

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**EFFECTOS DEL HIPOTIROIDISMO SOBRE LA  
EXCITABILIDAD INTRÍNSECA EN EL HIPOCAMPO DE  
RATA EN DESARROLLO**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

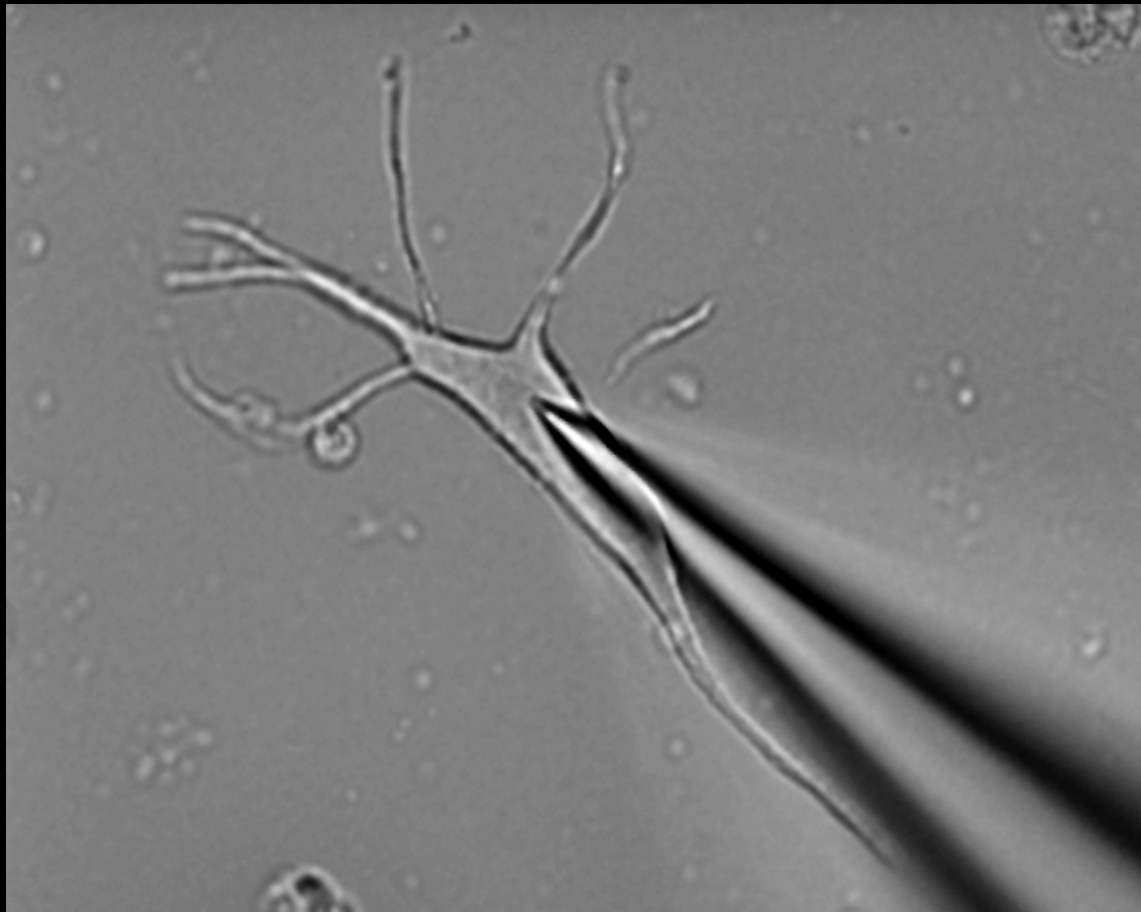
**José Luis Sánchez-Alonso Mardones**

**Madrid, 2012**



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE BIOLOGÍA

**EFECTOS DEL HIPOTIROIDISMO SOBRE  
LA EXCITABILIDAD INTRÍNSECA EN EL  
HIPOCAMPO DE RATA EN DESARROLLO**



TESIS DOCTORAL

JOSÉ LUIS SÁNCHEZ ALONSO-MARDONES

MADRID, 2012

## ABREVIATURAS

4-AP	4-Aminopiridina
ADP	Despolarización postpotencial ( <i>alter depolarization potential</i> )
BAPTA	Ácido 1,2-bis (2 aminofenoxi) etano-N,N,N',N'-tetraacético
BS	Tipo de disparo en ráfaga ( <i>burst spiking</i> )
C <sub>m</sub>	Capacidad de membrana
CNQX	6-ciano-7-nitroquinoxalino-2,3-diona
EGTA	Ácido tetraacético etilenglicol
HVA	Canales que se activan a alto umbral ( <i>high-voltage activated</i> )
I <sub>A</sub>	Corriente A de potasio
I <sub>D</sub>	Corriente D de potasio
I <sub>M</sub>	Corriente M de potasio
I <sub>T</sub>	Corriente T de calcio
ISI	Intervalo de tiempo entre espigas ( <i>interspike interval</i> )
KRB	Krebs-Ringer-Bicarbonato
LVA	Canales que se activan a bajo umbral ( <i>low-voltage activated</i> )
P9-19	Ratas de edad comprendida entre 9 y 19 días postnatales
PA	Potencial de acción
PBS	Tampón fosfato salino
PKA	Proteína quinasa A
PKC	Proteína quinasa C
PTX	Picrotoxina
R <sub>m</sub>	Resistencia de membrana
RS	Tipo de disparo regular ( <i>regular spiking</i> )
τ	Constante de tiempo de membrana
T3	Hormona tiroidea (3,5,3'-L-triyodotironina)
TEA	Tetraetilamonio
TRs	Receptores de hormona tiroidea
TX	Grupo hipotiroideo
TX+T3	Grupo hipotiroideo tratado con T3
TTX	Tetrodotoxina
V <sub>m</sub>	Potencial de membrana en reposo

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1. Hormona tiroidea	2
1.1. Síntesis y estructura	2
1.2. Acciones genómicas a través de receptores	3
1.3. Acciones no genómicas	5
2. Hipotiroidismo	6
2.1. Modelo de roedor para el estudio del hipotiroidismo	7
2.2. Efectos del hipotiroidismo sobre el hipocampo	9
3. Hipocampo: estructura y función	12
4. El potencial de acción	14
4.1. Bases del estudio de potencial de acción	14
4.2. Canales que intervienen en el potencial de acción	15
5. Patrón de disparo de las neuronas piramidales de CA1	17
5.1. Patrón de disparo regular o en ráfaga	17
5.2. Generación del disparo en ráfaga por una despolarización postpotencial	18
5.3. Patrón de disparo durante el desarrollo	20
6. Excitabilidad intrínseca	22
6.1. Plasticidad de la excitabilidad intrínseca	22
6.1.1. Plasticidad intrínseca en las dendritas	24
6.1.2. Plasticidad intrínseca en el soma: umbral del potencial de acción	24
6.1.3. Plasticidad intrínseca en el disparo repetitivo	24
6.2. Efectos funcionales de la plasticidad intrínseca	25
7. Canales dependientes de voltaje	26
7.1. Canales dependientes de voltaje de calcio	26
7.1.1. Corriente T	27
7.2. Canales dependientes de voltaje de potasio	29
7.2.1. Corriente D	30
7.2.2. Corriente A	31

## **2. OBJETIVOS**

**34**

<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>36</b>
1. Animales de experimentación	37
2. Obtención de las rodajas y células disociadas de hipocampo	39
3. Cámara de mantenimiento	41
4. Unidad de registro	42
5. Soluciones intracelulares	43
6. Reactivos y drogas	44
7. Técnicas electrofisiológicas	45
7.1. Técnica de <i>patch-clamp</i>	45
7.1.1. Registro en rodaja	45
7.1.2. Registro de células disociadas	46
7.2. Registro en fijación de corriente	47
7.3. Registro en fijación de voltaje	48
8. Análisis de los registros	49
8.1. Medición de las propiedades básicas de membrana en células en rodaja	49
8.2. Clasificación del patrón de disparo	50
8.3. Medición de los parámetros del potencial de acción (PA)	51
8.4. Medición de los parámetros de la despolarización postpotencial (ADP)	52
8.5. Medición de la conductancia de corriente en los experimentos en fijación de voltaje	53
8.6. Obtención de las constantes de tiempo de caída de las corrientes en los experimentos en fijación de voltaje	54
8.7. Obtención de las gráficas de activación	55
8.8. Medición de la carga total de corriente D-like	56
9. Análisis de imagen	57
10. Análisis estadístico	58
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>59</b>
1. Efectos del hipotiroidismo sobre las propiedades básicas de la membrana neuronal	60
1.1. Propiedades de membrana de neuronas registradas en rodaja	60
1.1.1. Potencial de membrana en reposo	60

1.1.2. Resistencia de membrana	61
1.1.3. Constante de tiempo de la membrana	61
1.1.4. Capacidad de membrana	62
1.1.5. Cambios durante el desarrollo	62
1.2. Propiedades básicas de membrana de neuronas disociadas	63
1.2.1. Potencial de membrana en reposo	63
1.2.2. Resistencia de membrana	64
1.2.3. Capacidad de membrana	65
1.2.4. Constante de tiempo de la membrana	65
1.2.5. Cambios durante el desarrollo	66
1.2.6. Estudio morfológico de las neuronas disociadas	67
<b>2. Efectos del hipotiroidismo sobre la excitabilidad intrínseca</b>	<b>69</b>
2.1. Modificaciones en el patrón de disparo de los potenciales de acción	69
2.2. Alteraciones en la frecuencia de descarga de los potenciales de acción	73
<b>3. Efectos del hipotiroidismo sobre la morfología del potencial de acción</b>	<b>77</b>
3.1. Efectos del hipotiroidismo y el desarrollo sobre los distintos parámetros del potencial de acción	77
3.2. Efectos del hipotiroidismo sobre el PA en su relación con el tipo de disparo	82
3.3. Efectos del hipotiroidismo y el desarrollo sobre el ensanchamiento del potencial de acción o <i>broadening</i> durante el disparo repetitivo	83
<b>4. Efectos del hipotiroidismo sobre la despolarización postpotencial o ADP</b>	<b>86</b>
4.1. Diferencias en el ADP entre células que disparan con un patrón en ráfaga (BS) o regular (RS)	86
4.2. Efectos del hipotiroidismo y el desarrollo sobre los distintos parámetros de la despolarización postpotencial	87
4.3. Estudio de las corrientes implicadas en la formación del ADP en animales controles e hipotiroideos	89
4.4. Efectos del níquel sobre el patrón de disparo y su relación con el ADP	91
<b>5. Efectos del hipotiroidismo sobre la corriente de tipo T de calcio</b>	<b>93</b>
5.1. Estudio de la densidad máxima de corriente T al pico	95
5.2. Estudio de la relación corriente-voltaje de la corriente T	96
5.3. Estudio de las curvas de activación de la corriente T	97
5.4. Estudio de la cinética de inactivación de la corriente T	98
5.5. Estudio de la corriente T durante el desarrollo	99

6. Efectos del hipotiroidismo sobre la corriente de tipo D de potasio	101
6.1. Estudio de la densidad de corriente D-like al pico	102
6.2. Estudio de la relación corriente-voltaje de la corriente D-like	103
6.3. Estudio de las curvas de activación de la corriente D-like	103
6.4. Estudio de la cinética de inactivación de la corriente D-like	104
6.5. Estudio de la densidad de carga total de la corriente D-like	105
6.6. Estudio de la corriente D-like durante el desarrollo	106
7. Efectos del hipotiroidismo sobre la corriente de tipo A de potasio	107
7.1. Estudio de la densidad de corriente A al pico aislada por un prepulso de inactivación	107
7.2. Estudio de la densidad de corriente A al pico aislada por farmacología	109
7.3. Estudio de la cinética de inactivación de la corriente A	111
7.4. Estudio de las curvas de activación e inactivación de la corriente A	112
7.5. Estudio de la corriente A durante el desarrollo	114

## 5. DISCUSIÓN

115

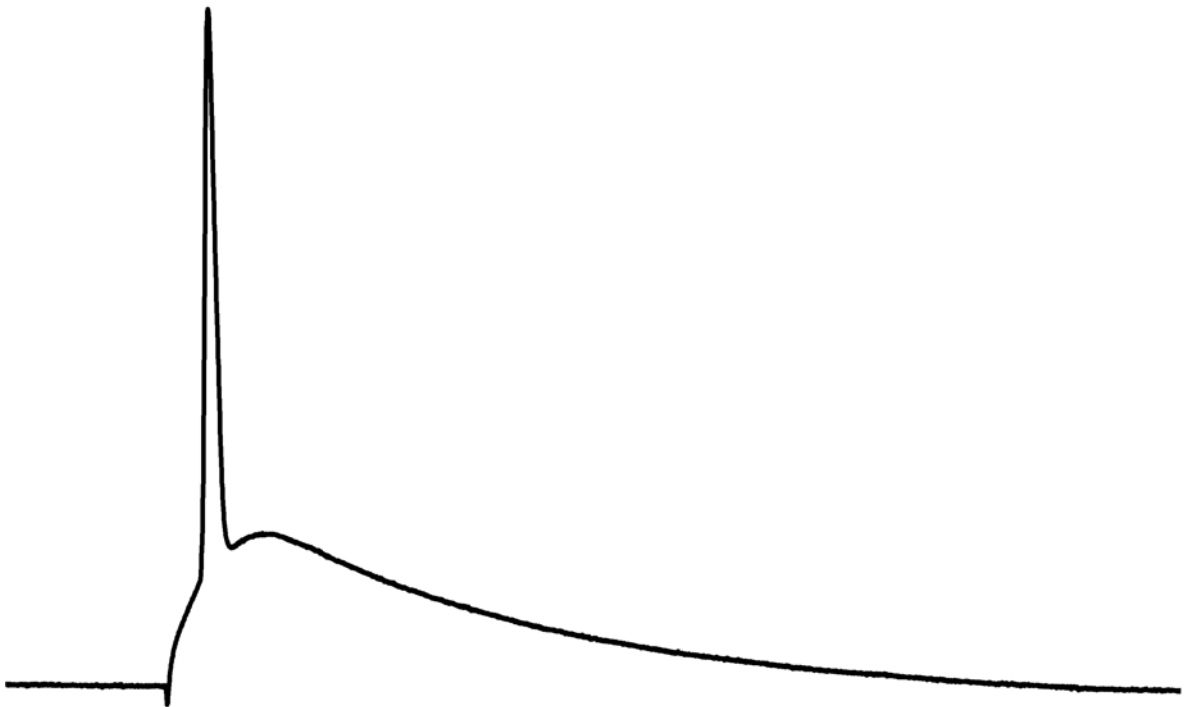
1. El hipotiroidismo altera las propiedades de membrana en reposo	116
1.1. Despolarización del potencial de membrana en reposo	116
1.2. Aumento de la resistencia y disminución de la capacidad de membrana	118
1.3. La constante de tiempo de membrana no varía	119
1.4. Efectos sobre la excitabilidad neuronal	120
2. Elementos responsables de las altas raciones en el patrón de disparo en las neuronas hipotiroideas	121
2.1. Importancia del disparo en ráfaga	121
2.2. La morfología del potencial de acción no está implicada en las diferencias en el patrón de disparo	122
2.3. La despolarización post potencial está implicada en las diferencias en el patrón de disparo	122
2.4. Modelo para la generación del disparo en ráfaga	124
3. Alteraciones en la excitabilidad neuronal y su relación con la morfología del potencial de acción	125
3.1. La morfología del potencial de acción se encuentra alterada en el hipotiroidismo	126
3.2. El <i>broadening</i> aumenta en ausencia de hormona tiroidea y disminuye durante el desarrollo	128

4. Alteraciones en canales dependientes de voltaje y su relación con la excitabilidad intrínseca	130
4.1. La corriente T de calcio disminuye en ausencia de hormona tiroidea	130
4.2. Corrientes de potasio: la corriente A aumenta en ausencia de hormona tiroidea, enmascarando los efectos funcionales de la leve disminución de la corriente D	133
4.3. Hipótesis sobre la regulación de estos canales a través de proteínas quinasas y su posible alteración en el hipotiroidismo	135
5. Excitabilidad intrínseca	135
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>136</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>139</b>

## Índice de Figuras y Tablas

Figura 1.....	3	Figura 28.....	78	Tabla 1 .....	40
Figura 2.....	8	Figura 29.....	80	Tabla 2 .....	43
Figura 3.....	13	Figura 30.....	84	Tabla 3 .....	60
Figura 4.....	20	Figura 31.....	87	Tabla 4.....	61
Figura 5.....	23	Figura 32.....	88	Tabla 5 .....	61
Figura 6.....	38	Figura 33.....	91	Tabla 6 .....	62
Figura 7.....	41	Figura 34.....	92	Tabla 7 .....	62
Figura 8.....	42	Figura 35.....	93	Tabla 8 .....	64
Figura 9.....	45	Figura 36.....	94	Tabla 9 .....	64
Figura 10.....	47	Figura 37.....	96	Tabla 10 .....	65
Figura 11.....	50	Figura 38.....	97	Tabla 11 .....	66
Figura 12.....	52	Figura 39.....	98	Tabla 12 .....	67
Figura 13.....	53	Figura 40.....	99	Tabla 13 .....	67
Figura 14.....	54	Figura 41 .....	101	Tabla 14 .....	68
Figura 15.....	55	Figura 42.....	102	Tabla 15 .....	78
Figura 16.....	56	Figura 43.....	103	Tabla 16 .....	79
Figura 17.....	57	Figura 44.....	104	Tabla 17 .....	81
Figura 18.....	69	Figura 45.....	105	Tabla 18.....	81
Figura 19.....	70	Figura 46.....	108	Tabla 19 .....	82
Figura 20.....	71	Figura 47.....	108	Tabla 20 .....	83
Figura 21.....	72	Figura 48.....	109	Tabla 21 .....	98
Figura 22.....	72	Figura 49.....	110	Tabla 22 .....	104
Figura 23.....	73	Figura 50.....	112	Tabla 23 .....	111
Figura 24.....	74	Figura 51.....	113	Tabla 24.....	113
Figura 25.....	75	Figura 52.....	120	Tabla 25 .....	114
Figura 26.....	75	Figura 53.....	129		
Figura 27.....	76				

# 1. INTRODUCCIÓN



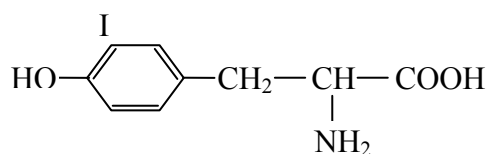
## 1. Hormona tiroidea

La hormona tiroidea T3 (3,5,3'-L-triyodotironina), producida por la glándula tiroidea, es esencial para el desarrollo, la diferenciación y el balance metabólico (Lazar et al., 1991; Zhang y Lazar, 2000; Zoeller et al., 2002). Las acciones de la hormona tiroidea en el organismo son diversas y derivan de un aumento de la actividad metabólica general. Se incluyen: regulación del metabolismo de glúcidos, lípidos y proteínas, regulación del crecimiento y regulación de la temperatura.

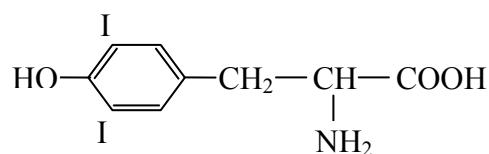
### 1.1. Síntesis y estructura

La presencia de yodo tiene un papel fundamental en la síntesis de hormona tiroidea. El metabolismo del yodo y la función tiroidea se hallan estrechamente ligados. Los iones yoduro (I<sup>-</sup>) ingeridos en la dieta son absorbidos a través del tracto gastrointestinal y llegan a través de la sangre hasta los folículos de la glándula tiroidea, donde se oxidan para formar yodo elemental (I<sub>2</sub>). El I<sub>2</sub> es utilizado para formar 3-monoyodotirosina (MIT) y 3,5-diyodotirosina (DIT), ligadas ambas a una globulina (tioglobulina). Dos moléculas de yodotirosina se unen para formar las hormonas tiroideas: 3,5,3'-triyodotironina (T3) (MIT + DIT) y 3,5,3',5'-tetrayodotironina o tiroxina (T4) (DIT + DIT) (Figura 1). Las hormonas tiroideas son liberadas al torrente sanguíneo, donde viajan asociadas a proteínas transportadoras, sobre todo a la  $\alpha$ -globulina. La secreción de hormonas tiroideas está regulada por el eje hipotalámico-hipofisario-tiroideo. Las concentraciones de T4 y T3 en suero se mantienen mediante una retroalimentación negativa que implica la inhibición, por parte de la T3, de la secreción de hormona liberadora de tirotrópica (TRH) en el hipotálamo y de la hormona estimulante del tiroides (TSH) en la hipófisis.

