez-Burgos e Barrionuevo 2001]GONZALEZ-BURGOS, G.; BARRIONUEVO, G. Voltage-gated sodium channels shape subthreshold EPSPs in layer 5 pyramidal neurons from rat prefrontal cortex. *Journal of Neurophysiology*, v. 86, p. 1671–1684, 2001.
- [Gutfreund e Segev 1995]GUTFREUND, Y.; SEGEV, I. Subthreshold oscillations and resonant frequency in guinea pig cortical neurons: physiology and modelling. *Journal of Physiology*, v. 483, p. 621–640, 1995.
- [Hage e Salkoff 2012]HAGE, T.; SALKOFF, L. Sodium activated potassium channels are functionally coupled to persistent sodium currents. *Journal of Neuroscience*, v. 32, p. 2714–2721, 2012.
- [Hammond 2014]HAMMOND, C. *Cellular and molecular neurophysiology*. [S.l.]: Academic Press, 2014.
- [Hardie e Pearce 2006]HARDIE, J.; PEARCE, R. Active and passive membrane properties and intrinsic kinetics shape synaptic inhibition in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Journal of Neuroscience*, v. 26, p. 8559–8569, 2006.
- [Hibino et al. 2010]HIBINO, H. et al. Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiological Reviews*, v. 90, p. 291–366, 2010.
- [Hirsch e Gilbert 1991]HIRSCH, J.; GILBERT, C. Synaptic physiology of horizontal connections in the cat's visual cortex. *Journal of Neuroscience*, v. 11, p. 1800–1809, 1991.

- [Hirsch e Oertel 1988]HIRSCH, J.; OERTEL, D. Intrinsic properties of neurones in the dorsal cochlear nucleus of mice, in vitro. *Journal of Physiology*, v. 396, p. 535–548, 1988.
- [Hoffman et al. 1997]HOFFMAN, D. et al. K⁺ channel regulation of signal propagation in dendrites of hippocampal pyramidal neurons. *Nature*, v. 387, p. 869–875, 1997.
- [Hu, Vervaeke e Storm 2002]HU, H.; VERVAEKE, K.; STORM, J. Two forms of electrical resonance at theta frequencies, generated by M current, h current and persistent Na⁺ current in rat hippocampal pyramidal cells. *Journal of Physiology*, v. 545, p. 783–805, 2002.
- [Hutcheon, Miura e Puil 1996a]HUTCHEON, B.; MIURA, R.; PUIL, E. Models of subthreshold membrane resonance in neocortical neurons. *Journal of Neurophysiology*, v. 76, p. 698–714, 1996a.
- [Hutcheon, Miura e Puil 1996b]HUTCHEON, B.; MIURA, R.; PUIL, E. Subthreshold membrane resonance in neocortical neurons. *Journal of Neurophysiology*, v. 76, p. 683–697, 1996b.
- [Hutcheon e Yarom 2000]HUTCHEON, B.; YAROM, Y. Resonance, oscillation and the intrinsic frequency preferences of neurons. *Trends in Neurosciences*, v. 23, p. 216–222, 2000.
- [Izhikevich 2007]IZHIKEVICH, E. *Dynamical Systems in Neuroscience*. [S.l.]: MIT Press, Cambridge, 2007.
- [Jacobson et al. 2005]JACOBSON, G. et al. Subthreshold voltage noise of rat neocortical pyramidal neurones. *Journal of Physiology*, v. 564, p. 145–160, 2005.
- [Johnston e Wu 1994]JOHNSTON, D.; WU, S. *Foundations of cellular neurophysiology*. [S.l.]: MIT press, Cambridge, 1994.
- [Khaliq e Bean 2010]KHALIQ, Z.; BEAN, B. Pacemaking in dopaminergic ventral tegmental area neurons: depolarizing drive from background and

voltage-dependent sodium conductances. *Journal of Neuroscience*, v. 30, p. 7401–7413, 2010.

[Khurana et al. 2011]KHURANA, S. et al. Dynamic interaction of Ih and IK-LVA during trains of synaptic potentials in principal neurons of the medial superior olive. *Journal of Neuroscience*, v. 31, p. 8936–47, 2011.

[Klink e Alonso 1993]KLINK, R.; ALONSO, A. Ionic mechanisms for the subthreshold oscillations and differential electroresponsiveness of medial entorhinal cortex layer II neurons. *Journal of Neurophysiology*, v. 70, p. 144–157, 1993.