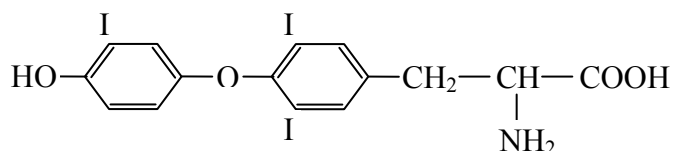
La homeostasis tiroidea en el cerebro es el resultado de diversas actividades: la producción de hormona por los folículos tiroideos; el transporte en el plasma; el paso transcápicular hacia los espacios extravasculares y la entrada en las células cerebrales y su metabolismo en el interior de las mismas. Este último paso es especialmente importante, dado que la T4 es convertida en T3 en las células del cerebro de una manera regulada. Por tanto, el cerebro juega un papel principal en la disponibilidad hormonal y en el modo en que se manejan las situaciones de hipo- o hipertiroidismo (Santos y Pérez-Castillo, 2000).



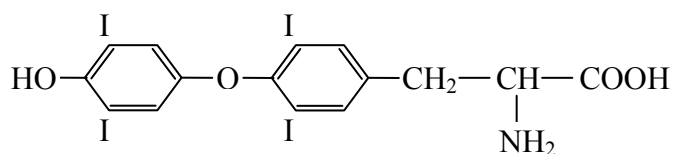
3-Monoyodotirosina (MIT)



3,5-Diyodotirosina (DIT)



3,5,3',5'-L-Tetrayodotironina (T4)



3,5,3',5'-L-Tetrayodotironina (T4 o tiroxina)

**Figura 1.** Estructura de las hormonas tiroideas y sus precursores.

## 1.2. Acciones genómicas a través de receptores

Las acciones genómicas de la hormona tiroidea se llevan a cabo a través de receptores nucleares que son específicos para T3. Por tanto, la principal función de la T4 es actuar como prohormona, siendo la T3 la hormona activa. Una vez en las células diana, la T4 es convertida en T3 por la acción de dos tipos de desyodasas. Los tipos 1 y 2 de desyodasa transforman la T4 y la T3 en T3 y 3,3'-T2 (3,3'-L-diyodotironina) respectivamente. La desyodasa 2 (D2) es responsable de la conversión de T4 a T3 en aquellos tejidos que presentan altos niveles de receptores nucleares, como el cerebro y el tejido adiposo pardo. La unión de la T3 con su receptor inicia una cascada de eventos nucleares que conduce a un aumento o una inhibición de la expresión de determinados genes (Oppenheimer y Schwartz, 1997). Estudios de hibridación *in situ* han mostrado que los astrocitos del tercer ventrículo y de la eminencia media son las células que expresan predominantemente el mRNA de D2 en el cerebro neonatal de rata (Guadaño-Ferraz et al., 1997). El hecho de que la neurona sea el tipo celular con los niveles más altos de

receptores de hormona tiroidea sugiere la existencia de un estrecho acoplamiento funcional entre astrocitos y neuronas: los astrocitos captarían la T4 del plasma, la convertirían en T3 y la liberarían para ser utilizada por las neuronas.

En la célula diana, los receptores de hormona tiroidea (TRs) se encuentran en el núcleo unidos constitutivamente a secuencias concretas de DNA, incluso en ausencia de hormona tiroidea (Lazar et al., 1991). Los receptores de la hormona tiroidea son factores de transcripción dependientes de ligando que pertenecen a una superfamilia de receptores nucleares (Evans, 1988) que también incluye a receptores para otros compuestos lipofílicos, como esteroides, ácido retinoico y vitamina D3, entre otros. Las secuencias a las que se unen los TRs se denominan elementos de respuesta a hormona tiroidea (TREs) y se localizan en los promotores de los genes diana de estas hormonas (Oppenheimer y Schwartz, 1997). El TR, en ausencia de T3, reprime la transcripción génica basal mediante el reclutamiento de un complejo co-represor. La unión del ligando (la T3) al TR altera su conformación de tal modo que el complejo co-represor se libera y se recluta un complejo co-activador. El complejo co-activador incluye, entre otras moléculas, múltiples histonas acetiltransferasas. Estas enzimas producen la hiperacetilación de las histonas de los octámeros de los nucleosomas, lo que hace que disminuya la interacción entre el DNA y los nucleosomas. Esto favorece la apertura de la cromatina y facilita el ensamblaje de la maquinaria de transcripción del DNA (Zhang y Lazar, 2000). En contraposición, el complejo co-represor incluye histona deacetilasas, cuya función es la opuesta. También se conoce que las hormonas tiroideas regulan la transcripción de mRNAs específicos de manera directa, y que de manera secundaria influyen en la síntesis proteica mediante el incremento del transporte de aminoácidos hacia el interior de las células del cerebro, influyendo asimismo sobre la síntesis de ribosomas y la estabilidad del mRNA (Porterfield y Hendrich, 1993).

En general las acciones genómicas de la hormona tiroidea necesitan que acceda al interior celular mediante la translocación de la hormona al núcleo, provocando alteraciones en las velocidades de transcripción génica, generación de mRNAs específicos y cambios en el contenido celular. Normalmente se necesitan varias horas para que estos mecanismos genéticos se manifiesten.

### 1.3. Acciones no genómicas

Los efectos genómicos de las hormonas tiroideas son bien conocidos, pero recientemente se ha empezado a prestar atención a los efectos no genómicos y la capacidad de las hormonas como moduladores de la actividad neuronal a través de proteínas distintas a los receptores clásicos (TRs), aunque no se conozca un papel fisiológico claro (Zhang y Lazar, 2000; Santisteban y Bernal, 2005).

Uno de los mejores ejemplos de una acción no genómica de las hormonas tiroideas es la regulación dinámica de la cantidad de fibras de actina en los astrocitos. Como consecuencia de una pérdida de filamentos de actina el astrocito no puede anclar laminina a su superficie celular, perdiendo la guía molecular que permite un crecimiento correcto de las neuritas y la migración neuronal (revisado por Leonard, 2008).

Algunas acciones no genómicas de la hormona se han atribuido a la isoforma truncada de TR y también al receptor de membrana plasmática, integrina  $\alpha V\beta 3$  (Davis et al., 2008). En el trabajo de Caria *et al.* (2009) se presentan evidencias de acciones no genómicas de la hormona tiroidea sobre la excitabilidad neuronal en giro dentado en ratas adultas *in vivo* y efectos antagónicos entre T4 y T3 en respuestas inducidas por noradrenalina en células de CA1 *in vitro*. Puia y Losi (2011) demostraron que tanto T3 como T4 afectan de forma selectiva a la neurotransmisión GABAérgica fásica y tónica, sugiriendo que la actividad neuronal del cerebro puede ser modulada de forma diferente en función de la cantidad relativa de estas dos hormonas.

## 2. Hipotiroidismo

Los niveles de hormona tiroidea en neonatales y niños tienen una gran importancia a largo plazo sobre su comportamiento, habilidad motora, lenguaje, audición y cognición (Chan y Kilby, 2000). Se suele hacer referencia a un período crítico en el que son absolutamente esenciales unos niveles correctos de hormona tiroidea para un desarrollo cerebral normal (Rovet et al., 1992). En los seres humanos este período comienza tardíamente en la gestación y se prolonga hasta uno o dos años de edad (Oklund y Timiras, 1977). En la rata, el equivalente se situó inicialmente en los primeros 10-12 días postparto (Oklund y Timiras, 1977), pero posteriormente el equivalente se tomó desde el día 18 de gestación hasta el día 21 postnatal (Dussault y Ruel, 1987). La deficiencia de hormona tiroidea durante este período crítico causa tal daño al desarrollo de la estructura y organización del cerebro que la terapia sustitutiva aplicada posteriormente nunca podrá corregirlo por completo (Porterfield y Hendrich, 1993; Koibuchi e Iwasaki, 2006). Si la hormona tiroidea no puede actuar durante esta ventana de desarrollo nunca se podrá tener una función normal, como se observa en el cerebelo (Koibuchi et al., 2003) o en la coclea (Karolyi et al., 2007).

Las hormonas tiroideas son imprescindibles sobre todo durante las últimas semanas de vida intrauterina. Cuando faltan las de origen fetal, sólo pueden ser sustituidas en parte por las maternas, aunque las cantidades de tiroxina que pasan de la circulación materna a la fetal a través de la placenta son muy reducidas. En este sentido hay que señalar que la permeabilidad de la placenta a las hormonas tiroideas varía entre las distintas especies (Oppenheimer y Schwartz, 1997). En la rata se ha detectado la presencia de T3 y T4 de origen materno antes del comienzo de la secreción de hormona tiroidea fetal (Obregon et al., 1984). En los seres humanos tanto T3 como T4 se han detectado en el cerebro antes de que la glándula tiroidea se vuelva activa, indicando que las hormonas tiroideas maternas juegan un papel importante en el desarrollo (Bernal y Pekonen, 1984; Sinha et al., 1997). Las hormonas tiroideas son fundamentales en el desarrollo cerebral en el primer y segundo trimestre (Chan y Kilby, 2000). La falta de hormona tiroidea durante la etapa prenatal provoca alteraciones cerebrales que ya no se pueden corregir después del nacimiento, mientras que en un hipotiroidismo que surja postnatalmente se puede impedir el

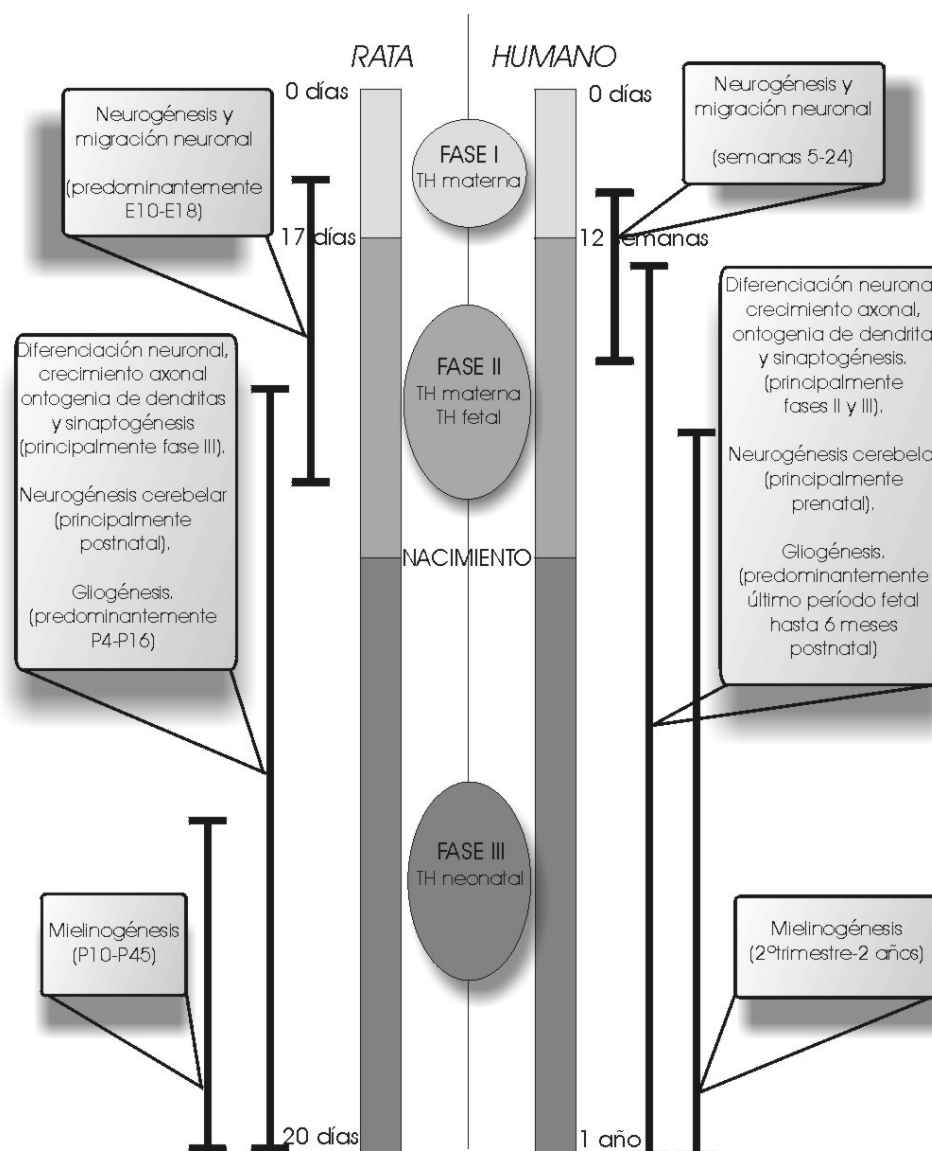
establecimiento de alteraciones cerebrales definitivas mediante una terapia hormonal sustitutiva.

## **2.1. Modelo de roedor para el estudio del hipotiroidismo**

El modelo del roedor es excelente siempre y cuando se comparen estados de desarrollo equivalentes entre el ser humano y la rata. La rata nace con un cerebro relativamente poco desarrollado y con el eje hipotalámico-hipofisario-tiroideo aún inmaduro (Oppenheimer y Schwartz, 1997). El estado del cerebro de la rata en el nacimiento se puede equiparar al del cerebro humano en el 5º o 6º mes de gestación (Dussault y Ruel, 1987), mientras que el cerebro de la rata en el día 10 postnatal está en un estado de desarrollo comparable al del cerebro humano en el momento del nacimiento. Por tanto, los estados de desarrollo que se producen en el último trimestre de gestación en el ser humano ocurren postnatalmente en la rata. Por esta razón, un gran número de trabajos experimentales sobre hormona tiroidea se han llevado a cabo en ratas neonatales (Porterfield y Hendrich, 1993).

Tanto en la rata como en el ser humano se diferencian tres fases en el desarrollo del sistema nervioso con respecto a la influencia de la hormona tiroidea (Porterfield y Hendrich, 1993):

- La fase I es el período del desarrollo que ocurre antes de la síntesis de hormonas tiroideas por parte del feto. Si el cerebro en desarrollo está expuesto a hormona tiroidea sólo puede ser de origen materno. Son los primeros 17 días de gestación en rata, o las primeras 10-12 semanas en el ser humano. No se conoce el papel de las hormonas tiroideas en el desarrollo neurológico en esta fase (Figura 2).
- La fase II es el período en el que la glándula tiroidea fetal sintetiza y libera activamente hormona tiroidea. El cerebro fetal, está expuesto a hormona fetal y, quizá, materna. Se produce migración neuronal en la fase I, pero hasta la fase II no se observa una maduración neuronal significativa, formación de neuritas o desarrollo sináptico en el prosencéfalo (Figura 2).



**Figura 2.** Esquema comparativo del desarrollo neurológico del cerebro con respecto a la función tiroidea en la rata y el ser humano. TH=hormonas tiroideas; E=edad embrionaria; P=edad postnatal. Adaptado de Porterfield y Hendrich, 1993.

- La fase III es el período postnatal. El cerebro depende de la tiroides del neonato. En el ser humano, los niveles de hormona tiroidea presentes en la leche no son suficientes para proporcionar protección al cerebro de un neonato atiroideo. En la rata, la fase III engloba una gran parte del período de proliferación neuronal, migración y diferenciación en el cerebelo. En el cerebro anterior, la neurogénesis y migración ya se han completado en este punto, pero es un importante período de maduración neuronal, crecimiento de neuritas, formación de sinapsis y mielinización (se sabe que todos estos procesos requieren unos niveles correctos de

hormona tiroidea). Dado que el cerebro humano se encuentra en un estado de desarrollo posterior al de la rata en el momento del nacimiento, la mayor parte de la proliferación, migración y diferenciación cerebelar en los seres humanos ocurre en la fase II, aunque aún continúan en la fase III. En los seres humanos, aunque la mielinización comienza en la fase II, la mayor parte de la gliogénesis y mielinización ocurren en la III (Figura 2).

Las hormonas tiroideas deben estar disponibles antes del denominado período crítico para que se produzca un desarrollo normal. Si la terapia sustitutiva se produce después de este período crítico la recuperación sólo será parcial (Chan y Kilby, 2000). Estudios de comportamiento en ratas ponen de manifiesto que la reversibilidad de los efectos de la tiroidectomía practicada en el nacimiento está directamente relacionada con la edad a la cual comienza la terapia. Si comienza antes de los días 10 a 15, la recuperación parece completa, pero si se pospone hasta el día 24, la recuperación sólo es parcial (Eayrs, 1960). Estos conocimientos apoyan la idea de que la deficiencia de hormona tiroidea puede originar cambios irreversibles y ponen de manifiesto que los fallos de la terapia sustitutiva en el tratamiento del hipotiroidismo congénito en el hombre son debidos a la deficiencia de hormona tiroidea en el útero.

## **2.2. Efectos del hipotiroidismo sobre el hipocampo**

Las hormonas tiroideas presentan efectos muy amplios sobre el sistema nervioso central. El hipotiroidismo puede conllevar cambios estructurales y funcionales especialmente durante el desarrollo del sistema nervioso, provocando un retraso mental. En general, en las ratas hipotiroideas los cuerpos celulares de las neuronas periféricas y centrales son más pequeños y están más empaquetados (Oppenheimer y Schwartz, 1997; Chan y Kilby, 2000). En ratas neonatas deficientes de hormona tiroidea desde el día 18 de gestación se ha observado una disminución en la arborización dendrítica en células piramidales y granulares del hipocampo (Rami et al., 1986b). Existe así mismo una disminución del volumen de fibras musgosas procedentes de giro dentado y del número de sinapsis que estas fibras efectúan con las neuronas piramidales de CA3 en ratas en las que se indujo hipotiroidismo durante diversos períodos del desarrollo (Madeira y Paula-Barbosa, 1993). También se ha observado un retraso en la mielinización (Bernal, 2005), una reducción de la mielina total (Balázs et al., 1969; Bernal, 2005) y un retraso en la

expresión de enzimas específicas en neuronas de corteza cerebral, visual y auditiva, hipocampo y cerebelo en animales hipotiroideos (Cocks et al., 1970).

El número y tamaño de las neuronas se ven afectados por el hipotiroidismo de forma región-específica. En las áreas CA1 a CA4 del hipocampo de las ratas hipotiroideas los somas de las neuronas piramidales son más pequeños a partir del día 10 postnatal (Rami et al., 1986b). Estudios realizados con ratas a las que se indujo hipotiroidismo desde el momento del nacimiento muestran una reducción irreversible del número total de células piramidales en el área CA1 del hipocampo tanto en animales jóvenes como en adultos. Dado que la proliferación y migración de estas células acaba antes del nacimiento, este hecho sólo puede explicarse por muerte neuronal. Sin embargo, en el área CA3 el número de células piramidales no se ve afectado por este tipo de hipotiroidismo experimental, aunque sí se observa una reducción del volumen de la capa de células piramidales (Madeira et al., 1992). Por otra parte, en el giro dentado sí se observa un severo retraso en la migración de células desde la zona proliferativa hacia la capa granular en ratas hipotiroideas (Rami et al., 1986a), así como una reducción en el número total de células granulares (Madeira et al., 1991).

Las hormonas tiroideas regulan el crecimiento neuronal y la formación de sinapsis en el cerebelo (Clos et al., 1974) y en el área CA3 del hipocampo (Madeira y Paula-Barbosa, 1993). Se piensa que la incapacidad de los hipotiroideos neonatos de mostrar características normales en estos aspectos es el resultado de anomalías en el desarrollo del citoesqueleto. El hipotiroidismo podría estar alterando el ensamblaje, estabilización y composición de las proteínas de los microtúbulos. El crecimiento de las neuritas así como la adquisición de la polaridad neuronal depende de la formación de los microtúbulos y este proceso está dañado en los casos de hipotiroidismo (Nuñez et al., 1992). El crecimiento de los procesos neuronales normales también depende de la formación de las cantidades apropiadas de microtúbulos y de la síntesis normal y transporte axonal de los componentes del citoesqueleto (tubulina, proteínas asociadas a microtúbulos y proteínas de los neurofilamentos). Las hormonas tiroideas podrían ejercer su acción a través de la síntesis de estas proteínas. Se ha comprobado que las hormonas tiroideas incrementan la síntesis de tubulina cerebral en el feto y en el neonato, juegan un importante papel en el ensamblaje y estabilidad de la tubulina (Nuñez et al., 1991) y regulan la expresión de dos proteínas específicas, como tau (Aniello et al., 1991) y MAP2 (Silva y Rudas, 1990).

Todas estas deficiencias se observan en varias estructuras que incluyen el hipocampo, la corteza cerebral visual y auditiva y el cerebelo. Todas estas áreas afectadas pueden explicar los distintos problemas en el aprendizaje y las habilidades motoras que presentan los animales hipotiroideos (Oppenheimer y Schwartz, 1997).