[Klink e Alonso 1997]KLINK, R.; ALONSO, A. Ionic mechanisms of muscarinic depolarization in entorhinal cortex layer II neurons. *Journal of Neurophysiology*, v. 77, p. 1829–1843, 1997.

[Koch 1984]KOCH, C. Cable theory in neurons with active, linearized membranes. *Biological Cybernetics*, v. 50, p. 15–33, 1984.

[Koch 1998]KOCH, C. *Biophysics of Computation: Information Processing in Single Neurons*. [S.l.]: Oxford University Press, New York, 1998.

[Koch et al. 2004]KOCH, U. et al. Distribution of HCN1 and HCN2 in rat auditory brainstem nuclei. *European Journal of Neuroscience*, v. 20, p. 79–91, 2004.

[Koch e Grothe 2003]KOCH, U.; GROTHE, B. Hyperpolarization-activated current (Ih) in the inferior colliculus: distribution and contribution to temporal processing. *Journal of Neurophysiology*, v. 90, p. 3679–3687, 2003.

[Konig, Engel e Singer 1996]KONIG, P.; ENGEL, A.; SINGER, W. Integrator or coincidence detector? the role of the cortical neuron revisited. *Trends in neurosciences*, v. 19, p. 130–137, 1996.

[Larsson 2013]LARSSON, H. P. What determines the kinetics of the slow afterhyperpolarization (sAHP) in neurons? *Biophysical Journal*, v. 104, n. 2, p. 281, 2013.

- [Lazarenko et al. 2010]LAZARENKO, R. et al. Anesthetic activation of central respiratory chemoreceptor neurons involves inhibition of a THIK-1-like background $K(+)$ current. *Journal of Neuroscience*, v. 30, p. 9324–9334, 2010.
- [Leao et al. 2006]LEAO, K. E. et al. Hyperpolarization-activated currents are differentially expressed in mice brainstem auditory nuclei. *The Journal of Physiology*, v. 576, p. 849–864, 2006.
- [Leao et al. 2005]LEAO, R. et al. Presynaptic Na^+ channels: locus, development, and recovery from inactivation at a high-fidelity synapse. *Journal of Neuroscience*, v. 25, p. 3724–38, 2005.
- [Leao et al. 2012]LEAO, R. et al. Diverse levels of an inwardly rectifying potassium conductance generate heterogeneous neuronal behavior in a population of dorsal cochlear nucleus pyramidal neurons. *Journal of Neurophysiology*, v. 107, p. 3008–3019, 2012.
- [Li, Kalappa e Tzounopoulos 2015]LI, S.; KALAPPA, B.; TZOUNOPOULOS, T. Noise-induced plasticity of $KCNQ2/3$ and HCN channels underlies vulnerability and resilience to tinnitus. *Elife*, v. 4, 2015.
- [Lipowsky, Gillessen e Alzheimer 1996]LIPOWSKY, R.; GILLESSEN, T.; ALZHEIMER, C. Dendritic Na^+ channels amplify EPSPs in hippocampal CA1 pyramidal cells. *Journal of Neurophysiology*, v. 76, p. 2181–2191, 1996.
- [Liu e Shipley 2008]LIU, S.; SHIPLEY, M. Intrinsic conductances actively shape excitatory and inhibitory postsynaptic responses in olfactory bulb external tufted cells. *Journal of Neuroscience*, v. 28, p. 10311–10322, 2008.
- [Lu et al. 2007]LU, B. et al. The neuronal channel NALCN contributes resting sodium permeability and is required for normal respiratory rhythm. *Cell*, v. 129, p. 371–383, 2007.
- [Lu e Feng 2011]LU, T.; FENG, Z. A sodium leak current regulates pacemaker activity of adult central pattern generator neurons in *lymnaea stagnalis*. *PLoS One*, v. 6, 2011.

- [Ma e Koester 1996]MA, M.; KOESTER, J. The role of potassium currents in frequency-dependent spike broadening in *Aplysia* R20 neurons: a dynamic clamp analysis. *Journal of Neuroscience*, v. 16, p. 4089–4101, 1996.
- [Maccaferri e McBain 1996]MACCAFERRI, G.; MCBAIN, C. The hyperpolarization-activated current (I_h) and its contribution to pacemaker activity in rat CA1 hippocampal stratum oriens-alveus interneurons. *Journal of Physiology*, v. 497, p. 119–130, 1996.
- [MacDonald, Porietis e Wojtowicz 1982]MACDONALD, J.; PORIETIS, A.; WOJTOWICZ, J. L-Aspartic acid induces a region of negative slope conductance in the current-voltage relationship of cultured spinal cord neurons. *Brain Research*, v. 237, p. 248–253, 1982.
- [Magee 1998]MAGEE, J. Dendritic hyperpolarization-activated currents modify the integrative properties of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Journal of Neuroscience*, v. 18, p. 7613–7624, 1998.
- [Magistretti, Ragsdale e Alonso 1999]MAGISTRETTI, J.; RAGSDALE, D.; ALONSO, A. High conductance sustained single-channel activity responsible for the low-threshold persistent Na⁺ current in entorhinal cortex neurons. *Journal of Neuroscience*, v. 19, p. 7334–7341, 1999.
- [Manuel et al. 2007]MANUEL, M. et al. Resonant or not, two amplification modes of proprioceptive inputs by persistent inward currents in spinal motoneurons. *Journal of Neuroscience*, v. 27, p. 12977–12988, 2007.
- [Marder e Goaillard 2006]MARDER, E.; GOAILLARD, J. Variability, compensation and homeostasis in neuron and network function. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 7, p. 563–74, 2006.
- [Marder, O’Leary e Shruti 2014]MARDER, E.; O’LEARY, T.; SHRUTI, S. Neuromodulation of circuits with variable parameters: single neurons and small circuits reveal principles of state-dependent and robust neuromodulation. *Annual Review of Neuroscience*, v. 37, p. 329–46, 2014.

- [Marder e Prinz 2002]MARDER, E.; PRINZ, A. A. Modeling stability in neuron and network function: the role of activity in homeostasis. *Bioessays*, v. 24, p. 1145–1154, 2002.
- [Masi et al. 2015]MASI, A. et al. Differential contribution of Ih to the integration of excitatory synaptic inputs in substantia nigra pars compacta and ventral tegmental area dopaminergic neurons. *European Journal of Neuroscience*, v. 42, p. 2699–706, 2015.
- [Mathews et al. 2010]MATHEWS, P. et al. Control of submillisecond synaptic timing in binaural coincidence detectors by Kv1 channels. *Nature Neuroscience*, v. 13, p. 601–609, 2010.
- [May 2000]MAY, B. J. Role of the dorsal cochlear nucleus in the sound localization behavior of cats. *Hearing Research*, v. 148, p. 74–87, 2000.
- [McCormick e Huguenard 1992]MCCORMICK, D.; HUGUENARD, J. A model of the electrophysiological properties of thalamocortical relay neurons. *Journal of Neurophysiology*, v. 68, p. 1384–1400, 1992.
- [Megias et al. 2001]MEGIAS, M. et al. Total number and distribution of inhibitory and excitatory synapses on hippocampal CA1 pyramidal cells. *Neuroscience*, v. 102, p. 527–540, 2001.
- [Moore, Buchanan e Murphey 1994]MOORE, L.; BUCHANAN, J.; MURPHEY, C. Anomalous increase in membrane impedance of neurons during NMDA activation. In: *Computation in Neurons and Neural Systems*. [S.l.]: Kluwer Academic, Boston, 1994. p. 9–14.
- [Moore, Buchanan e Murphey 1995]MOORE, L.; BUCHANAN, J.; MURPHEY, C. Localization and interaction of N-methyl-D-aspartate and non-N-methyl-D-aspartate receptors of lamprey spinal neurons. *Biophysical Journal*, v. 68, p. 96–103, 1995.
- [Nagtegaal e Borst 2010]NAGTEGAAL, A. P.; BORST, J. G. G. In vivo dynamic clamp study of ih in the mouse inferior colliculus. *Journal of neurophysiology*, v. 104, p. 940–948, 2010.