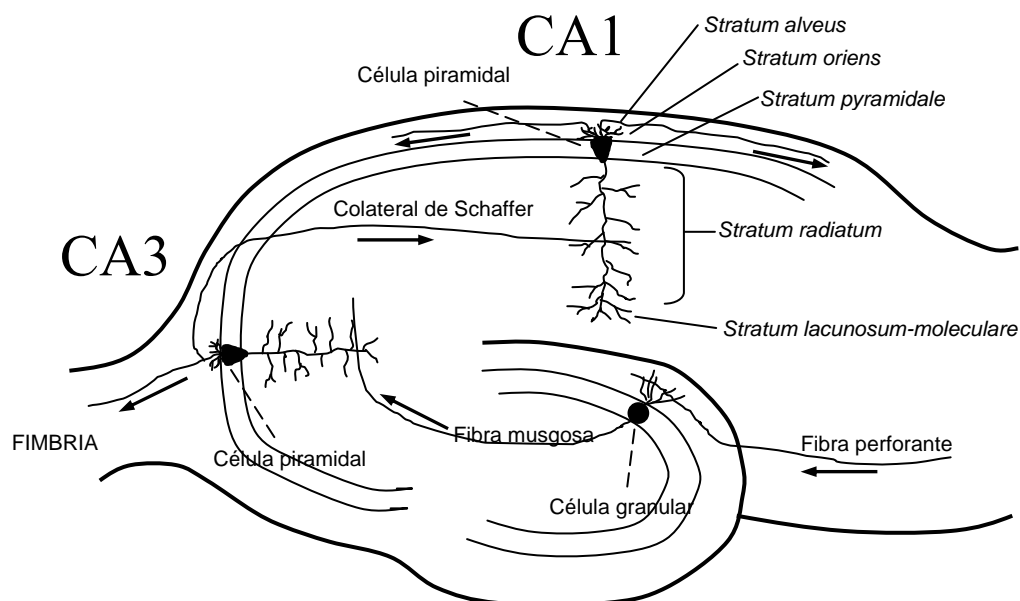
En trabajos anteriores de este laboratorio se ha descrito que existen alteraciones a nivel de plasticidades sinápticas en los animales hipotiroideos. En relación a la plasticidad sináptica a corto plazo en ratas hipotiroideas la facilitación se encuentra notablemente disminuida, siendo este efecto reversible cuando se administra T3. Esta disminución de la facilitación esta relacionada con un incremento en la probabilidad basal de liberación de neurotransmisor (Vara et al., 2002). La plasticidad sináptica a largo plazo de origen postsináptico (LTP, LTD, de-depresión, depotenciación) en animales neonatos hipotiroideos en el área CA1 del hipocampo no se encuentra alterada. Por el contrario, en animales adultos, el hipotiroidismo facilita el mantenimiento de la expresión de la LTD, incrementándose por otra parte la expresión de la de-depresión con respecto a los animales controles (Vara et al, 2003).

La reducción de los niveles de hormona tiroidea durante periodos críticos de desarrollo del sistema nervioso puede tener efectos permanentes y devastadores sobre la función neurológica y concretamente en términos de habilidad cognitiva (Correia et al., 2009). Por otra parte, el hipotiroidismo experimental en ratas neonatas provoca deficiencias en el aprendizaje (Hashimoto et al., 2001), retraso en el desarrollo locomotor (Hashimoto et al., 2001) e hiperactividad (Akaike et al., 1991). En el pasado, el hipocampo no era considerado una región diana de las hormonas tiroideas. Hoy está claro que estas hormonas ejercen una acción directa sobre el hipocampo, sin embargo, los mecanismos de acción por los cuales las hormonas afectan al hipocampo no son muy conocidos.

### 3. Hipocampo: estructura y función

El hipocampo es una región de la arquicorteza que se sitúa entre la paleocorteza olfatoria y la neocorteza. Generalmente, el término hipocampo se utiliza para referirse a la formación hipocampal, formada por el asta de Ammon, el giro dentado, el *subiculum* y el *prosubiculum*, dejando de lado la formación parahipocampal, que engloba la corteza entorrinal, el *presubiculum* y el *parasubiculum*. El asta de Ammon, o *cornu Ammonis* (CA), fue subdividido en cuatro áreas, desde CA1 hasta CA4, por Lorente de Nó (1934). En una sección perpendicular al eje longitudinal del hipocampo, el área CA1 abarca casi toda la región superior, CA2 y CA3 continúan formando la curva del arco del hipocampo, y CA4 se encuentra en la región inferior, adyacente al giro dentado. En el área CA1 se pueden apreciar varias capas en función de la organización celular existente (Figura 3):

- *Stratum alveus*: formado por los axones mielinizados de las neuronas piramidales hipocampales, por fibras del tracto alveolar procedentes de la corteza entorrinal y por proyecciones desde el *septum*.
- *Stratum oriens*: formado por las dendritas basales de las neuronas piramidales y por aferencias comisurales procedentes del hipocampo contralateral, que constituyen fibras mayoritariamente amielínicas. Contiene varios tipos de neuronas de axón corto, principalmente inhibitorias.
- *Stratum pyramidale*: contiene los somas densamente empaquetados de las neuronas piramidales, que constituyen el principal tipo neuronal del hipocampo. Además, en esta capa se localizan las células en cesto, que forman glomérulos alrededor de los somas de las piramidales.
- *Stratum radiatum*: formado por las ramas dendríticas apicales de las neuronas piramidales.
- *Stratum lacunosum-moleculare*: formado por las ramificaciones de las dendritas apicales de las células piramidales.



**Figura 3.** Esquema del hipocampo. Aparecen representadas las diferentes capas del área CA1, así como el circuito trisináptico existente entre los principales tipos celulares. Las flechas indican la dirección del flujo de información.

Se considera que el hipocampo está funcionalmente relacionado con la memoria y el aprendizaje. En roedores es bien conocido el papel del hipocampo en la memoria (Morris y Frey, 1997; Zeng et al., 2001), habiéndose mostrado su implicación en el aprendizaje espacial (Morris et al., 1982) y en algunas formas de aprendizaje no espacial (Moyer et al., 1990). En los seres humanos se conocen sus funciones a través del estudio de lesiones debidas a cirugía o a procesos degenerativos o vasculares. Estas lesiones suelen producir cuadros de amnesia anterógrada, consistentes en deficiencias en la adquisición de nuevas memorias.

## 4. El potencial de acción

### 4.1. Bases del estudio del potencial de acción

Posiblemente, los descubrimientos más importantes en relación con el estudio de los potenciales de acción fueron realizados en 1952 por Hodgkin y Huxley. Estos autores, haciendo uso de la técnica de fijación de voltaje (*voltage-clamp*) llevaron a cabo los primeros registros de las corrientes que fluyen a través de la membrana durante los potenciales de acción. Gracias a esta técnica los autores demostraron que, aplicando pulsos despolarizantes, se produce una rápida corriente de entrada seguida de una corriente de salida de desarrollo más lento y que, fijando el voltaje a un potencial de membrana cercano al potencial de equilibrio para el sodio (aproximadamente +60 mV en estos experimentos), la corriente de entrada desaparece, mientras que la corriente de salida se mantiene (Hodgkin y Huxley, 1952a).

Aplicando la ley de Ohm a los registros obtenidos mediante la fijación de voltaje, Hodgkin y Huxley realizaron estimaciones de las conductancias de sodio y potasio en cada pulso de voltaje, lo cual les permitió estudiar en profundidad las cinéticas de dichas conductancias. Con estos análisis, los autores encontraron que, ante un pulso despolarizante sostenido, la conductancia al sodio primero aumentaba rápidamente (activación) y luego disminuía más lentamente (inactivación) a pesar de mantenerse el potencial de membrana en valores despolarizados demostrando que las conductancias de sodio podían presentar diferentes estados (Hodgkin y Huxley, 1952a,b). En relación a esto, los autores observaron que para recuperar la conductancia de sodio previamente inactivada, había que repolarizar de nuevo la membrana durante varios milisegundos para que esta conductancia pudiera volver a activarse, y que, dependiendo del potencial de membrana, la recuperación era más o menos rápida, explicando el porqué del período refractario para la generación de otros potenciales de acción (Hodgkin y Huxley, 1952b,c).

Con estos estudios y la formulación del modelo matemático conocido hoy día como modelo de Hodgkin-Huxley se llega a la conclusión de que los impulsos nerviosos son descargas eléctricas controladas por una conductancia selectiva a diversos iones y que estas conductancias presentan diferentes estados. Tras una breve despolarización, el potencial de

membrana tendería a repolarizarse lentamente siguiendo las propiedades pasivas de la membrana, sin embargo, algunas conductancias de sodio se activan y la membrana se despolariza más, lo cual recluta a su vez nuevas conductancias de sodio y así sucesivamente, dando lugar a un bucle autoregenerativo de activación de conductancias de sodio. Por otro lado, antes de llegar al pico del potencial de acción, las conductancias de sodio comienzan a inactivarse y empiezan a aparecer las corrientes de potasio, que también se activan con la despolarización pero que, al presentar una cinética de activación más lenta, ejercen su máximo efecto después de las corrientes de sodio coincidiendo con la fase de repolarización. De este modo, las conductancias de potasio, junto a la inactivación de las corrientes de sodio, llevan al potencial de membrana a valores cercanos a los de equilibrio para el potasio, el cual es similar al potencial de reposo de la membrana. Sin embargo, conviene tener en cuenta que, aunque el potencial de membrana tras el potencial de acción se halla en valores similares a los del potencial de la membrana en reposo, la concentración iónica del interior celular se iría alterando poco a poco debido a la entrada de sodio y a la salida de potasio. Por lo tanto, debe haber algún mecanismo que lleve estas concentraciones a los valores iniciales, y la principal proteína encargada de este proceso sería el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa (Glynn, 1956; 1957; revisado en Glynn, 2002).

#### **4.2. Canales que intervienen en el potencial de acción**

Los potenciales de acción del axón del calamar se forman a partir de dos tipos de canales dependientes de voltaje (Hodgkin y Huxley, 1952d), sin embargo en las neuronas centrales de vertebrados se expresan al menos una docena de tipos diferentes de canales iónicos de membrana dependientes de voltaje (Llinás, 1988; Hille, 2001). Por un lado dentro de los canales de potasio hay varios tipos dependientes de voltaje que intervienen en la repolarización del PA pertenecientes a la familia  $\text{Kv1-Kv4}$  (implicados entre otras en las corrientes A y D), y cada uno tiene propiedades y cinéticas distintas, interviniendo cada uno en diferentes partes de la repolarización (Johnston et al., 2010). Además de los canales dependientes de voltaje, también intervienen en la repolarización canales de potasio dependientes de calcio como los BK, también conocidos como  $I_C$  (Lancaster y Adams, 1986; Lancaster y Nicoll, 1987; Storm, 1987). Por otro lado, los canales de sodio dependientes de voltaje son los principales responsables de la fase de despolarización de los potenciales de acción (revisado por Goldin, 2001). Por tanto cualquier alteración en el

número o propiedades de estos canales puede repercutir en la morfología del potencial de acción y con ello alterar la forma o efectividad de la transmisión entre neuronas.

## 5. Patrón de disparo de las neuronas piramidales de CA1

### 5.1. Patrón de disparo regular o en ráfaga

Fundamentalmente las neuronas presentan dos patrones de disparo de potenciales de acción bien diferenciados: disparo regular o disparo en ráfaga (*bursts*), y el cambio de un patrón a otro puede alterar drásticamente la forma de procesar la información. La ráfaga de potenciales de acción puede ser una unidad de información en si misma, como sugiere el trabajo de Izhikevich *et al.* (2003), en el cual se pone de manifiesto como la ráfaga de potenciales de acción es un mecanismo efectivo de comunicación entre neuronas. La duración de la ráfaga, el número de espigas por ráfaga, o la frecuencia de las mismas pueden servir como formas específicas de codificación (Harris et al., 2001; Kepecs et al., 2002). Además, la capacidad de disparar de una forma u otra puede dar a la neurona la habilidad de regular dinámicamente la información a través del tren de espigas, modulando la eficacia sináptica (Brumberg et al., 2000).

Los potenciales de acción de las neuronas que disparan con un patrón en ráfaga son seguidos por una despolarización lenta y gradual, la despolarización postpotencial o ADP (*after-depolarization potential*) que es capaz de generar una o varias espigas adicionales. En las neuronas con un patrón regular, o bien el PA no es seguido por una despolarización postpotencial o bien este ADP no es suficiente para alcanzar el umbral para generar un nuevo PA. En situaciones fisiológicas, el patrón de disparo predominante varía en distintas áreas cerebrales, se alterna entre regular y en ráfaga en el tálamo según el estado sueño-vigilia, o durante la transmisión del dolor visceral a la corteza cerebral. Este cambio entre un disparo regular a uno en ráfaga o viceversa parece ser responsable de muchos desordenes neurológicos, por ejemplo se observa un aumento del disparo en ráfaga en la epilepsia, mientras que una disminución podría asociarse con una red neuronal deprimida (Beck y Yaari, 2008; Cheong et al., 2008; Graef et al., 2009). También se piensa que el disparo en ráfaga es importante en la consolidación de nuevos recuerdos, proceso en el que es necesaria la intervención del hipocampo (Buzsaki, 1989; Cattaneo et al., 1981). De cualquier forma, el disparo en ráfaga en el hipocampo es importante tanto en el procesamiento como en el almacenamiento de la información neuronal (Magee y Carruth, 1999) y es fundamental durante el desarrollo de esta región como se verá mas adelante.

## 5.2. Generación del disparo en ráfaga por una despolarización postpotencial

Para la generación de un disparo en ráfaga son necesarios una serie de elementos. Por un lado, para iniciar una ráfaga, los potenciales de acción deben ser capaces de generarse en el soma y alcanzar las dendritas (*backpropagation*). Por otro lado, estos potenciales tienen que activar canales de calcio sensibles al níquel presentes en el árbol dendrítico (Williams y Stuart, 1999). En las neuronas piramidales de CA1 del hipocampo todo esto ocurre gracias a los canales iónicos dependientes de voltaje de las dendritas, que regulan el procesamiento y almacenamiento de la información de entrada y modulan el patrón de disparo de los potenciales de acción entre regular a en ráfaga. Aunque el disparo en ráfaga no sea el patrón común en las células piramidales de CA1 es muy importante en la función del hipocampo en relación con la memoria y el aprendizaje. Por ejemplo, se han visto correlaciones entre el disparo en ráfaga de las neuronas piramidales de CA1 con estudios de aprendizaje (Muller et al., 1987; Harris et al., 2001) y con un aumento de las sinapsis (Pike et al., 1999).

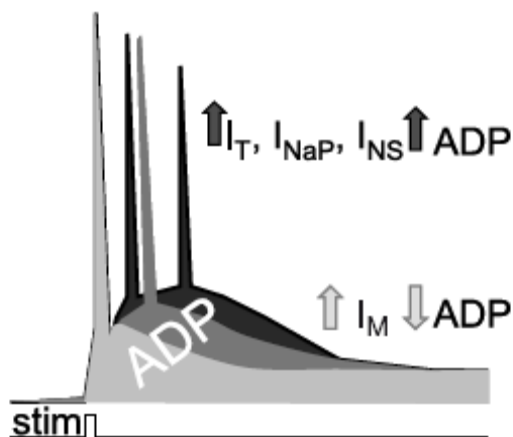
Hace tiempo que la mayoría de los estudios están de acuerdo en que es necesaria la generación de una despolarización postpotencial para la aparición de múltiples espigas y el disparo en ráfaga (Jensen et al., 1994; 1996; White et al., 1989; Wong y Prince, 1981). El ADP es la despolarización que sigue al potencial de acción, existiendo una relación directa entre la distribución de las neuronas que disparan en ráfagas y el gradiente en amplitud del mismo (Jarsky et al., 2008). Entender los mecanismos iónicos que determinan el tamaño del ADP en neuronas normales y patológicas es muy importante para entender los cambios en el patrón de disparo. En la generación del ADP intervienen distintos canales iónicos dependientes de voltaje. Así, entre las corrientes implicadas encontramos a la corriente T de calcio que contribuye significativamente a la corriente de entrada durante el ADP al activarse a potenciales subumbrales. La corriente persistente de sodio también contribuye al ADP (Beck y Yaari, 2008). Esta corriente suele ser producida por la apertura prolongada de los canales de sodio y es conocida como corriente persistente de sodio (Crill, 1996). Por el contrario, la despolarización postpotencial disminuye por corrientes de potasio que se activan a potenciales subumbrales y limitan el tamaño y la duración del ADP (Yue y Yaari, 2004; 2006), tales como: la corriente M ( $I_M$ ), cuyo bloqueo facilita tanto el ADP como el disparo en ráfaga (Morin et al., 1998; Safiulina et al., 2008); y la corriente A, cuyo bloqueo selectivo a nivel de dendritas induce la conversión de disparo regular a en ráfaga (Magee y Carruth, 1999).

Los canales de calcio de las corrientes T, R y L son los responsables del disparo en ráfaga, fundamentalmente los canales de calcio de la corriente T, debido a sus características: bajo umbral de activación y cinéticas lentas de desactivación (Randall y Tsien, 1997; Su et al., 2002). Además, el bloqueo de los canales de calcio T y R con níquel inhibe el disparo en ráfaga, en mucha mayor medida que el bloqueo de los canales de calcio L, N o P/Q. Estos resultados indican que los canales de calcio dependientes de voltaje sensibles al níquel son los más importantes para generar el disparo en ráfaga (Magee y Carruth, 1999). Por otra parte, Chen et al., 2005 publicó que el bloqueo de los canales de potasio, específicamente los de la corriente A, facilitan este patrón de disparo. Estos autores también concluyen que el comportamiento de disparo en ráfaga no se ve afectado por el bloqueo de la transmisión sináptica excitatoria o inhibitoria con bloqueantes específicos.

Chen *et al.* (2005) también sugieren que la corriente persistente de sodio es necesaria para la propagación desde el soma a las dendritas de los potenciales de acción encargados de activar a los canales de calcio. Asimismo, Magee y Carruth (1999) sostienen que el papel de los canales de sodio dendríticos es permitir la propagación de los potenciales de acción desde el soma a las dendritas a fin de activar los canales de calcio. En resumen, la activación de los canales de calcio dependientes de voltaje, a través de la propagación retrógrada de los potenciales de acción, genera la despolarización postpotencial que dispara una ráfaga de potenciales de acción en las neuronas piramidales de CA1.

Sin embargo, Yue *et al.* (2005) restan importancia a los canales de calcio en la generación de la despolarización postpotencial, argumentando que son los canales de la corriente persistente de sodio los responsables de la mayor parte de la despolarización necesaria para alcanzar el ADP y disparar con un patrón en ráfaga. Además consideran que esta corriente persistente de sodio se encuentra a su vez controlada por la corriente M de potasio, de modo que el bloqueo de la corriente M permitiría a la persistente de sodio generar la despolarización postpotencial.

En definitiva este juego entre corrientes de entrada y salida que están activas durante la despolarización postpotencial regula el tipo de disparo de la neurona (Figura 4). Una alteración en alguna de estas corrientes podría conllevar un cambio en el patrón de disparo de la célula.



**Figura 4.** Papel de las corrientes que intervienen en el ADP. Tres despolarizaciones postpotenciales distintas se han superpuesto generadas a partir de 3 potenciales de acción idénticos.  $I_T$  = corriente T de calcio;  $I_{NaP}$  = corriente persistente de sodio;  $I_{NS}$  = corriente catiónica no específica;  $I_M$  = corriente M de potasio. (Schorge y Walter, 2009).

### 5.3. Patrón de disparo durante el desarrollo

Durante el desarrollo postnatal el patrón de disparo de las neuronas es diferente al que tienen en su estado adulto. Además estos cambios en el modo de disparo son esenciales para una correcta maduración del sistema nervioso. Por otra parte, en las primeras semanas postnatales la excitabilidad intrínseca aumenta progresivamente, los potenciales de acción se vuelven más rápidos y de mayor amplitud (Spigelman et al., 1992) y el ADP aumenta su duración (Chen et al., 2005). Estos acontecimientos se relacionan con una tendencia de las neuronas piramidales de CA1 del hipocampo a manifestar disparos con un patrón en ráfaga (Costa et al., 1991). Así, en el trabajo de Chen *et al.* (2005) se observa como el porcentaje de células piramidales de CA1 que disparan en ráfaga varía en las primeras semanas de vida postnatal. Antes del octavo día postnatal ninguna neurona dispara en ráfaga, en los siguientes días aparece este patrón, incrementándose hasta alcanzar un máximo en torno al P18-19, donde el 74% de las células disparan en ráfaga, para a partir de este día revertir al patrón de disparo regular del adulto. Los autores relacionan este periodo transitorio de disparo con el refinamiento de las conexiones sinápticas en el desarrollo de las neuronas hipocámpales. De hecho, este período coincide con una intensa proliferación y ramificación de las dendritas apicales y la formación de sinapsis excitatorias en las mismas (Pokorny y Yamamoto, 1981a,b). Por último, los resultados de Van Elburg (2010) sugieren una relación entre la morfología de las células y el disparo en ráfaga. Así alteraciones en el tamaño o la morfología de las células piramidales, como las observadas en el Alzheimer, en el retraso mental, la epilepsia o el

estrés crónico, podrían cambiar el patrón de disparo de las neuronas, afectando en último término al procesamiento de la información y a los procesos cognitivos.