- [Nisenbaum e Wilson 1995]NISENBAUM, E.; WILSON, C. Potassium current responsible for inward and outward rectification in rat neostriatal spiny projection neurons. *Journal of Neuroscience*, v. 15, p. 4449–4463, 1995.
- [Oertel e Young 2004]OERTEL, D.; YOUNG, E. What's a cerebellar circuit doing in the auditory system? *Trends in Neurosciences*, v. 27, p. 104–110, 2004.
- [O'Leary et al. 2013]O'LEARY, T. et al. Correlations in ion channel expression emerge from homeostatic tuning rules. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v. 110, p. 2645–54, 2013.
- [Osen 1969]OSEN, K. K. Cytoarchitecture of the cochlear nuclei in the cat. *Journal of Comparative Neurology*, v. 136, p. 453–483, 1969.
- [Paál et al. 2003]PAÁL, B. et al. HCN channels contribute to the intrinsic activity of cochlear pyramidal cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 60, p. 2189–2199, 2003.
- [Pape e Driesang 1998]PAPE, H.; DRIESANG, R. Ionic mechanisms of intrinsic oscillations in neurons of the basolateral amygdaloid complex. *Journal of Neurophysiology*, v. 79, p. 217–226, 1998.
- [Paxinos e Watson 2007]PAXINOS, G.; WATSON, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, 6th Ed.* [S.l.]: Elsevier Academic Press, San Diego., 2007.
- [Pennartz, Bierlaagh e Geurtsen 1997]PENNARTZ, C.; BIERLAAGH, M.; GEURTSSEN, A. Cellular mechanisms underlying spontaneous firing in rat suprachiasmatic nucleus: involvement of a slowly inactivating component of sodium current. *Journal of Neurophysiology*, v. 78, p. 1811–1825, 1997.
- [Pilati et al. 2012]PILATI, N. et al. Acoustic over-exposure triggers burst firing in dorsal cochlear nucleus fusiform cells. *Hearing Research*, v. 283, p. 98–106, 2012.
- [Poolos, Bullis e Roth 2006]POOLOS, N.; BULLIS, J.; ROTH, M. Modulation of h-channels in hippocampal pyramidal neurons by p38 mitogen-activated protein kinase. *The Journal of Neuroscience*, v. 26, p. 7995–8003, 2006.

- [Prescott e Koninck 2005]PRESCOTT, S.; KONINCK, Y. D. Integration time in a subset of spinal lamina I neurons is lengthened by sodium and calcium currents acting synergistically to prolong subthreshold depolarization. *Journal of Neuroscience*, v. 25, p. 4743–4754, 2005.
- [Qu et al. 2001]QU, Y. et al. Differential modulation of sodium channel gating and persistent sodium currents by the $\beta 1$, $\beta 2$, and $\beta 3$ subunits. *Molecular and Cellular Neuroscience*, v. 18, p. 570–580, 2001.
- [Raman, Gustafson e Padgett 2000]RAMAN, I.; GUSTAFSON, A.; PADGETT, D. Ionic currents and spontaneous firing in neurons isolated from the cerebellar nuclei. *Journal of Neuroscience*, v. 20, p. 9004–9016, 2000.
- [Ransdell, Nair e Schulz 2013]RANSDELL, J.; NAIR, S.; SCHULZ, D. Neurons within the same network independently achieve conserved output by differentially balancing variable conductance magnitudes. *Journal of Neuroscience*, v. 33, p. 9950–56, 2013.
- [Remme 2015]REMME, M. Quasi-active approximation of nonlinear dendritic cables. In: *Encyclopedia of Computational Neuroscience*. [S.l.: s.n.], 2015. p. 2553–2556.
- [Remme e Rinzel 2011]REMME, M.; RINZEL, J. Role of active dendritic conductances in subthreshold input integration. *Journal of Computational Neuroscience*, v. 31, p. 13–30, 2011.
- [Ren 2011]REN, D. Sodium leak channels in neuronal excitability and rhythmic behaviors. *Neuron*, v. 72, p. 899–911, 2011.
- [Requarth e Sawtell 2011]REQUARTH, T.; SAWTELL, N. B. Neural mechanisms for filtering self-generated sensory signals in cerebellum-like circuits. *Current Opinion in Neurobiology*, v. 21, p. 602–608, 2011.
- [Rodrigues e Oertel 2006]RODRIGUES, A.; OERTEL, D. Hyperpolarization-activated currents regulate excitability in stellate cells of the mammalian ventral cochlear nucleus. *Journal of Neurophysiology*, v. 95, p. 76–87, 2006.

- [Rosenkranz e Johnston 2007]ROSENKRANZ, J.; JOHNSTON, D. State-dependent modulation of amygdala inputs by dopamine-induced enhancement of sodium currents in layer v entorhinal cortex. *Journal of Neuroscience*, v. 27, p. 7054–7069, 2007.
- [Rotaru, Lewis e Burgos 2007]ROTARU, D.; LEWIS, D.; BURGOS, G. G. Dopamine D1 receptor activation regulates sodium channel dependent EPSP amplification in rat prefrontal cortex pyramidal neurons. *Journal of Physiology*, v. 581, p. 981–1000, 2007.
- [Rusznák et al. 2013]RUSZNÁK, Z. et al. The hyperpolarization-activated non-specific cation current (I_h) adjusts the membrane properties, excitability, and activity pattern of the giant cells in the rat dorsal cochlear nucleus. *European Journal of Neuroscience*, v. 37, p. 876–890, 2013.
- [Sabah e Leibovic 1969]SABAH, N.; LEIBOVIC, K. Subthreshold oscillatory responses of the Hodgkin-Huxley cable model for the squid giant axon. *Biophysical Journal*, v. 9, p. 1206–1222, 1969.
- [SaintMleux e Moore 2000]SAINTMLEUX, B.; MOORE, L. Active dendritic membrane properties of xenopus larval spinal neurons analyzed with a whole cell soma voltage clamp. *Journal of Neurophysiology*, v. 83, p. 1381–1393, 2000.
- [Schulz, Goaillard e Marder 2006]SCHULZ, D.; GOAILLARD, J.; MARDER, E. Variable channel expression in identified single and electrically coupled neurons in different animals. *Nature Neuroscience*, v. 9, p. 356–362, 2006.
- [Schulz, Goaillard e Marder 2007]SCHULZ, D.; GOAILLARD, J.; MARDER, E. Quantitative expression profiling of identified neurons reveals cell-specific constraints on highly variable levels of gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v. 104, p. 13187–13191, 2007.
- [Schwartzkroin 1975]SCHWARTZKROIN, P. A. Characteristics of ca1 neurons recorded intracellularly in the hippocampal in vitro slice preparation. *Brain Research*, v. 85, p. 423–436, 1975.

- [Schwindt e Crill 1995]SCHWINDT, P.; CRILL, W. Amplification of synaptic current by persistent sodium conductance in apical dendrite of neocortical neurons. *Journal of Neurophysiology*, v. 74, p. 2220–2224, 1995.
- [Scott, Mathews e Golding 2010]SCOTT, L.; MATHEWS, P.; GOLDING, N. Perisomatic voltage-gated sodium channels actively maintain linear synaptic integration in principal neurons of the medial superior olive. *Journal of Neuroscience*, v. 30, p. 2039–2050, 2010.
- [Shore e Zhou 2006]SHORE, S. E.; ZHOU, J. Somatosensory influence on the cochlear nucleus and beyond. *Hearing Research*, v. 216, p. 90–99, 2006.
- [Singla et al. 2017]SINGLA, S. et al. A cerebellum-like circuit in the auditory system cancels responses to self-generated sounds. *Nature Neuroscience*, v. 20, n. 7, p. 943–950, 2017.
- [Sobie 2009]SOBIE, E. Parameter sensitivity analysis in electrophysiological models using multivariable regression. *Biophysical Journal*, v. 96, p. 1264–1274, 2009.
- [Stafstrom 2007]STAFSTROM, C. Persistent sodium current and its role in epilepsy. *Epilepsy Currents*, v. 7, p. 15–22, 2007.
- [Stafstrom et al. 1985]STAFSTROM, C. et al. Properties of persistent sodium conductance and calcium conductance of layer v neurons from cat sensorimotor cortex in vitro. *Journal of Neurophysiology*, v. 53, p. 153–170, 1985.
- [Stafstrom, Schwindt e Crill 1982]STAFSTROM, C.; SCHWINDT, P.; CRILL, W. Negative slope conductance due to a persistent subthreshold sodium current in cat neocortical neurons in vitro. *Brain Research*, v. 236, p. 221–226, 1982.
- [Sterratt et al. 2011]STERRATT, D. et al. *Principles of computational modelling in neuroscience*. [S.l.]: Cambridge University Press, 2011.
- [Storm-Mathisen 1977]STORM-MATHISEN, J. Localization of transmitter candidates in the brain: the hippocampal formation as a model. *Progress in Neurobiology*, v. 8, p. 119–181, 1977.