## **6. Excitabilidad intrínseca**

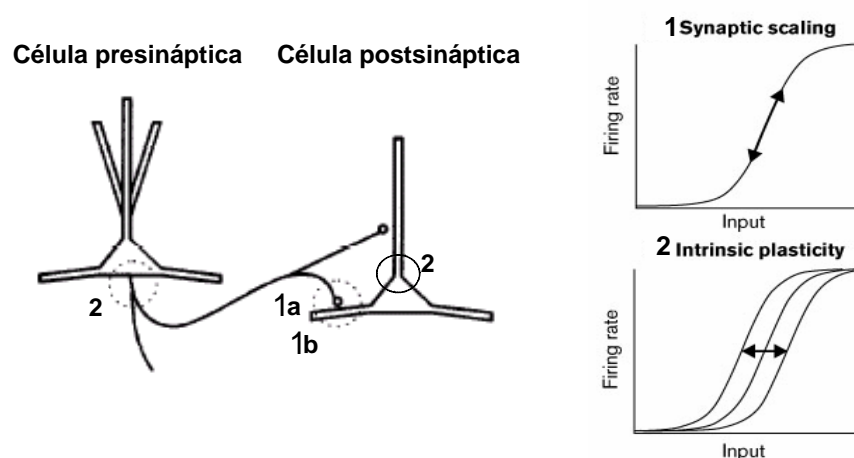
Las propiedades eléctricas intrínsecas de las neuronas determinan las características del patrón de disparo de la célula y la manera en que integran las señales sinápticas, por lo que son fundamentales para su función en el sistema nervioso. Las neuronas del sistema nervioso central convierten las aferencias sinápticas excitatorias e inhibitorias en una señal de salida cuya información está codificada mediante el patrón de disparo; integran las aferencias sinápticas mediante su excitabilidad intrínseca y lo expresan mediante el disparo de potenciales de acción. De modo que la relación entrada-salida de un circuito neuronal, como el que constituye el hipocampo, depende tanto de la conectividad sináptica dentro del circuito, como de la excitabilidad intrínseca de las neuronas que lo componen. Las distintas propiedades eléctricas intrínsecas de las neuronas se encargan de perfilar su excitabilidad, de modo que cambios en la magnitud o distribución de las conductancias iónicas de canales dependientes de voltaje o de calcio, entre otros, provocan alteraciones de la misma. La excitabilidad intrínseca varía durante el desarrollo en modelos animales de patologías del sistema nervioso (tales como epilepsia, Alzheimer, dolor neuropático, encefalomiелitis autoinmune, estrés...) y en la plasticidad sináptica (Weiss et al., 2005; Beck y Yaari, 2008; O'Leary et al., 2010). Asimismo, aumentos en la excitabilidad de las neuronas hipocampales facilitan la plasticidad sináptica y el aprendizaje dependiente del hipocampo (Lopez de Armentia et al., 2007; Oh et al., 2009).

### **6.1. Plasticidad de la excitabilidad intrínseca**

Los neurocientíficos en las últimas décadas han mostrado gran interés en estudiar los cambios actividad-dependientes que se producen en los circuitos neuronales. Dichos cambios pueden estar relacionados con cambios en la eficacia de las conexiones sinápticas excitatorias o inhibitorias entre las neuronas. Pero además, pueden ser debidos a fenómenos que alteran el acoplamiento entre los potenciales postsinápticos y el potencial de acción.

La plasticidad sináptica afecta la relación entrada-salida de la información de las neuronas, interviene en el almacenamiento de dicha información, está relacionada con los cambios del comportamiento y juega un papel importante en los procesos de memoria y

aprendizaje. Los mecanismos moleculares responsables de la expresión de esta plasticidad han sido estudiados intensamente a lo largo de los últimos años y se pueden localizar tanto a nivel presináptico (1a en la Figura 5), como postsináptico (1b en la Figura 5) (Malinow y Malenka, 2002; Zucker y Regehr, 2002; Malenka y Bear, 2004; Neher y Sakaba, 2008; Kessels y Malinow, 2009). Sin embargo, además de estas plasticidades, algunos autores postulan la existencia de una plasticidad neuronal intrínseca (2 en la Figura 5), la cual provocaría modificaciones en la regulación actividad-dependiente del mensaje neuronal, mediante cambios en las propiedades funcionales intrínsecas de estructuras no-sinápticas, sin alterar la transmisión sináptica (Beck y Yaari, 2008; Nelson y Turrigiano, 2008).



**Figura 5 .** Plasticidad sináptica versus no-sináptica o intrínseca. La plasticidad sináptica está controlada por las modificaciones en la eficacia sináptica a nivel presináptico (1a) o postsináptico (1b); por el contrario la plasticidad intrínseca (2) está regulada por los cambios en las propiedades funcionales intrínsecas de las estructuras no-sinápticas tanto en la neurona presináptica, como en la postsináptica. Estas plasticidades controlan de un modo distinto la relación entrada-salida de la neurona. Una neurona dispara más o menos potenciales de acción dependiendo del conjunto de entradas sinápticas excitatorias e inhibitorias que recibe en un momento dado. Así la relación entrada-salida de la neurona varía de arriba abajo (1) durante la plasticidad sináptica. Por el contrario, la regulación de la plasticidad intrínseca modifica la curva entrada-salida hacia la izquierda o hacia la derecha (2). Es decir, la neurona dispara más o menos potenciales de acción para las mismas conexiones sinápticas. Además la plasticidad intrínseca puede modificar la pendiente de la curva.

Este fenómeno ha sido estudiado en preparaciones de vertebrados e invertebrados sugiriendo que la actividad modula la excitabilidad intrínseca (Turrigiano et al., 1994; Moody, 1998). En preparaciones de invertebrados, la actividad puede cambiar una neurona de tónica a fásica mediante una regulación del balance de corrientes de entrada y salida (Turrigiano et al., 1995). La plasticidad neuronal intrínseca se ha descrito en numerosas regiones del cerebro,

tanto *in vivo* como *in vitro*, entre las que merecen destacarse el hipocampo, el cerebelo y la neocorteza (Daoudal y Debanne, 2003; Zhang y Linden, 2003; Nelson y Turrigiano, 2008).

La mayoría de tipos de plasticidad intrínseca dependen de cambios en la densidad de los canales iónicos dependientes de voltaje, o en sus propiedades funcionales. Como en una neurona los canales no se distribuyen de forma homogénea por su superficie, los mecanismos de plasticidad intrínseca son diferentes entre dendritas, somas y axones neuronales (revisado por Beck y Yaari, 2008).

### **6.1.1. Plasticidad intrínseca en las dendritas**

Los canales iónicos de las dendritas regulan la excitabilidad de las mismas y la integración de las señales de varias formas (Häusser et al., 2000). En primer lugar mediante la atenuación tanto de los potenciales sinápticos como de los potenciales de acción retrógrados. En segundo lugar los canales de calcio y sodio dependientes de voltaje dendríticos son capaces de generar espigas que se propagan al soma, con la suficiente amplitud como para provocar potenciales de acción en el mismo. Actualmente se han descrito plasticidades a nivel de canales iónicos que se encuentran distribuidos preferentemente en las dendritas, como son los canales de la corriente A y de la corriente H (Frick et al., 2004; Fan et al., 2005; Narayanan et al., 2010).

### **6.1.2. Plasticidad intrínseca en el soma: umbral del potencial de acción**

La función integradora de una neurona dentro de un circuito está fuertemente afectada por el umbral del voltaje necesario para generar un PA. Abraham *et al.* (1986) observaron que el umbral del PA presenta plasticidad. Así se ha visto que disminuye después de la inducción de la potenciación a largo plazo. En este caso el cambio de umbral es debido probablemente a cambios en las propiedades voltaje-dependientes del canal de sodio (Xu et al., 2005). También se han observado cambios en el umbral en animales con epilepsia crónica por cambios en la corriente A de potasio y en modelos animales de dolor crónico por cambios en la corriente T de calcio (Beck y Yaari, 2008).

### **6.1.3. Plasticidad intrínseca en el disparo repetitivo**

Como ya se ha visto las propiedades del patrón de disparo en respuesta a despolarizaciones prolongadas presentan plasticidad, pudiendo pasar de un disparo regular a uno en ráfaga o viceversa, y este cambio interviene en un gran número de modelos de

desordenes neurológicos. Hay que tener en cuenta que cuando se produce una despolarización prolongada, y su consiguiente disparo repetitivo sea del tipo que sea, también intervienen otras conductancias, entre las que se pueden incluir corrientes de potasio calcio-dependientes que causan hiperpolarizaciones y reducen el disparo de PAs. Se las conoce como *After-Hyperpolarization Potential* (AHP), con cinéticas lentas (sAHP) o medias (mAHP), y están moduladas en diversos aprendizajes (Beck y Yaari, 2008).

## 6.2. Efectos funcionales de la plasticidad intrínseca

De una forma muy genérica cualquier tipo de plasticidad neuronal puede clasificarse de dos formas: plasticidad homeostática o no homeostática. La clave según autores como O'Leary *et al.* (2010) está en si es reversible. Estos cambios en las propiedades intrínsecas son fenómenos homeostáticos, que en función de las perturbaciones externas modifican continuamente las propiedades de las neuronas. Por el contrario una plasticidad no homeostática es la propia de la plasticidad sináptica a largo plazo, donde los cambios se mantienen relativamente estables en el tiempo, propiedad muy importante para cualquier modelo de aprendizaje y memoria.

La plasticidad intrínseca ayuda a la neurona a mantener estables sus funciones a lo largo del tiempo. Muchos ejemplos de esta plasticidad se observan tras períodos prolongados de actividad neuronal alterada. Por ejemplo, con incrementos crónicos en la actividad se ven cambios que disminuyen la excitabilidad intrínseca neuronal (Marder y Goaillard, 2006). Por el contrario, depresiones en la actividad causan un incremento en la excitabilidad intrínseca a través de cambios en canales dependientes de voltaje (Turrigiano *et al.*, 1994; Desai *et al.*, 1999). En definitiva una neurona es capaz de adaptarse y mantener su actividad dentro de un rango aunque soporte situaciones dispares, gracias entre otras cosas a la alteración de sus propiedades intrínsecas, mediante cambios en los canales iónicos que presentan en su membrana.

## 7. Canales dependientes de voltaje

Los canales iónicos dependientes de voltaje son responsables de algunas de las propiedades eléctricas intrínsecas de las neuronas, son proteínas que integran la membrana y forman poros altamente selectivos para el paso de iones específicos a través de la membrana plasmática (Hille, 2001). Estos canales iónicos presentan distintos estados (abierto, cerrado...) y la transición entre ellos se debe a cambios conformacionales de la proteína causados por cambios eléctricos del potencial de membrana (Bezanilla y Perozo, 2003). Los canales dependientes de voltaje para iones de sodio, calcio y potasio son los principales responsables de las propiedades activas de membrana de las neuronas (Llinás, 1988). Esta tesis se centrará en el estudio de los canales dependiente de voltaje de calcio encargados de la corriente T y los canales de potasio encargados de las corrientes A y D.

### 7.1. Canales dependientes de voltaje de calcio

Los canales de calcio han sido divididos en tres grandes familias, Cav1 (tipo L), Cav2 (tipos N, P/Q y R) y Cav3 (tipo T) (Ertel et al., 2000). Cada canal tiene distintas subunidades,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ , siendo la estructura más habitual  $\alpha_1\alpha_2\delta\beta\gamma$  (Catterall, 2000). Los canales de alto umbral (HVA, *high-voltage-activated*) son los de tipo L, N, P/Q y R y los de bajo umbral los de tipo T (LVA, *low-voltage-activated*).

Los canales de tipo L juegan un papel crucial en el flujo de calcio, tanto del soma como de las dendritas, en muchas neuronas del sistema nervioso central de mamíferos. Estos canales están involucrados en la señalización dendrítica de calcio que provoca: potenciales de acción retrógrados, plasticidad sináptica, amplificación de la señal sináptica y el acoplamiento excitación-transcripción. En neuronas de mamíferos se expresan preferentemente los canales Cav 1.2 y 1.3 (diferenciándose entre sí por la subunidad  $\alpha_1$ ) y apenas se aprecian los Cav 1.1 y 1.4 (Johnston et al., 2003).

Los canales de tipo N, P/Q y R regulan la liberación de neurotransmisores de las terminaciones nerviosas presinápticas (Trimmer y Rhodes, 2004) y pertenecen a la familia de canales Cav2.

Los canales de tipo T se caracterizan por presentar corrientes pequeñas y transitorias que se activan a potenciales más negativos que el potencial de membrana en reposo. Estos canales son fundamentales para regular la permeabilidad al calcio de la membrana cuando ésta se encuentra cerca del potencial de reposo y durante los potenciales de acción. Se diferencian del resto de canales de calcio de alto umbral por su activación a voltajes más hiperpolarizados, una inactivación más rápida, una desactivación más lenta y una menor conductancia al bario (Pérez-Reyes, 2003). La familia de canales Cav3 son los responsables de esta corriente, y tienen distintos patrones de expresión en el cerebro de mamíferos. Así los Cav3.1 se encuentran muy expresados en el cerebelo, a nivel de las dendritas de las células de Purkinje humanas, de rata (Talley et al., 1999) y de ratón (Yunker et al., 2003). El canal Cav3.2 no se ha estudiado a nivel proteico, sin embargo se ha estudiado su mRNA en el hipocampo de rata; encontrándose altos niveles del mismo en las células granulares del giro dentado y en las neuronas piramidales (Talley et al., 1999). Por último, el tipo de canal Cav3.3 se expresa por todo el cerebro (incluyendo neuronas piramidales de CA1 y CA3) aunque su mayor expresión se produce en el bulbo olfatorio y en el mesencéfalo (Yunker et al., 2003). Estos subtipos se diferencian entre si por sus cinéticas y su distinta sensibilidad al níquel (Pérez-Reyes, 2003).

### **7.1.1. Corriente T**

La corriente T de calcio se llamó en un principio corriente de calcio de bajo umbral (LVA) ya que se puede activar a potenciales más negativos que el potencial de membrana en reposo. Se observa en una gran variedad de neuronas del sistema nervioso central, mediante registros de fijación de voltaje, pero especialmente en el soma y dendritas de neuronas caracterizadas por presentar una gran calcio-dependencia con respecto al comportamiento de disparo de potenciales de acción, como ocurre con las neuronas de relevo talámicas o las neuronas de Purkinje del cerebelo. Entre los papeles que se le atribuyen a la corriente T se encuentran: generación de espigas de bajo umbral que provocan disparo en ráfaga, promoción de comportamientos oscilatorios intrínsecos; incremento de los potenciales sinápticos e influencia en el fenómeno de potenciación sináptica (Huguenard, 1996). Quizá la función más clara es la generación de espigas de bajo umbral descrita en multitud de neuronas: desde reticulares (Mulle et al., 1986), talámicas de relevo (Deschênes et al., 1982; Llinás y Jahnsen, 1982), de la oliva inferior (Llinás y Yarom, 1981), interneuronas hipocámpales (Fraser y MacVicar, 1991), de la habénula lateral (Wilcox et al., 1988), neocorticales (Friedman y Gutnik, 1987), hasta una

subpoblación de neuronas de la formación reticular pontina (Gerber et al., 1989). Una consecuencia secundaria de la generación de disparo en ráfaga es promover una actividad intrínseca oscilatoria, siempre que la presencia de corriente T sea significativa (Giffin et al., 1991; Hamill et al., 1991). En relación a las neuronas hipocámpales de CA1 en desarrollo, la corriente T es crucial para la generación de las despolarizaciones postpotencial y para el control del comportamiento de disparo (Jahnsen y Llinás, 1984; Chen et al., 2005). Además de todas estas funciones no hay que olvidar que los canales de corriente T regulan directamente las concentraciones intracelulares de calcio, el cual es un segundo mensajero muy importante para una gran variedad de procesos celulares (Perez-Reyes, 2003).

La dependencia del voltaje de la activación y la inactivación de la corriente T ha sido descrita en multitud de preparaciones. La comparación de estos estudios es complicada si se tiene en cuenta las diferentes condiciones de registro (Huguenard, 1996). Bajo condiciones fisiológicas de registro el umbral de activación de la corriente T se encuentra cerca del potencial de membrana en reposo, de -50 a -60 mV, con una máxima activación entre -20 y -30 mV. En la mayoría de los casos la activación de la corriente T es gradual, siendo la velocidad de activación muy dependiente del voltaje. Así, el tiempo al pico (*time peak*) de la corriente disminuye al aumentar la despolarización (Huguenard, 1996). Por otra parte, se ha visto un retraso significativo en el inicio de la corriente T que indica que los canales responsables de la misma pasan por diferentes estados antes de abrirse (Herrington y Lingle, 1992).

La inactivación de la corriente T es una de las principales características que distinguen a esta corriente de las corrientes de calcio de alto umbral. La inactivación se caracteriza principalmente por tres propiedades: el tiempo de caída de la inactivación (*time-dependent inactivation*), la estabilización de la inactivación (*steady-state inactivation*) y la recuperación de la inactivación. Existe mucha más heterogeneidad celular con respecto a las propiedades de la inactivación que con respecto a las de la activación de la corriente T; excepto en el proceso de recuperación de la inactivación, el cual es muy dependiente de voltaje para todos los tipos celulares, considerándose en la mayor parte de los casos bifásico y de varios segundos de duración (Coulter et al., 1990; Hernandez-Cruz y Pape, 1989; Herrington y Lingle, 1992; Takahashi et al., 1991). Concretamente, en neuronas piramidales disociadas de CA1, la corriente T presenta una

inactivación rápida, con una constante de tiempo de inactivación de 25 ms a -20 mV y un  $V_{50}$  de la inactivación a -76 mV (Thompson y Wong, 1991).

Los canales de corriente T presentan una permeabilidad selectiva para  $\text{Ca}^{2+}$ , así como para otros iones divalentes, como el  $\text{Ba}^{2+}$  o el  $\text{Sr}^{2+}$ . No obstante, aunque la amplitud al pico de corriente es una función saturable de la concentración del ión divalente, cuando se sustituye el  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular por  $\text{Ba}^{2+}$  la corriente disminuye (Huguenard, 1996).

Los bloqueantes de los canales de corriente T son una serie de cationes divalentes y trivalentes, como  $\text{La}^{3+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  (Kaneda et al., 1990; Milinar y Enyeart, 1993; Narahashi et al., 1987). En el caso del níquel la concentración necesaria para bloquear el 50% de corriente ( $\text{IC}_{50}$ ) varía entre 30 y 780  $\mu\text{M}$ , dependiendo del tipo celular. Existen también otros antagonistas como la nicardipina, flunarizina o el mibefradil que se utilizan para bloquear la corriente T (Huguenard, 1996). También se ha visto que el bloqueante de la corriente H (ZD7288) bloquea la corriente T (Felix et al., 2003; Sanchez-Alonso et al., 2008).

## 7.2. Canales dependientes de voltaje de potasio

Clásicamente los canales de potasio son aquellos que estabilizan el potencial de membrana alejándolo del umbral de disparo. En general, los canales de potasio mantienen el potencial de reposo, reducen la duración de los potenciales de acción, terminan periodos de intensa actividad, controlan la frecuencia de descarga y en general disminuyen la eficacia de las entradas excitatorias cuando están abiertos (Hille, 2001). Las corrientes de potasio son fundamentales en la repolarización del potencial de acción, principalmente los canales de la clase  $\text{K}_v$ , que presentan una estructura de 6TM. A esta familia pertenecen los canales responsables de la corriente rápida transitoria A ( $\text{I}_A$ ), la corriente de inactivación lenta D ( $\text{I}_D$ ) y la corriente retrasada rectificadora K o *delayed rectifier* ( $\text{I}_K$ ), todas ellas se activan por despolarización de la membrana. Diferencias en el tipo, densidad y propiedades de estos canales contribuyen a determinar el patrón de disparo (Locke y Nerbonne, 1997).

En mamíferos la expresión de muchas de las subunidades  $\alpha$  de estos canales  $\text{K}_v$  esta restringida a neuronas, aunque hay células gliales que pueden expresar algunas de ellas. En general, existen diferentes familias de canales  $\text{K}_v$  que se expresan en

localizaciones diferentes: el canal Kv1 se encuentra principalmente en axones y terminales nerviosas; el canal Kv2 en soma y dendritas; el canal Kv3 varía entre axón o dendritas en función del tipo celular y el canal Kv4 se concentra en la membrana somatodendrítica (Trimmer y Rhodes, 2004).

Aparte de estas diferencias entre las subunidades  $\alpha$ , existen varias subunidades accesorias que modifican en mayor o menor medida al canal de potasio. La mejor caracterizada es la subunidad Kv $\beta$  que se asocia a la familia Kv1 (Pongs et al., 1999). La subunidad Kv $\beta$ 1.1 cuando forma un complejo con Kv1.1 o Kv1.2 altera dramáticamente las propiedades de apertura del canal, convirtiendo una corriente sostenida, de tipo rectificadora en una de inactivación rápida o tipo A. Para los canales de la familia Kv4 también se han identificado diferentes subunidades accesorias. Por un lado proteínas calcio-dependientes llamadas KChIPs, las cuales en general aumentan la densidad de canales en superficie, enlentecen la inactivación y aceleran las cinéticas de recuperación de la inactivación de los canales Kv4 (An et al., 2000; Shibata et al., 2003). Por otro lado Nadal *et al.* (2003) identificaron a la proteína depeptidyl-peptidase-like protein DPPX (o también llamada DPP6) como una subunidad accesorias del canal Kv4. Subunidad que tiene un papel crítico en la función dendrítica y en la excitabilidad de membrana y está muy relacionada con el tráfico de canales Kv4 hacia superficie (Kim et al., 2008; Sun et al., 2011).

### 7.2.1. Corriente D

La corriente D fue descrita por primera vez en neuronas de CA1 por Storm (1988), otorgándole el nombre D por su relación con el retraso (*delay*) en el disparo de potenciales de acción. Es una corriente de potasio que se activa rápidamente, en el rango de milisegundos, y se inactiva lentamente, en torno al segundo. Se distingue de otras corrientes de potasio por su insensibilidad al TEA, su gran sensibilidad a la 4-AP (30  $\mu$ M) y por su activación a potenciales de membrana por debajo de -60 mV. En trabajos más recientes la dendrotoxina (DTX) ha pasado a ser el bloqueante específico de esta corriente (Storm, 1993; Coetzee et al., 1999). La corriente D se asocia con la familia de canales Kv1, encontrándose presentes en las células piramidales de CA1 entre los días postnatales 11 al 16, como se demuestra en los estudios de Martina *et al.* (1998) que detectaron mRNA de la subunidad Kv 1.2, una de las responsables de este canal.

La corriente D, además de ser la responsable del retraso en la aparición del primer potencial de acción tras una despolarización de membrana, interviene en la repolarización del PA, está implicada en el patrón de disparo y modula la liberación de neurotransmisores (Storm, 1988). La corriente D juega un papel crítico en la transformación de señales de entrada (transmisiones sinápticas) en señales de salida (potenciales de acción) y en la regulación de la excitabilidad neuronal (Bekkers y Delaney, 2001), puesto que se activa a voltajes inferiores al umbral de disparo del potencial de acción (Wu y Barish, 1992; Locke y Nerbonne, 1997) y se localiza principalmente en el soma y axón (Kole et al., 2007; Shu et al., 2007). En el trabajo de Cudmore *et al.* (2010) la expresión de esta corriente provoca una desincronización de los potenciales de acción en neuronas en cultivo de hipocampo, lo que conlleva una reducción de la sincronización de los circuitos neuronales. La corriente D también juega un cierto papel en el patrón de disparo de las neuronas, así el bloqueo de esta corriente con DTX en las células de Purkinje provoca un aumento del disparo en ráfaga (Haghdoust et al., 2007). Metz *et al.*, (2007) también demostraron que la corriente D reduce la despolarización postpotencial, así su bloqueo con DTX aumenta el ADP en células piramidales de CA1.

### 7.2.2. Corriente A

La corriente transitoria de potasio conocida como corriente A la presentan neuronas de muchas regiones del sistema nervioso central y fue descrita por primera vez en neuronas de molusco por Connor y Stevens (1971a). La corriente A se caracteriza por ser transitoria, presentar una activación, inactivación y recuperación de la inactivación rápidas y dependientes de voltaje y por activarse a potencial de membrana subumbral (Maffie y Rudy, 2008). La corriente A de las neuronas piramidales del hipocampo es sensible a concentraciones milimolares de 4-AP (Mitterdorf y Bean, 2002) e insensible a TEA (Klee et al., 1995). Se asocia con la familia de canales Kv4 y dentro de esta familia se han identificado 3 genes en mamíferos que codifican 3 subunidades distintas: Kv4.1, Kv4.2 y Kv4.3 (Shibata et al., 2003, Maffie y Rudy, 2008). Los genes Kv4.2 y Kv4.3 son los que se expresan predominantemente en el cerebro (Serodio y Rudy, 1998). Las neuronas piramidales de CA1 presentan mRNA de las subunidades Kv4.2 y Kv4.3, responsables de la corriente A, entre los días postnatales 11 al 16 (Martina *et al.* 1998).

La corriente A se relaciona con la excitabilidad celular y regula distintos procesos: la retropropagación de los potenciales de acción en las dendritas de las neuronas, entre

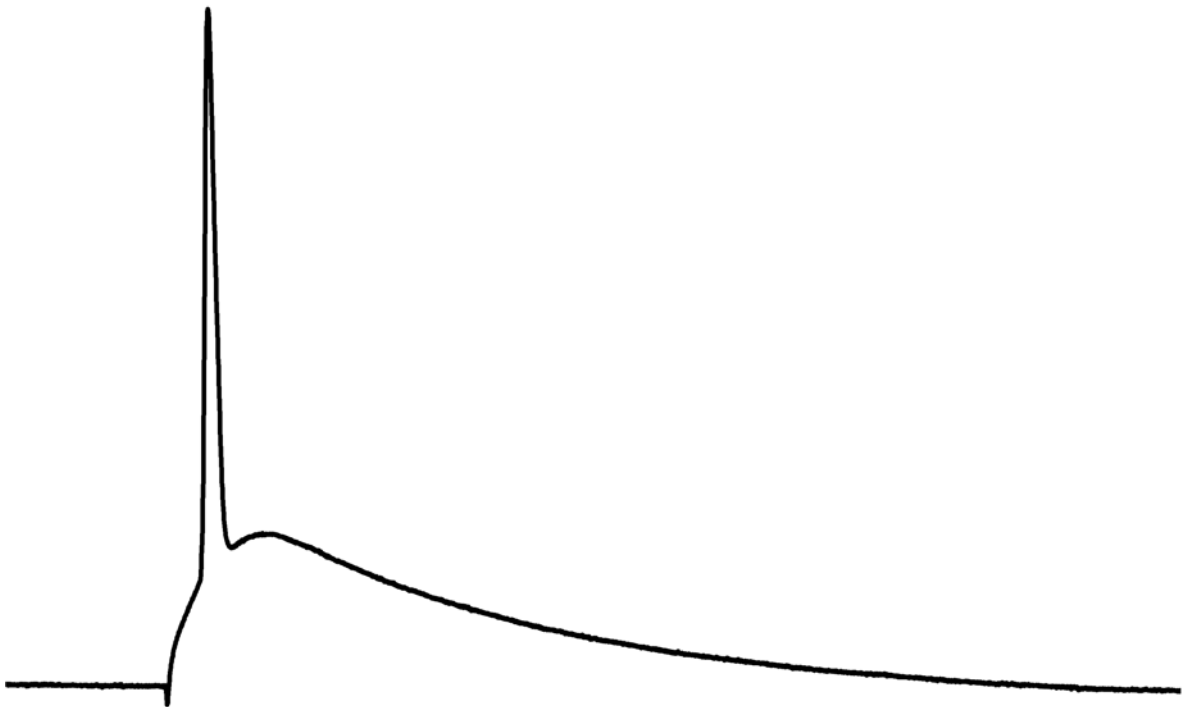
otras las hipocampales; la iniciación del potencial de acción en dendritas; la propagación de los potenciales de meseta de calcio; la duración de los potenciales de acción y el “*broadening*” (ensanchamiento de los potenciales de acción a lo largo de una despolarización continuada) (Hoffman et al., 1997; Cai et al., 2004; Kim et al., 2005; Losonczy y Magee, 2006). En general la corriente A es importante en la regulación de la excitabilidad dendrítica (Beck y Yaari, 2008). Además, contribuye a la repolarización del potencial de acción y modula la frecuencia de descarga durante el disparo repetitivo (Connor y Stevens, 1971b; Johnston et al., 2000). La contribución de esta corriente en la repolarización del potencial de acción varía con el desarrollo, así varios estudios muestran como la corriente A es más prominente en las neuronas inmaduras que otras corrientes de potasio y pierde relevancia durante el desarrollo (Spigelman et al., 1992; Klee et al., 1995).

La subunidad Kv4.2 tiene un papel específico en la regulación de la actividad sináptica a nivel dendrítico en las células piramidales de hipocampo (Kim et al., 2007). Así, los canales de corriente A actúan evitando la activación subumbral de los canales de sodio durante la generación de potenciales excitatorios postsinápticos (Hoffman et al., 1997), por lo que la internalización de Kv4.2 disminuiría este bloqueo sobre los canales de sodio (Kim et al., 2007). La plasticidad sináptica también se encuentra relacionada con esta corriente en las neuronas piramidales de CA1. Así, el trabajo de Watanabe *et al.* (2002) muestra que la potenciación a largo plazo es mediada por la inactivación de los canales de corriente A. Además, Frick *et al.* (2004) demostraron que durante la potenciación a largo plazo se produce una invaginación de los canales Kv4.2 en las dendritas piramidales de hipocampo.

Los canales de la corriente A son dianas de varios sistemas neuromoduladores (Hoffman et al. 1997; Hoffman y Johnston, 1999; Pan y Colbert, 2001; Frick et al., 2004). Los canales pueden estar regulados a través de una fosforilación directa, por las enzimas PKA, PKC (Hoffman y Johnston, 1998) o MAPK (Adams et al., 1997), a través de otros mecanismos mediados por el ácido araquidónico (Villarreal, 1993), por concentraciones intracelulares de calcio (Frick et al., 2004) o incluso por ácidos grasos poliinsaturados (Boland et al., 2009). Este alto grado de regulación sugiere que la corriente A tiene un papel fundamental en la modulación de la excitabilidad neuronal. De hecho, un tratamiento agudo farmacológico sobre la subunidad Kv4.2 o una disminución de su expresión en las

neuronas piramidales de CA1 provoca un aumento de la excitabilidad (Kim et al., 2005; 2007).

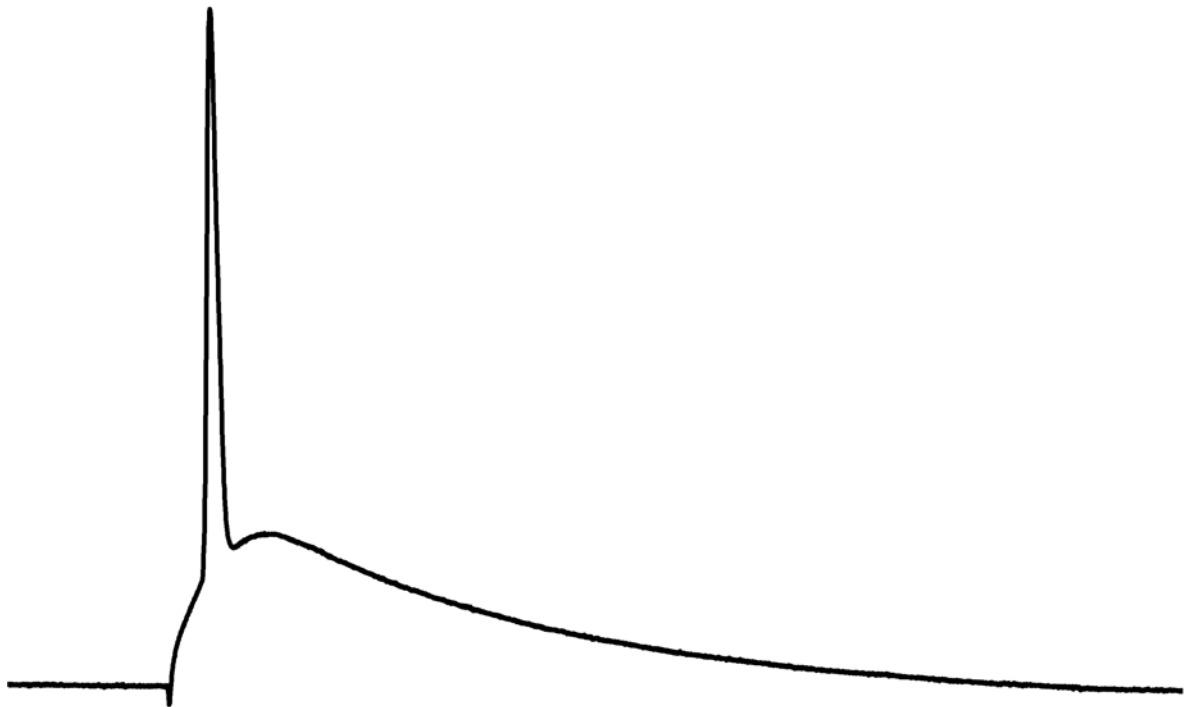
## **2. OBJETIVOS**



El papel regulador de la hormona tiroidea durante el desarrollo cerebral es bien conocido, asimismo se sabe que su ausencia desemboca en graves deficiencias neurológicas. Sin embargo, el sustrato fisiológico de estas anomalías no ha sido investigado en profundidad. Tan solo se conoce que el hipotiroidismo altera la eficacia y algunas plasticidades sinápticas en el hipocampo, pero se desconoce si la excitabilidad intrínseca está afectada. Por todo ello, para estudiar el efecto de la ausencia de hormona tiroidea sobre la excitabilidad intrínseca de las neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo, se plantearon los siguientes objetivos:

- Caracterizar el efecto que provoca la ausencia de hormona tiroidea sobre las propiedades electrofisiológicas básicas en reposo.
- Estudiar las alteraciones sobre la morfología de los potenciales de acción inducidas por el hipotiroidismo.
- Analizar los efectos del hipotiroidismo sobre los patrones y la frecuencia de descarga.
- Investigar las corrientes subyacentes implicadas en los cambios provocados por el hipotiroidismo sobre la excitabilidad intrínseca.
- Realizar un estudio comparativo de todos los cambios provocados sobre la excitabilidad intrínseca por el hipotiroidismo a lo largo del desarrollo.
- En lo posible, investigar la reversibilidad de las alteraciones que pudieran hallarse en el hipotiroidismo mediante la administración de hormona tiroidea exógena.

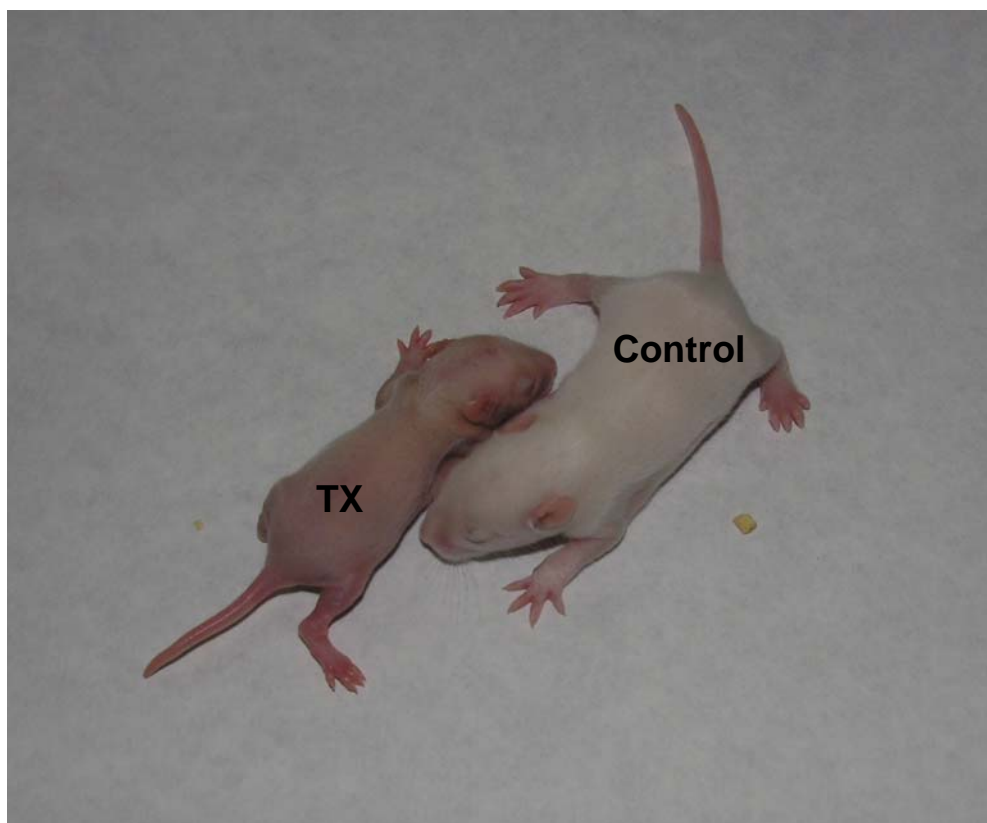
### 3. MATERIAL Y MÉTODOS



## 1. Animales de experimentación

Los experimentos se llevaron a cabo en ratas de raza Wistar de ambos sexos criadas en el animalario de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid. Las ratas hembras fueron cruzadas con machos, considerando como día cero de la gestación el que se observó el tapón vaginal. Posteriormente, el día de nacimiento de las crías se designó como día cero de la vida postnatal. En los experimentos se utilizaron dos rangos de edades, un grupo de entre 9 y 12 días (P9-12) y otro de entre 16 y 19 días (P16-19) de edad.

El hipotiroidismo congénito se indujo desde el noveno día de gestación, mediante la administración de methimazole (metilmercaptoimidazol, MMI) a las madres preñadas, diluido al 0.02% en el agua de bebida. Este método de inducción del hipotiroidismo ya ha sido previamente descrito (Pipaón et al., 1992; Vara et al., 2002; Oh-Nishi et al., 2005; Giné et al., 2010), además se considera un método muy seguro al evitar la cirugía en animales neonatales. La administración de methimazole o propylthiouracil en el agua de bebida o en la comida bloquea la oxidación del ión yoduro ( $I^-$ ) a yodo ( $I_2$ ), bloqueando así la formación de T4 y T3 en la glándula tiroides materna. Dado que estas drogas atraviesan la barrera placentaria y que además se transmiten a las crías lactantes a través de la leche, los fetos y neonatos desarrollan hipotiroidismo congénito (Morreale de Escobar et al., 1988). El tratamiento se mantuvo durante la lactancia de las crías y hasta que alcanzaron la edad en la que fueron sacrificadas para su utilización en los experimentos. El estado hipotiroideo viene demostrado por la disminución del crecimiento de los animales y sus bajos niveles de T4 y T3 (Pipaón et al., 1992; Álvarez-Dolado et al., 1998; Giné et al., 2010). En esta tesis se ve una clara disminución del peso de los animales hipotiroideos respecto a los controles (Figura 6): en el grupo P9-12 los animales controles pesaron  $20,61 \pm 0,36$  g (n=123) y los hipotiroideos  $16,59 \pm 0,29$  g (n=109,  $p < 0,001$  vs. control), en el grupo P16-19 los controles pesaron  $38,91 \pm 1,49$  g (n=144) y los hipotiroideos  $27,35 \pm 0,47$  g (n=109,  $p < 0,001$  vs. control).



**Figura 6.** Fotografía de dos ratas de 11 días: hipotiroidea (izquierda) y control (derecha).

La reversibilidad de los efectos del hipotiroidismo se estudió administrando hormona tiroidea a las crías mediante tres inyecciones intraperitoneales de T3 en tampón fosfato salino (PBS) a dosis saturante ( $20 \mu\text{g}$  de T3/100 g de peso corporal), una cada 24 horas, tres días antes de ser sacrificadas. Tratamientos similares han demostrado la restauración de niveles hormonales en los animales tratados de este modo (Thompson, 1996). El mismo tipo de inyecciones de PBS pero sin T3 se administró a las ratas controles correspondientes.