- [Stuart 1999]STUART, G. Voltage activated sodium channels amplify inhibition in neocortical pyramidal neurons. *Nature Neuroscience*, v. 2, p. 144–150, 1999.
- [Stuart e Sakmann 1995]STUART, G.; SAKMANN, B. Amplification of EPSPs by axosomatic sodium channels in neocortical pyramidal neurons. *Neuron*, v. 15, p. 1065–1076, 1995.
- [Sun et al. 2014]SUN, H. et al. Resonance properties of GABAergic interneurons in immature GAD67 GFP mouse neocortex. *Brain Research*, v. 1548, p. 1–11, 2014.
- [Surges, Freiman e Feuerstein 2003]SURGES, R.; FREIMAN, T.; FEUERSTEIN, T. Gabapentin increases the hyperpolarization activated cation current I_h in rat CA1 pyramidal cells. *Epilepsia*, v. 44, p. 150–156, 2003.
- [Surges, Freiman e Feuerstein 2004]SURGES, R.; FREIMAN, T.; FEUERSTEIN, T. Input resistance is voltage dependent due to activation of I_h channels in rat CA1 pyramidal cells. *Journal of Neuroscience Research*, v. 76, p. 475–480, 2004.
- [Sutor, Jordan e Zieglgansberger 1987]SUTOR, B.; JORDAN, W.; ZIEGLGANSBERGER, W. Evidence for a magnesium insensitive membrane resistance increase during NMDA induced depolarizations in rat neocortical neurons in vitro. *Neuroscience Letters*, v. 75, p. 317–322, 1987.
- [Swensen e Bean 2005]SWENSEN, A.; BEAN, B. Robustness of burst firing in dissociated purkinje neurons with acute or long term reductions in sodium conductance. *Journal of Neuroscience*, v. 25, p. 3509–3520, 2005.
- [Tamagnini et al. 2015]TAMAGNINI, F. et al. Altered intrinsic excitability of hippocampal CA1 pyramidal neurons in aged PDAPP mice. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, v. 9, 2015.
- [Tang e Trussell 2015]TANG, Z. Q.; TRUSSELL, L. O. Serotonergic regulation of excitability of principal cells of the dorsal cochlear nucleus. *The Journal of Neuroscience*, v. 35, p. 4540–4551, 2015.

- [Taylor, Goaillard e Marder 2009]TAYLOR, A.; GOAILLARD, J.; MARDER, E. How multiple conductances determine electrophysiological properties in a multicompartment model. *Journal of Neuroscience*, v. 29, p. 5573–5586, 2009.
- [Thomson, Girdlestone e West 1988]THOMSON, A.; GIRDLESTONE, D.; WEST, D. Voltage dependent currents prolong single axon postsynaptic potentials in layer III pyramidal neurons in rat neocortical slices. *Journal of Neurophysiology*, v. 60, p. 1896–1907, 1988.
- [Tripathy et al. 2014]TRIPATHY, S. et al. Neuroelectro: a window to the world’s neuron electrophysiology data. *Frontiers in Neuroinformatics*, v. 8, 2014.
- [Urban, Henze e Barrionuevo 1998]URBAN, N.; HENZE, D.; BARRIONUEVO, G. Amplification of perforant-path EPSPs in CA3 pyramidal cells by LVA calcium and sodium channels. *Journal of Neurophysiology*, v. 80, p. 1558–1561, 1998.
- [vanStrien, Cappaert e Witter 2009]VANSTRIEN, N.; CAPPAERT, N.; WITTER, M. The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 10, p. 272–282, 2009.
- [vanWelie, vanHooft e Wadman 2004]VANWELIE, I.; VANHOOFT, J.; WADMAN, W. Homeostatic scaling of neuronal excitability by synaptic modulation of somatic hyperpolarization-activated Ih channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 101, p. 5123–5128, 2004.
- [Vervaeke et al. 2006]VERVAEKE, K. et al. Contrasting effects of the persistent Na⁺ current on neuronal excitability and spike timing. *Neuron*, v. 49, p. 257–270, 2006.
- [WahlSchott e Biel 2009]WAHLSCOTT, C.; BIEL, M. HCN channels: structure, cellular regulation and physiological function. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 66, p. 470–494, 2009.
- [Waller e Godfrey 1994]WALLER, H. J.; GODFREY, D. A. Functional characteristics of spontaneously active neurons in rat dorsal cochlear nucleus in vitro. *Journal of Neurophysiology*, v. 71, p. 467–478, 1994.