## 2. Obtención de las rodajas y células disociadas de hipocampo

Todos los experimentos se llevaron a cabo en preparaciones *in vitro* de neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo. Los animales se sacrificaron por decapitación sin anestesia. De inmediato se procedió a la extracción del cerebro y a la disección de ambos hipocampos. Para mantener el tejido en condiciones óptimas, se aplicó constantemente solución Krebs-Ringer-bicarbonato (KRB) (cuya composición se detalla en la Tabla 1, Solución 1) burbujeada con gas carbógeno (95%O<sub>2</sub>, 5%CO<sub>2</sub>) a una temperatura inferior a 4°C. Se colocaron los hipocampos extraídos sobre una lámina de agar situada bajo la cuchilla de un cortador manual y se realizaron cortes transversales de 400 micras (para registros en rodaja) o de 500 micras (para registros en células disociadas) de grosor, desechando los extremos septales y temporales de los hipocampos. Las rodajas así obtenidas se retiraron de la cuchilla del cortador con un pincel, se depositaron en una placa Petri llena de KRB frío y oxigenado, e inmediatamente se transfirieron a una cámara de mantenimiento. El tiempo total transcurrido desde el sacrificio de la rata hasta la colocación de las rodajas en la cámara de mantenimiento fue inferior a diez minutos.

Todos los experimentos se realizaron a temperaturas entre 27 y 30°C. Para los registros en fijación de corriente las rodajas fueron transferidas a la cámara de registro mediante una pipeta de vidrio y perfundidas constantemente con la Solución 1 oxigenada (1,5-2 ml/min). Los registros en fijación de voltaje se realizaron en células disociadas a partir de las rodajas de hipocampo de 500 micras. Las rodajas se sometieron primero a un proceso enzimático y a continuación a otro mecánico, siguiendo el protocolo de Kay y Wong (1986). En resumen, de cada rodaja de hipocampo se extrajo el área CA1 que se dividió en cubos de aproximadamente unos 0,5 mm de lado, los cuales se sumergieron durante 15 minutos a temperatura ambiente (27-30°C) en un baño de incubación en el que se ha añadido la proteasa (Sigma type XIV) a una concentración de 2mg/ml en la Solución 2 (Tabla 1). A continuación se lavó la enzima con la Solución 2 sin proteasa, repitiéndose tres veces el lavado a fin de eliminar por completo la proteasa. Posteriormente, se realizó el proceso mecánico utilizando pipetas Pasteur de distintos diámetros (diámetros aproximados: 0,9 mm a 0,1 mm). La solución final con las células en suspensión se extendió sobre un cubre de cristal pretratado con poly-L-lysine (para fijar las células recién disociadas) situado sobre al fondo de una placa de Petri. Al final, se colocó la placa de

Petri en la cámara de registro y se esperó cinco minutos antes de registrar, manteniendo a las células con un flujo constante (1-1,5 ml/min) de Solución 3 (Tabla 1).

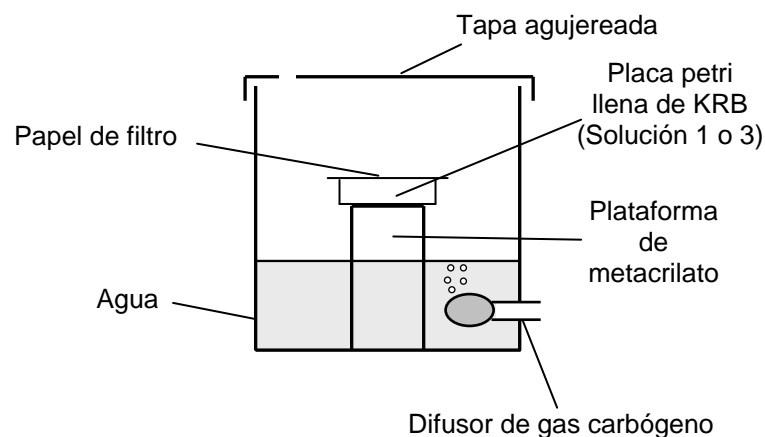
**Tabla 1.** Soluciones extracelulares.

	<b>Solución 1</b>	<b>Solución 2</b>	<b>Solución 3</b>
<b>NaCl</b>	120	105	105
<b>KCl</b>	2,5	5	2,5
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	1,3	1,3	1,3
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	2,5	1	2
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	26,2	-	26,2
<b>Glucosa</b>	11	25	11
<b>HEPES</b>	-	10	-

**Tabla 1** Resumen de las soluciones extracelulares expresadas en mM. Los tres tipos de soluciones fueron preparadas diariamente con agua desionizada Milli-Q (Millipore). Durante los experimentos las soluciones extracelulares fueron burbujeadas con gas carbónico con el fin de mantener la correcta oxigenación y un pH en torno al 7,2.

### 3. Cámara de mantenimiento

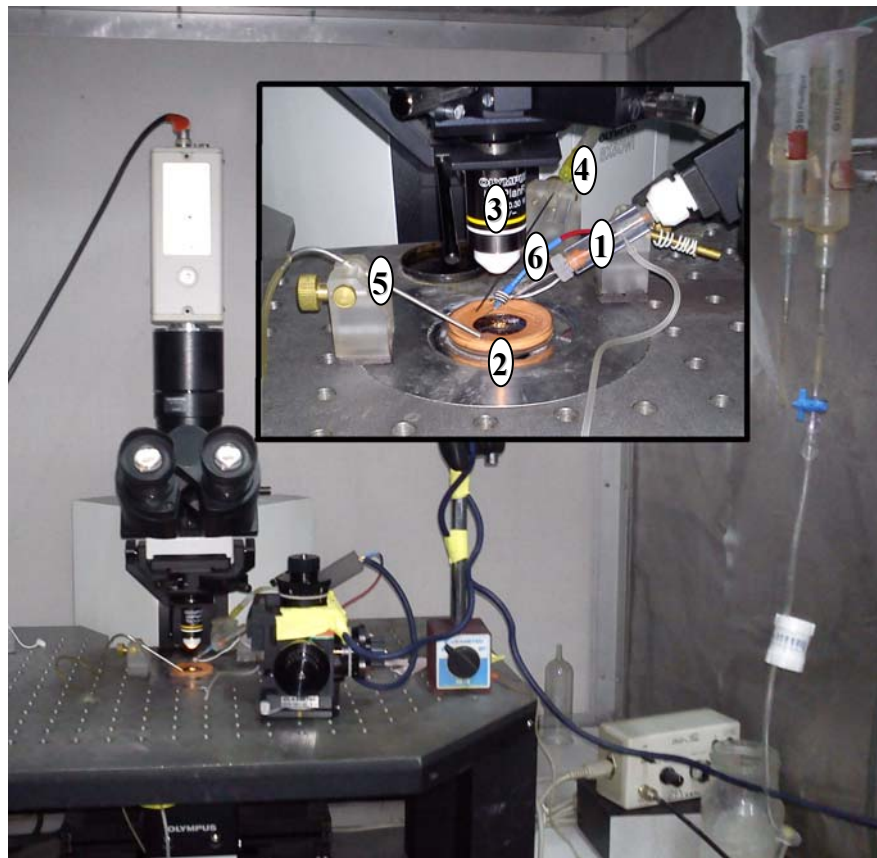
Tras la obtención de las rodajas existe un período de tiempo en el que no se detecta actividad sináptica en el tejido, presumiblemente debido al trauma que supone la preparación (Selig y Malenka, 1997). Todas las rodajas se mantuvieron un mínimo de una hora en la cámara de mantenimiento a temperatura ambiente, tiempo suficiente para permitir la recuperación de su actividad y la estabilización de las células. Esta cámara (Figura 7) consiste en un recipiente cerrado en el que el tejido se conserva en interfase KRB-aire sobre un papel de filtro empapado en solución KRB (Solución 1 o Solución 3) contenida en una placa Petri. La atmósfera de la cámara se mantiene oxigenada y saturada en vapor de agua mediante un difusor de gas carbógeno inmerso en el agua con que se llena el fondo de la cámara. El tiempo máximo que las rodajas permanecieron en la cámara de mantenimiento antes de utilizarse para los experimentos fue de 6 horas.



**Figura 7.** Esquema y fotografía de la cámara de mantenimiento empleada para la incubación de las rodajas de hipocampo.

## 4. Unidad de registro

Tanto en los registros en fijación de corriente de neuronas piramidales en rodajas de CA1, como en los registros en fijación de voltaje de neuronas disociadas se utilizó la misma unidad de registro (Figura 8), situada sobre una mesa antivibratoria en una campana de Faraday. La preparación se perfundió con una solución extracelular oxigenada con gas carbógeno que por gravedad llega a la zona de registro, de donde es recogida de forma suave por un tubo conectado a una bomba, manteniendo el volumen del líquido en la zona de registro constante. Se empleó un microscopio situado sobre la cámara de registro para visualizar la preparación.



**Figura 8.** Fotografía de la unidad de registro con una ampliación del baño.

- |                               |   |
|-------------------------------|---|
| 1.- Electrodo de registro.    | 4.- Entrada de solución extracelular (1 o 3). |
| 2.- Placa de registro.        | 5.- Salida de solución extracelular.          |
| 3.- Objetivo del microscopio. | 6.- Tierra.                                   |

## 5. Soluciones intracelulares

A continuación se detallan los líquidos intracelulares empleados en la elaboración de esta tesis (Tabla 2). La Solución 1 se empleó para registrar los potenciales de acción de las neuronas en rodaja. Las Soluciones 2 y 3 se emplearon para registrar las corrientes de calcio y potasio respectivamente de células disociadas. Las soluciones se prepararon disolviendo en agua desionizada Milli-Q los distintos compuestos a excepción del Tris-ATP. Tras el ajuste del pH a 7,2 y la osmolaridad entre 270 y 300 mOsm (ver Tabla 2), se hicieron alícuotas que se congelaron a -20°C hasta el día del experimento. El Tris-ATP se añade fresco cada día, ya que la descongelación de este compuesto en una solución acuosa altera sus propiedades.

**Tabla 2.** Soluciones intracelulares.

	Solución 1 (registro de potenciales de acción)	Solución 2 (registro de corrientes de calcio)	Solución 3 (registro de corrientes de potasio)
<b>K-Gluconato</b>	125	-	-
<b>Cs-Gluconato</b>	-	80	-
<b>KCl</b>	-	-	80
<b>Sacarosa</b>	-	-	40
<b>EGTA</b>	10	5	10
<b>BAPTA</b>	-	5	-
<b>HEPES</b>	10	10	10
<b>NaCl</b>	8	-	-
<b>Tris-ATP</b>	3	5	4
<b>GTP</b>	0,3	0,3	0,3
<b>TEA-Cl</b>	-	20	-
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	2	5	4,5
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	0,5	0,5	-
<b>Fosfocreatina</b>	20	20	15
<b>Creatina fosfoquinasa * (U/ml)</b>	50	50	-
<b>Osmolaridad * (mOsm)</b>	300	270	275

**Tabla 2.** Resumen de las soluciones intracelulares (concentraciones expresadas en mM excepto \*). El pH se ajustó con KOH en las Soluciones 1 y 3 y con CsOH en la Solución 2.

## **6. Reactivos y drogas**

Las drogas que se utilizaron en los experimentos se prepararon con antelación como soluciones stock muy concentradas (1000X) para alterar lo menos posible la composición del líquido extracelular al añadirlas, excepto la 4-AP que se preparó a 100X. Todas se disolvieron en agua desionizada Milli-Q excepto la linopiridina que se disolvió en etanol.

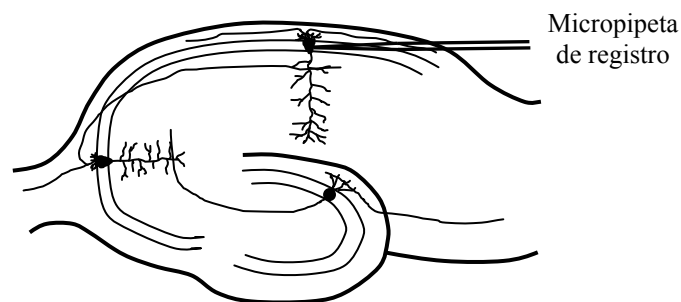
## 7. Técnicas electrofisiológicas

### 7.1. Técnica de *patch-clamp*

La técnica de pinzamiento de membrana en modo de célula entera (*whole-cell patch-clamp*) permite registrar el comportamiento eléctrico de la membrana de una única neurona gracias al establecimiento de comunicación directa entre el medio interno (citoplasma) de dicha neurona y el líquido que se encuentra en el interior de la micropipeta.

#### 7.1.1. Registro en rodaja

En el caso del registro en rodaja se utilizó el método ciego (Blanton et al., 1989; Coleman y Miller, 1989) para registrar intracelularmente por pinzamiento de membrana en célula entera las neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo. Para dichos registros se emplearon micropipetas de vidrio fabricadas a partir de capilares de vidrio (borosilicato de 0.86 mm de diámetro interno), utilizando un estirador de micropipetas horizontal de la marca Sutter Instruments. Posteriormente, las micropipetas se rellenaron con solución intracelular (Solución 1, Tabla 2) presentando unas resistencias de entre 4 y 10 M $\Omega$ .



**Figura 9.** Esquema de registro intracelular en una neurona piramidal de CA1.

Para obtener los registros de las neuronas piramidales en rodaja, se situó la micropipeta sobre el *stratum pyramidale* de CA1, con una disposición paralela a la capa de somas (Figura 9). Se aplicó una presión positiva de entre 4 y 5 ml en el interior de la micropipeta utilizando una jeringa de 10 ml conectada por un tubo de polietileno al soporte (*holder*) de la micropipeta, para evitar que algún resto de tejido tapone la punta de la micropipeta, mientras se va introduciendo en el tejido mediante un micromanipulador. Durante todo este proceso se aplicaron pulsos negativos de voltaje (3 mV de amplitud, 60

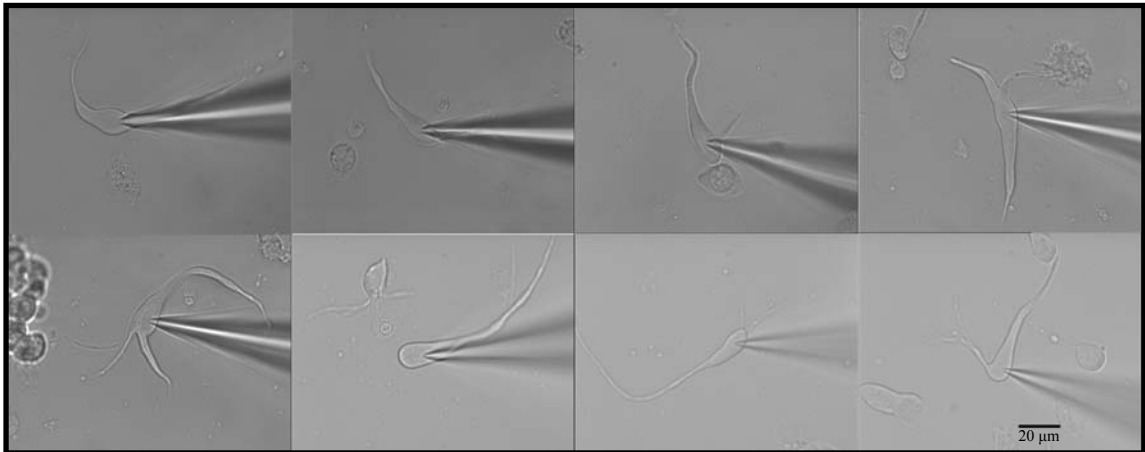
ms de duración, frecuencia de 5 Hz) a través de la punta de la micropipeta mediante el amplificador (Axoclamp 2A) en modo de registro de fijación de voltaje a 0 mV, mientras se monitorizaba la corriente registrada en el osciloscopio. Cuando se observó una disminución en el tamaño del pulso de corriente, supuestamente producida por el acercamiento de una membrana de una célula a la punta de la micropipeta, se ejerció presión negativa a través de la jeringa, consiguiéndose en muchas ocasiones la formación de un sello de la punta de la micropipeta con dicha membrana, detectándose un aumento de la resistencia de la micropipeta hasta valores de gigaohmios. Cuando el sello era estable, tras fijar el voltaje a -65 mV, se realizó una ligera succión para abrir el parche de membrana, comunicando el interior de la micropipeta con el citoplasma celular. Una vez finalizado este proceso se pasó a registrar en fijación de corriente.

### **7.1.2. Registro de células disociadas**

En el caso del registro de células disociadas no se empleó el método ciego, puesto que las células están visibles en todo momento (Figura 10). Se utilizaron las mismas micropipetas que en el caso anterior, pero modificadas para que la punta de la micropipeta sea más corta y de mayor diámetro. Posteriormente, las micropipetas se rellenaron con la solución intracelular (Solución 2 o Solución 3), presentando unas resistencias de entre 3 y 7 M $\Omega$ . Para realizar estos registros se situó la micropipeta, mediante un micromanipulador, encima de una de las células disociadas, en este caso no es necesaria la aplicación de presión positiva en la punta de la micropipeta, y se descendió la punta del electrodo hasta hacer contacto con la membrana plasmática de la neurona. El resto de la técnica fue similar a la descrita para el registro de neuronas piramidales en rodajas, a excepción de:

- El amplificador empleado, Axopatch 1D para los registros de corrientes de calcio y el Axopatch 200B para los registros de corrientes de potasio.
- El pulso negativo para la obtención del sello, que en el caso del amplificador Axopatch 200B fue de 5 mV de amplitud y 10 ms de duración.

Finalizado este proceso se mantuvo a la neurona en fijación de voltaje para registrar las corrientes.



**Figura 10.** Imágenes de neuronas recién disociadas del área CA1 del hipocampo registradas con la técnica de *patch-clamp*.

## 7.2. Registros en fijación de corriente

Para los experimentos realizados en rodajas de hipocampo se utilizó el modo de fijación de corriente, que permite fijar el potencial de la membrana por medio de inyección de corriente y registrar los cambios de voltaje para una corriente determinada. Los registros fueron adquiridos a través de un Headstage HS-2 de ganancia 0,1 acoplado a un amplificador Axoclamp 2A y digitalizado con Digidata 1322 (Molecular Devices). Como electrodo de referencia se utilizó una píldora de plata clorurada sumergida en la solución de perfusión de la cámara de registro, conectada a un cable que, en su otro extremo, se unió al conector de tierra del Headstage. Las células piramidales incluidas en este estudio tenían un potencial de membrana en reposo de al menos  $-60$  mV y el pico de sus potenciales de acción siempre superaban los  $0$  mV. Las células fueron mantenidas brevemente por fijación de corriente en  $-60$  mV para medir las propiedades básicas de membrana. La resistencia en serie fue compensada en estos registros.

En la mayoría de registros en rodaja se añadió al medio extracelular el antagonista del receptor de glutamato 6-cyano-7-nitro-quinoline-2,3-dione (CNQX,  $15$   $\mu$ M) para bloquear potenciales rápidos postsinápticos excitatorios y el antagonista del receptor de GABA<sub>A</sub> picrotoxina (PTX,  $100$   $\mu$ M) para bloquear los potenciales rápidos postsinápticos inhibitorios.

### 7.3. Registros en fijación de voltaje

La permeabilidad de la membrana de cualquier ión es función de dos variables: tiempo y voltaje. Para poder estudiar la permeabilidad de forma cuantitativa es necesario poseer control experimental de una de estas dos variables. Con la técnica de control de voltaje se consigue este objetivo, fijando el valor del potencial de membrana a un valor constante para observar cómo la permeabilidad varía en función de la otra variable (tiempo). De este modo se puede medir la corriente de membrana que fluye a un potencial de membrana fijo y utilizar los cambios en el tiempo de las corrientes de membrana como un índice de la evolución temporal de los cambios subyacentes en la conductancia iónica de la membrana. Cuando el potencial fijado es diferente al potencial de membrana, el amplificador pasa corriente a fin de llevar el potencial de membrana al valor que deseamos. Esta corriente es positiva cuando el potencial fijado es más positivo que el potencial de membrana de reposo, y es negativa cuando el potencial fijado es más negativo. La cantidad de corriente que pasa el amplificador para mantener el potencial de membrana igual al potencial fijado es la que se registra y se estudia.

Los registros en fijación de voltaje en neuronas piramidales disociadas se pueden dividir en dos grupos: a) registros para corrientes de calcio, realizados con el amplificador Axopatch 1D, utilizando la solución intracelular 2 (Tabla 2) y compensando la resistencia y la capacidad de membrana un 75-80%; b) registros de corrientes de potasio, realizados con el amplificador Axopatch 200B, utilizando la solución intracelular 3 (Tabla 2) y compensando la resistencia y la capacidad de membrana un 80%. En ambos tipos se digitalizaron las señales analógicas mediante el digitalizador Digidata 1322. Se eligieron para registrar aquellas neuronas que presentaban un tono brillante y uniforme. Las neuronas bajo estas condiciones aguantan hasta 40 minutos de registro. Sólo se utilizaron aquellas neuronas que presentaron una resistencia de acceso por debajo de 20 M $\Omega$  y una resistencia de membrana por encima de 150 M $\Omega$ . Tampoco se registraron células con una capacidad de membrana por debajo de 10 pF. Además, en el caso de los registros de corrientes de potasio tampoco se utilizaron las células con una capacidad por encima de 30 pF.

## 8. Análisis de los registros

Todos los registros fueron digitalizados a 20 kHz y analizados con los programas pClamp 9.2 y Origin. Al emplear distintos líquidos intracelulares y extracelulares el *junction potential* varía de unos experimentos a otros, por lo que todos los datos que se muestran en esta tesis han sido normalizados teniendo en cuenta su *junction potential* para que sean comparables entre sí.

### 8.1. Medición de las propiedades básicas de membrana en células en rodaja

El potencial de membrana en reposo ( $V_m$ ) se midió al inicio de los registros, antes de fijar la célula a un voltaje determinado.

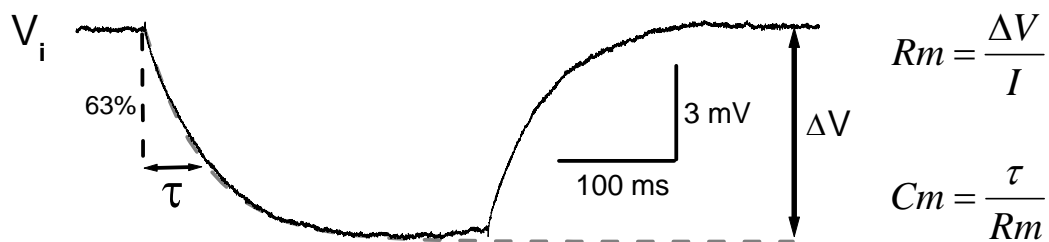
El resto de las propiedades básicas de membrana se midieron manteniendo las células a -60 mV en fijación de corriente, para evitar diferencias en la resistencia de la membrana voltaje-dependientes y variaciones en el potencial de membrana. Se administraron pulsos cuadrados hiperpolarizantes, de entre 10 y 30 pA de amplitud y 300 ms de duración, a través de la micropipeta de registro y se midió la respuesta de voltaje producida (Figura 11).

El valor de la resistencia de membrana ( $R_m$ ) se calculó a partir de la Ley de Ohm. Es decir, la relación entre la intensidad del pulso de corriente ( $I$ ) y la diferencia de voltaje ( $\Delta V$ ) que genera este pulso ( $R_m = \Delta V/I$ ), donde  $\Delta V$  es la diferencia entre el voltaje inicial ( $V_i$ ) antes del pulso y el voltaje final que se alcanzaría de forma pasiva si no existieran conductancias dependientes de tiempo y voltaje (como las corrientes de sodio y potasio activadas por la hiperpolarización). Para calcular este voltaje final se tomaron los valores de voltaje de los 100 milisegundos del comienzo del pulso, cuando el cambio de voltaje en la membrana aún no ha llegado a un valor máximo estable, y se realizó una simulación en el programa Origin donde se alcanza el valor máximo estable para ese pulso pero sin la interferencia de estas conductancias.

La constante de tiempo ( $\tau$ ) es el tiempo en el cuál se alcanza el 63% del voltaje total. En el caso de que la membrana sólo tuviera propiedades resistivas, un pulso de

corriente que atraviesa la misma provocaría un cambio de potencial instantáneo. Sin embargo, la membrana neuronal tiene propiedades capacitivas además de las resistivas que tienen como efecto una reducción de la velocidad a la que cambia el potencial de membrana en respuesta a un pulso de corriente. El tiempo que tarda en alcanzar el voltaje máximo varía dependiendo de las propiedades capacitivas y resistivas de cada neurona. Para conocer dichas propiedades se estudia la constante de tiempo de la membrana que se define como el producto de la resistencia a la entrada de corriente por la capacidad de la membrana. La constante de tiempo se calculó experimentalmente, correspondiendo al tiempo que tarda el potencial de membrana en alcanzar 63 % de su valor máximo estable.

La capacidad de membrana ( $C_m$ ) se calculó a partir de la relación de la constante de tiempo y la resistencia de membrana ( $C_m = \tau / R_m$ ).



**Figura 11.** Registro en fijación de corriente con un pulso negativo de 300 ms de duración y una intensidad de 20 pA. La línea gris discontinua se representa la simulación realizada con el programa Origin.

## 8.2. Clasificación del patrón de disparo

Las neuronas piramidales de CA1 presentan dos modos de disparo ante un pulso despolarizante: un disparo en ráfagas o BS (*Burst-spiking*) o un disparo regular o RS (*Regular-spiking*). Aunque el comportamiento en la mayoría de los casos se puede distinguir claramente se realizó un estudio de los intervalos de tiempo entre las espigas para clasificar con mayor rigor a las neuronas. Para cada célula se midió el intervalo entre espigas o ISI (*interspike interval*) más corto para un pulso despolarizante que cause un tren de potenciales de acción (entre 4-8 espigas) y se dividió entre el ISI promedio de dicho pulso, obteniendo así un ratio conocido como ISI ratio. Cuando este ISI ratio es menor de 0,4 la célula se clasificó como BS, cuando el ISI ratio es mayor de 0,4 se consideró RS.

### 8.3. Medición de los parámetros del potencial de acción (PA)

Los parámetros del potencial de acción fueron analizados en el primer PA inducido tras un pulso de corriente despolarizante en neuronas piramidales de CA1 (Figura 12), a excepción del estudio del ensanchamiento de los potenciales de acción (apartado 3.3 de Resultados) en donde también se analizó el potencial de acción que se produce a los  $600 \pm 25$  ms del inicio del pulso, para compararlo con el primer PA del mismo pulso.

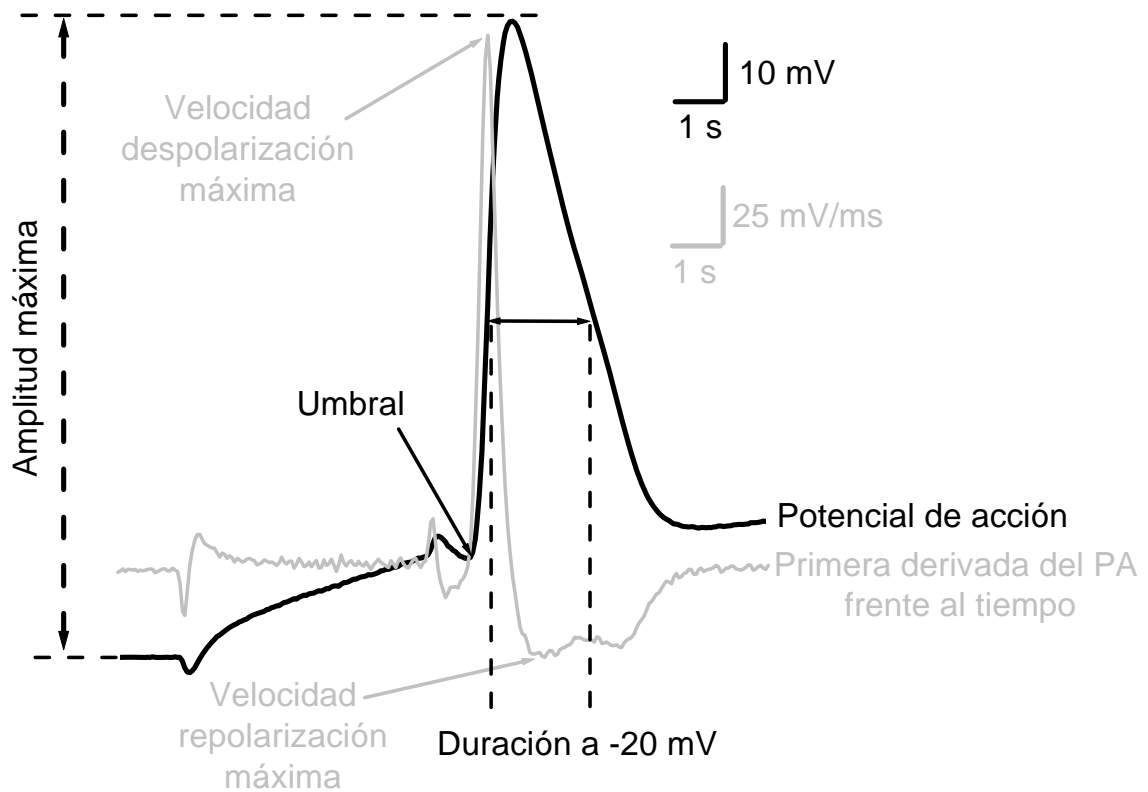
El umbral de disparo fue definido como el voltaje en el que la velocidad de despolarización sobrepasaba los 10 V/s. Criterios similares han sido adoptados por otros autores (Stuart et al., 1997; Fricker et al., 1999).

La amplitud del potencial de acción se calculó como la diferencia entre el potencial de membrana inmediatamente anterior a la administración del pulso de corriente y el valor de voltaje máximo alcanzado por el potencial de acción, y se la denominó amplitud máxima. En el estudio de los PA del apartado 3.3 de Resultados se empleó como medida la amplitud umbral, definida como la diferencia entre el potencial de membrana del umbral de disparo del PA y el valor del voltaje máximo alcanzado por el PA.

La duración del PA se calculó como el tiempo que transcurre desde que el PA alcanza el potencial de -20 mV hasta que decae al mismo voltaje, denominándola duración a -20 mV. En el apartado 3.2 de Resultados, al estudiar PA de neuronas que se encuentran en diferentes potenciales de membrana, se empleó la duración media, definida como el tiempo que transcurre desde que el PA alcanza el voltaje que corresponde al 50 % de su amplitud máxima hasta que decae al mismo voltaje.

La despolarización y la repolarización máxima del potencial de acción se midieron tomando el valor máximo y mínimo, respectivamente, de la primera derivada del PA respecto al tiempo.

La repolarización máxima del primer tercio se midió tomando el valor máximo de la pendiente en el primer tercio de la fase de repolarización, comenzando 300  $\mu$ s después del pico del potencial de acción.



**Figura 12.** Registro de un potencial de acción. En gris se representa la primera derivada respecto al tiempo del registro.

#### 8.4. Medición de los parámetros de la despolarización postpotencial (ADP)

La despolarización postpotencial o ADP se generó tras una inyección de corriente despolarizante de 5 ms, con una intensidad suficiente para generar un potencial de acción, en registros de fijación de corriente. Se analizó la duración media y la amplitud máxima del ADP (Figura 13).

La amplitud máxima del ADP se midió como la diferencia entre el pico máximo de voltaje del ADP y el potencial de membrana inmediatamente anterior a la administración del pulso. Algunas células no presentan un pico máximo bien definido, en estos casos el valor de voltaje tomado como máximo fue aquel que coincidía en el tiempo con el promedio de los picos máximos de las células que si presentan un pico bien definido.

El inicio del ADP se definió como el tiempo en el que el potencial de acción alcanza su valor mínimo de velocidad de repolarización, medida a partir de la primera derivada frente al tiempo. El intervalo de tiempo entre el inicio del ADP y el tiempo en el cual ha caído un 50% de su amplitud máxima es lo que se toma como duración media.

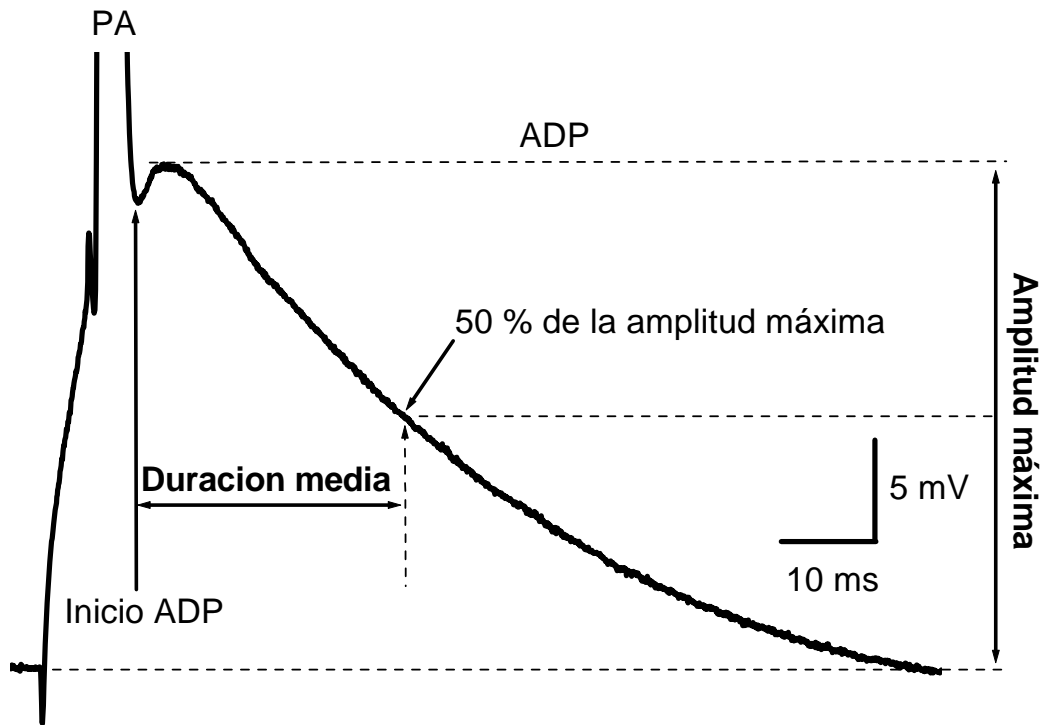
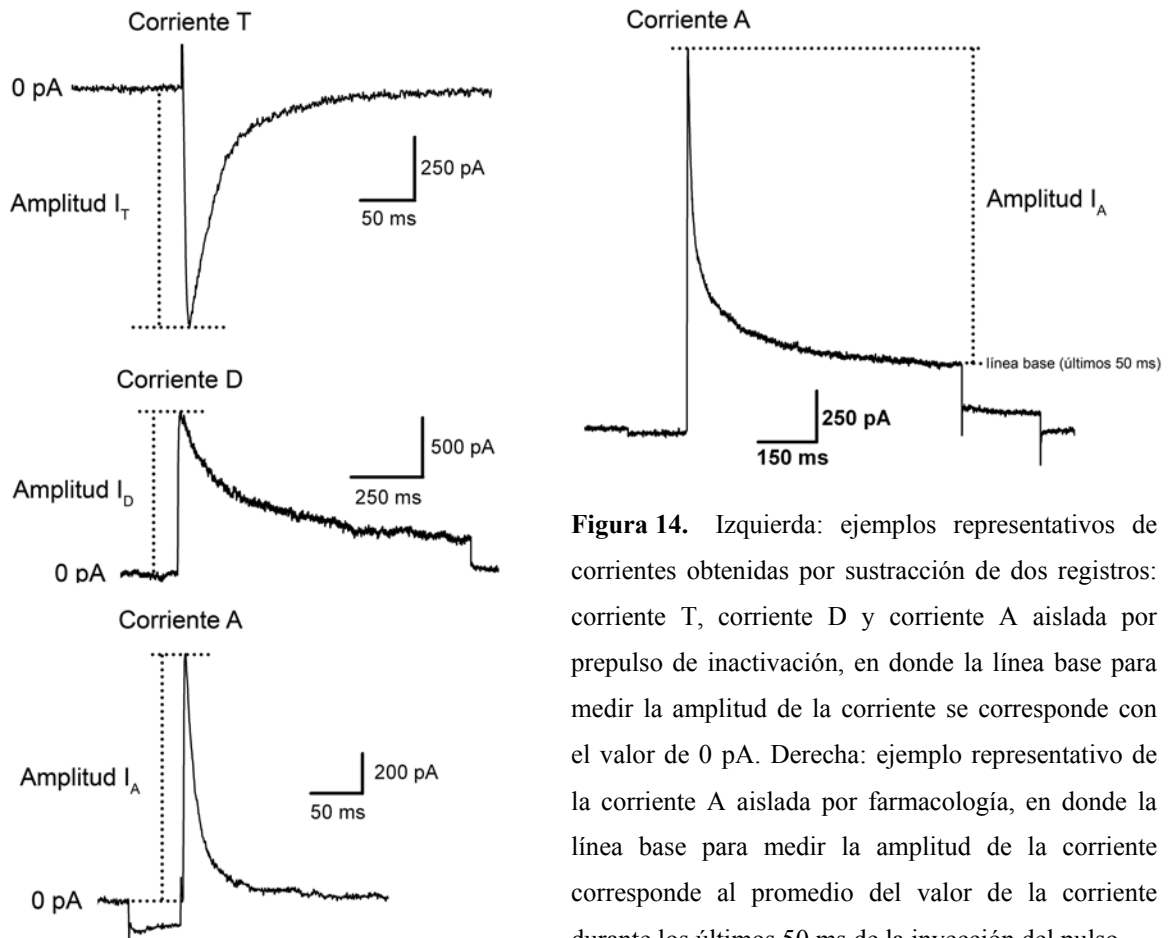


Figura 13. Registro de un potencial de acción y su despolarización postpotencial (ADP).

### 8.5. Medición de la densidad de corriente en los experimentos en fijación de voltaje

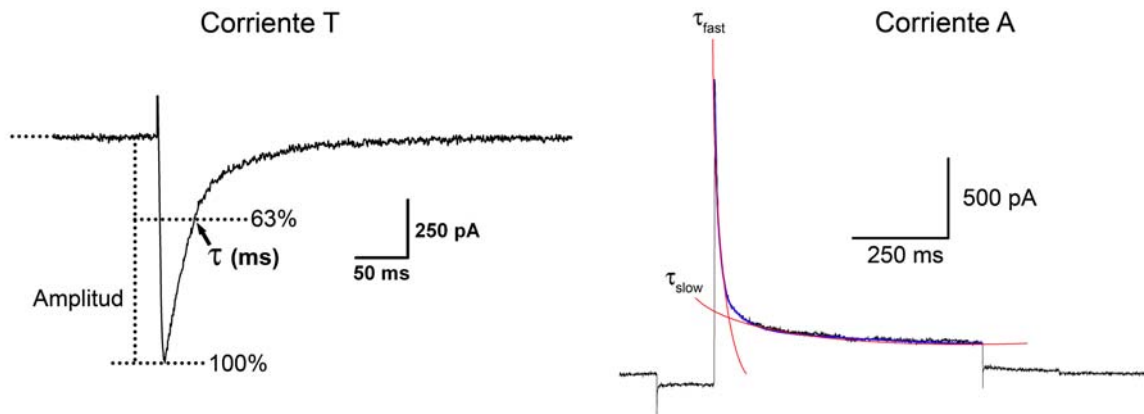
La cantidad de corriente registrada en una neurona es dependiente del tamaño celular, por lo que no se debe usar únicamente el valor de la corriente registrada para analizarlas debido a que la capacidad de membrana varía entre los animales controles e hipotiroideos durante el desarrollo. Para normalizar estos valores, se calculó la densidad de corriente (pA/pF), que se relaciona con el número de canales por unidad de superficie. Se midió dividiendo la amplitud al pico de la corriente (pA) registrada entre su capacidad de membrana (pF). En el caso de las corrientes obtenidas por sustracción (corriente T, corriente D y corriente A aisladas por prepulso de inactivación), la amplitud al pico para cada caso se midió con respecto a la línea base que se corresponde con el valor de 0 pA debido a la sustracción (Figura 14, izquierda). En el caso de la corriente obtenida sin sustracción (corriente A aislada por farmacología), la amplitud se midió como la diferencia entre el pico de la corriente y el promedio del valor de la corriente durante los últimos 50 ms de la inyección del pulso, tomando este valor como la línea base (Figura 14, derecha).



**Figura 14.** Izquierda: ejemplos representativos de corrientes obtenidas por sustracción de dos registros: corriente T, corriente D y corriente A aislada por prepulso de inactivación, en donde la línea base para medir la amplitud de la corriente se corresponde con el valor de 0 pA. Derecha: ejemplo representativo de la corriente A aislada por farmacología, en donde la línea base para medir la amplitud de la corriente corresponde al promedio del valor de la corriente durante los últimos 50 ms de la inyección del pulso.

## 8.6. Obtención de las constantes de tiempo de caída de las corrientes en los experimentos en fijación de voltaje

Las cinéticas de inactivación indican cómo decae la corriente a lo largo del tiempo a un voltaje determinado. Para el estudio de las mismas se emplearon dos métodos. Por un lado, para las corrientes obtenidas de la sustracción de dos registros, la corriente T y la corriente D, se calculó la constante de tiempo de caída, es decir el tiempo que tarda la corriente en caer un 63% de su amplitud total (Figura 15, izquierda), obteniendo una única constante de tiempo de caída. Por otro lado, para la corriente obtenida sin sustracción de dos registros, la corriente A aislada por farmacología, se utilizó el programa pClamp 9 para ajustar la caída a una exponencial doble, obteniendo dos constantes de tiempo de caída, una rápida ( $\tau_{fast}$ ) y otra lenta ( $\tau_{slow}$ ) (Figura 15, derecha).