- [Waters e Helmchen 2006]WATERS, J.; HELMCHEN, F. Background synaptic activity is sparse in neocortex. *Journal of Neuroscience*, v. 26, p. 8267–8277, 2006.
- [Wei et al. 2010]WEI, L. et al. Effects of sodium salicylate on spontaneous and evoked spike rate in the dorsal cochlear nucleus. *Hearing research*, v. 267, p. 54–60, 2010.
- [Wessel, Kristan e Kleinfeld 1999]WESSEL, R.; KRISTAN, W.; KLEINFELD, D. Supralinear summation of synaptic inputs by an invertebrate neuron: dendritic gain is mediated by an inward rectifier K⁺ current. *Journal of Neuroscience*, v. 19, p. 5875–5888, 1999.
- [Williams e Stuart 2003]WILLIAMS, S.; STUART, G. Voltage-and site-dependent control of the somatic impact of dendritic IPSPs. *Journal of Neuroscience*, v. 23, p. 7358–7367, 2003.
- [Wilson 2005]WILSON, C. The mechanism of intrinsic amplification of hyperpolarizations and spontaneous bursting in striatal cholinergic interneurons. *Neuron*, v. 45, p. 575–585, 2005.
- [Wu et al. 2005]WU, N. et al. Persistent sodium currents in mesencephalic V neurons participate in burst generation and control of membrane excitability. *Journal of Neurophysiology*, v. 93, p. 2710–2722, 2005.
- [Yamada-Hanff e Bean 2013]YAMADA-HANFF, J.; BEAN, B. Persistent sodium current drives conditional pacemaking in ca1 pyramidal neurons under muscarinic stimulation. *Journal of Neuroscience*, v. 33, p. 15011–1502, 2013.
- [Yamada-Hanff e Bean 2015]YAMADA-HANFF, J.; BEAN, B. Activation of I_h and TTX-sensitive sodium current at subthreshold voltages during CA1 pyramidal neuron firing. *Journal of Neurophysiology*, v. 114, p. 2376–2389, 2015.
- [Yamada et al. 2005]YAMADA, R. et al. Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channels regulate auditory coincidence detection in nucleus laminaris of the chick. *The Journal of Neuroscience*, v. 25, p. 8867–8877, 2005.

- [Yamashita e Isa 2004]YAMASHITA, T.; ISA, T. Enhancement of excitatory postsynaptic potentials by preceding application of acetylcholine in mesencephalic dopamine neurons. *Neuroscience Research*, v. 49, p. 91–100, 2004.
- [Yang et al. 2009]YANG, R. et al. Gabapentin selectively reduces persistent sodium current in injured type-A dorsal root ganglion neurons. *Pain*, v. 143, p. 48–55, 2009.
- [Yaron-Jakoubovitch et al. 2008]YARON-JAKOUBOVITCH, A. et al. A paradoxical isopotentiality: a spatially uniform noise spectrum in neocortical pyramidal cells. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, v. 2, 2008.
- [Yoshii, Moore e Christensen 1988]YOSHII, K.; MOORE, L.; CHRISTENSEN, B. Effect of subthreshold voltage-dependent conductances on the transfer function of branched excitable cells and the conduction of synaptic potentials. *Journal of Neurophysiology*, v. 59, p. 706–716, 1988.
- [Young e Davis 2002]YOUNG, E. D.; DAVIS, K. A. Circuitry and function of the dorsal cochlear nucleus. In: *Integrative functions in the mammalian auditory pathway*. [S.l.]: Springer, 2002. p. 160–206.
- [Zhang e Oertel 1994]ZHANG, S.; OERTEL, D. Neuronal circuits associated with the output of the dorsal cochlear nucleus through fusiform cells. *Journal of Neurophysiology*, v. 71, p. 914–930, 1994.
- [Zhou et al. 2009]ZHOU, M. et al. TWIK-1 and TREK-1 are potassium channels contributing significantly to astrocyte passive conductance in rat hippocampal slices. *Journal of Neuroscience*, v. 29, p. 8551–8564, 2009.
- [Zsiros e Hestrin 2005]ZSIROS, V.; HESTRIN, S. Background synaptic conductance and precision of EPSP-spike coupling at pyramidal cells. *Journal of Neurophysiology*, v. 93, p. 3248–3256, 2005.
- [Zugaib, Ceballos e Leao 2016]ZUGAIB, J.; CEBALLOS, C.; LEAO, R. High doses of salicylate reduces glycinergic inhibition in the dorsal cochlear nucleus of the rat. *Hearing Research*, v. 332, p. 188–98, 2016.