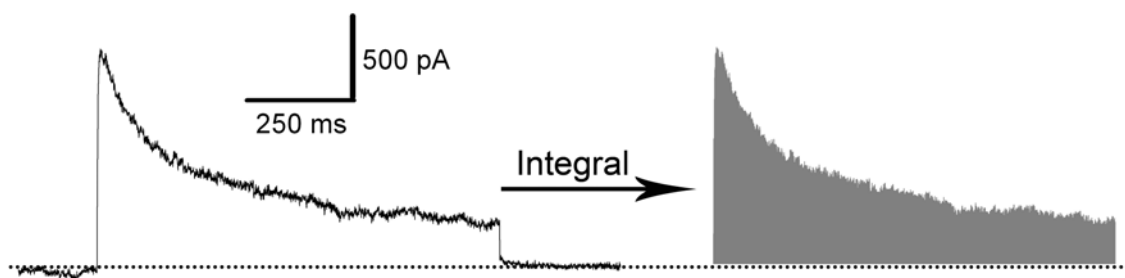
**Figura 15.** Análisis de las constantes de tiempo de caída de las corrientes registradas en fijación de voltaje. Izquierda: Ejemplo de un registro de corriente T obtenida por sustracción. La flecha indica el tiempo donde se mide la constante de caída, al 63% de la amplitud total. Derecha: Ejemplo de un registro de corriente A obtenida por farmacología. En este caso las constantes de caída se miden utilizando el programa pClamp, ajustando la caída a una doble exponencial (azul), obteniendo dos constantes de tiempo de caída (rojo).

### 8.7. Obtención de las gráficas de activación

Las curvas de activación que se presentan en esta tesis fueron normalizadas frente a la conductancia máxima a partir de curvas de la relación corriente-voltaje (I-V). La conductancia (G) fue calculada dividiendo la amplitud de la corriente entre la fuerza electromotriz o *driving force*. La *driving force* se define como la diferencia entre el potencial de inversión de un ión determinado (en nuestro caso  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{K}^{+}$ ) y el potencial al cual se obtuvo la corriente. Las conductancias obtenidas para cada voltaje fueron normalizadas con respecto a las conductancias máximas, promediadas y representadas en las Figuras 39, 44 y 51. La curva continua de la grafica representa el ajuste de los datos a la ecuación de Boltzmann ( $G=1 / [1+\exp (V_{50}-V) / k]$ ), donde  $V_{50}$  es el voltaje de activación medio (cuando el 50% de los canales están abiertos) y k es la pendiente de la curva.

### 8.8. Medición de la carga total de corriente D-like

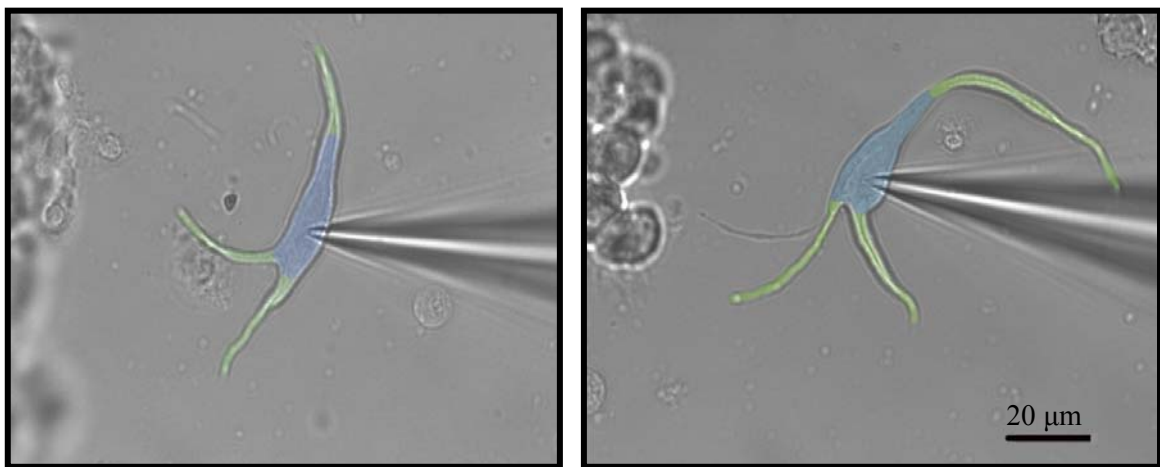
Dentro de las corrientes estudiadas en esta tesis la corriente D es la que presenta las cinéticas de inactivación más lentas, por lo que, además de conocer su densidad de corriente al pico, también es importante conocer la densidad de carga total de la corriente D-like a lo largo del tiempo. La carga total fue calculada como el área debajo de la curva del registro de la corriente D (corriente  $\cdot$  tiempo). Al dividirla entre la capacidad de membrana de la célula se obtiene la densidad de carga total. Para medir el área debajo de la curva se realizó la integral de cada registro (Figura 16).



**Figura 16.** Obtención del valor de la carga total de corriente D medida como área en  $\text{pA} \cdot \text{ms}$  (gris) a partir de la integral de un registro de corriente D aislada por sustracción.

## 9. Análisis de imagen

Las imágenes de las células disociadas fueron realizadas con una cámara CCD-IRIS justo antes del comienzo de los experimentos. Se midió el área de los somas y de las dendritas con el programa Adobe Photoshop CS3, considerando a cualquiera de las proyecciones del soma como dendritas cuando el diámetro de la misma fue menor de 3,5 micras (Figura 17).

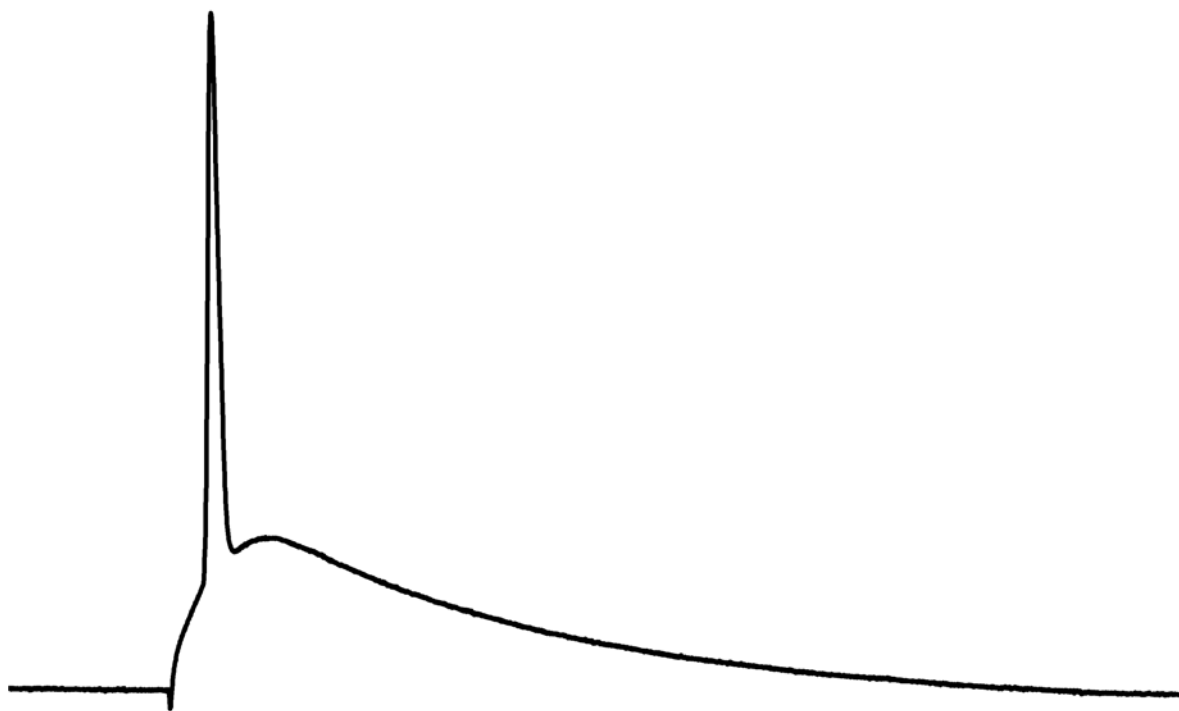


**Figura 17.** Ejemplos representativos de células disociadas. En azul se muestra el área del soma y en verde el área de las dendritas.

## 10. Análisis estadístico

Los valores promedios de los datos procedentes de cada tipo de experimento se presentan como media  $\pm$  error estándar. El análisis estadístico utilizado para la comparación de las condiciones experimentales se basó en la determinación de la diferencia de medias de los grupos mediante el test de contraste de la  $t$  de Student. Cuando las medias comparadas pertenecen al mismo registro, se utilizó la aplicación del test para medidas pareadas. En cambio, cuando se comparan medias de registros distintos, se aplicó este test pero para medidas independientes. Las diferencias se consideraron significativas cuando el valor de  $p$  resultó inferior a 0,05. Para todos los análisis estadísticos se utilizó el programa Origin.

## 4. RESULTADOS



## 1. Efectos del hipotiroidismo sobre las propiedades básicas de la membrana neuronal

En primer lugar, dentro del estudio comparativo entre animales controles e hipotiroideos se estudiaron las propiedades electrofisiológicas básicas de membrana de las neuronas piramidales del área CA1 durante el desarrollo postnatal. Estos experimentos se llevaron a cabo en ratas de entre 9 y 19 días de edad postnatal, mediante registros de *patch-clamp* de membrana en célula entera en rodajas hipocampales y en neuronas disociadas. Las propiedades electrofisiológicas básicas estudiadas fueron: el potencial de membrana en reposo ( $V_m$ ), la resistencia de membrana ( $R_m$ ), la constante de tiempo ( $\tau$ ) y la capacidad de membrana ( $C_m$ ). Hay que tener en cuenta que los resultados obtenidos en rodaja son más fisiológicos. Por un lado, las células disociadas presentan un árbol dendrítico truncado debido al proceso de disociación, mientras que las células registradas en rodaja mantienen su morfología sin alteraciones. Por otro lado, los líquidos intracelulares empleados en los registros en rodaja son más similares a los fisiológicos que los empleados en los registros en disociadas.

### 1.1. Propiedades de membrana de neuronas registradas en rodaja

#### 1.1.1. Potencial de membrana en reposo

Se comenzó el estudio de las propiedades eléctricas comparando las posibles diferencias entre ratas controles e hipotiroideas del potencial de membrana en reposo, registrado en neuronas piramidales del área de CA1 del hipocampo. Para ello, se tomó el valor del potencial de membrana en reposo ( $V_m$ ) de 151 neuronas de ratas controles y de 152 hipotiroideas registradas en rodaja, en dos grupos de edad: de 9 a 12 días y de 16 a 19 días, encontrando que las neuronas hipotiroideas presentan un potencial de membrana estadísticamente más despolarizado que las controles (Tabla 3).

**Tabla 3.** Potencial de membrana en reposo de las neuronas registradas en rodaja expresado en mV

Edad	Grupo	$V_m$ (mV)	Nº de células
P9-12	Control	$-73,3 \pm 0,4$	86
	TX	$-71,7 \pm 0,4^{**}$	65
P16-19	Control	$-73,8 \pm 0,5$	77
	TX	$-72,6 \pm 0,4^*$	75

TX vs.Control: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

### 1.1.2. Resistencia de membrana

A continuación se estudiaron las posibles diferencias en la resistencia de membrana ( $R_m$ ) entre ratas controles e hipotiroideas. Para que el factor del potencial de membrana no influyera en los resultados, se controló su valor durante la aplicación de los pulsos de corriente, manteniéndolo en  $-60$  mV (ver Material y Métodos). Las neuronas hipotiroideas presentan resistencias de membrana estadísticamente mayores que las controles en los dos grupos de edad (Tabla 4). Estos datos se confirman al analizar el *bias current* que necesitan las células para pasar de  $-60$  a  $-80$  mV, tanto en el grupo P9-12 (control:  $56,64 \pm 3,44$  pA,  $n=32$  vs. TX:  $40,87 \pm 3,44$  pA,  $n=20$ ,  $p < 0,01$ ) como en el grupo P16-19 (control:  $123,35 \pm 7,67$  pA  $n=24$  vs. TX:  $112,82 \pm 4,35$  pA,  $n=24$ ). Las neuronas hipotiroideas necesitan menos corriente para llegar a  $-80$  mV desde  $-60$  mV debido a su mayor resistencia de membrana.

**Tabla 4.** Resistencia de membrana de las neuronas registradas en rodaja expresada en  $M\Omega$

Edad	Grupo	$R_m$ ( $M\Omega$ )	Nº de células
P9-12	Control	$461 \pm 20$	86
	TX	$609 \pm 29^{**}$	65
P16-19	Control	$280 \pm 14$	77
	TX	$341 \pm 15^{**}$	75

TX vs. Control: \*\*  $p < 0,01$ .

### 1.1.3. Constante de tiempo de la membrana

La constante de tiempo se midió experimentalmente, correspondiendo al tiempo que tarda el potencial de membrana en alcanzar el 63 % de su valor máximo estable. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las constantes de tiempo obtenidas en las neuronas piramidales controles con respecto a las hipotiroideas (Tabla 5).

**Tabla 5.** Constante de tiempo de membrana de las neuronas registradas en rodaja expresada en ms

Edad	Grupo	$\tau$ (ms)	Nº de células
P9-12	Control	$53,7 \pm 1,5$	86
	TX	$54,9 \pm 1,8$	65
P16-19	Control	$48,6 \pm 1,8$	77
	TX	$46,5 \pm 2,3$	75

### 1.1.4. Capacidad de membrana

La última propiedad que se estudió fue la capacidad de membrana ( $C_m$ ). En el caso de las células registradas en rodaja se calcula a partir de la relación entre la resistencia de membrana y la constante de tiempo ( $C_m = \tau / R_m$ ). Después de realizar el análisis estadístico se observó que existen diferencias muy significativas entre las ratas controles e hipotiroideas, con una clara disminución de la  $C_m$  en el hipotiroidismo (Tabla 6).

**Tabla 6.** Capacidad de membrana de las neuronas registradas en rodaja expresada en pF

Edad	Grupo	$C_m$ (pF)	Nº de células
P9-12	Control	127,4 ± 4,7	86
	TX	98,1 ± 3,2***	65
P16-19	Control	186,8 ± 5,8	77
	TX	140,8 ± 4,3***	75

TX vs.Control: \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 1.1.5. Cambios durante el desarrollo

Cuando se analizaron las propiedades electrofisiológicas básicas de membrana de las neuronas piramidales del área CA1 durante el desarrollo postnatal, se observó que la resistencia de membrana del grupo P16-19 era estadísticamente menor con respecto al P9-12 mientras que la capacidad de membrana era estadísticamente mayor, tanto en el grupo control como en el hipotiroideo (Tabla 7). Por tanto, la resistencia de membrana disminuye mientras que la capacidad de membrana aumenta durante el desarrollo. En relación a la constante de tiempo, aunque no se encontraron diferencias entre controles e hipotiroideas (Tabla 5), si se observó una disminución durante el desarrollo en ambos grupos (Tabla 7). Por el contrario, se mantiene constante el potencial de membrana en reposo durante el desarrollo tanto en controles como en hipotiroideas (Tabla 7).

**Tabla 7.** Propiedades electrofisiológicas básicas de las neuronas registradas en rodaja durante el desarrollo

Grupo	Edad	$R_m$ (M $\Omega$ )	$C_m$ (pF)	Cte. de tiempo (ms)	$V_m$ (mV)	Nº de células
Control	P9-12	461 ± 20	127,4 ± 4,7	53,7 ± 1,5	-73,3 ± 0,4	86
	P16-19	280 ± 14***	186,8 ± 5,8***	48,6 ± 1,8*	-73,8 ± 0,5	65
TX	P9-12	609 ± 29	98,1 ± 3,2	54,9 ± 1,8	-71,7 ± 0,4	77
	P16-19	341 ± 15***	140,8 ± 4,3***	46,5 ± 2,3**	-72,6 ± 0,4	75

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

En resumen, en ausencia de hormona tiroidea las neuronas piramidales del área CA1 presentan: un potencial de membrana en reposo ligeramente despolarizado, una menor capacidad y una mayor resistencia de membrana que las neuronas controles, sin alterarse la constante de tiempo.

Durante el desarrollo, la capacidad de membrana aumenta y disminuyen la resistencia y la constante de tiempo. Estos cambios se producen tanto en ausencia como en presencia de la hormona tiroidea. Por el contrario, el potencial de membrana en reposo se mantiene estable desde P9 a P19 en ambos grupos.

## **1.2. Propiedades básicas de membrana de neuronas disociadas**

Dentro del estudio comparativo entre animales controles e hipotiroideos se han estudiado las propiedades electrofisiológicas básicas de membrana de las neuronas piramidales disociadas. Esta preparación se utilizó para estudiar tanto la corriente T ( $I_T$ ) de calcio, como las A ( $I_A$ ) y D ( $I_D$ ) de potasio mediante la técnica de fijación de voltaje. A fin de realizar un análisis adecuado de las propiedades electrofisiológicas básicas, se han distribuido a las células disociadas según el tipo de solución intracelular y amplificador empleado en el experimento, obteniendo dos grupos de células, las registradas durante el estudio de la corriente T de calcio (Solución intracelular 2, amplificador Axopatch 1D), y las registradas durante el estudio de las corrientes A y D de potasio (Solución intracelular 3, amplificador Axopatch 200B) (ver Material y Métodos). En el estudio de las propiedades básicas de  $I_T$  se utilizaron 70 neuronas piramidales de ratas controles, 81 de ratas hipotiroideas (grupo TX) y 57 de ratas hipotiroideas con tratamiento con T3 (grupo TX+T3.). En el estudio de la  $I_A$  y  $I_D$  se utilizaron 189 neuronas controles y 178 hipotiroideas, en este estudio no se midió el potencial de reposo debido a que las concentraciones de potasio intracelular empleadas lo llevan a valores más despolarizados de -50 mV, que lo hacen inestable. Además, al medirlo se compromete la viabilidad de las neuronas.

### **1.2.1. Potencial de membrana en reposo**

Al contrario de los resultados obtenidos en las neuronas registradas en rodaja hipocampal, el potencial de membrana en reposo de las neuronas disociadas hipotiroideas es similar al de las controles en ambos grupos de edad (Tabla 8).

**Tabla 8.** Potencial de membrana en reposo de las neuronas disociadas expresado en mV

Edad	Grupo	Estudio de la $I_T$ (n)
9-12	Control	$-59,7 \pm 0,2$ (36)
	TX	$-59,5 \pm 0,3$ (37)
	TX + T3	$-59,3 \pm 0,2$ (30)
16-19	Control	$-59,8 \pm 0,3$ (34)
	TX	$-59,6 \pm 0,2$ (44)
	TX + T3	$-58,6 \pm 0,3$ (27)

### 1.2.2. Resistencia de membrana

La resistencia de membrana de estas neuronas se obtuvo mediante el “*test membrane*” del programa pClamp 9 al mismo voltaje de fijación que se utilizó durante el registro en rodaja (-60 mV). En el estudio de la corriente T, las neuronas hipotiroideas presentan una resistencia de membrana mayor que las neuronas controles en ambos grupos, aunque las diferencias no son estadísticamente significativas (Tabla 9). Por el contrario, sí es estadísticamente significativa la disminución en la resistencia de membrana que se produce en las células hipotiroideas que han recibido tratamiento con T3 respecto a las hipotiroideas sin tratar. Las células tratadas revierten el valor de su resistencia hasta el de las células control. Por otra parte, la elevada resistencia de membrana que presentan las neuronas disociadas registradas en el estudio de la corriente T (Tabla 9) se debe a los bloqueantes de canales de potasio (Cs y TEA intracelular) utilizados en dicho estudio.

**Tabla 9.** Resistencia de membrana de las neuronas disociadas expresada en  $M\Omega$

Edad	Grupo	Estudio de la $I_T$ (n)	Estudio de las $I_A$ y $I_D$ (n)
9-12	Control	$1755 \pm 135$ (36)	$727 \pm 38$ (78)
	TX	$2056 \pm 146$ (37)	$753 \pm 42$ (88)
	TX + T3	$1628 \pm 134$ (30) <sup>#</sup>	
16-19	Control	$1703 \pm 126$ (34)	$625 \pm 31$ (111)
	TX	$1933 \pm 112$ (44)	$606 \pm 28$ (90)
	TX + T3	$1592 \pm 97$ (27) <sup>#</sup>	

TX+T3 vs. TX: <sup>#</sup>  $p < 0,05$ .

### 1.2.3. Capacidad de membrana

Para medir la capacidad de membrana de las células disociadas se utilizó también el “*test membrane*” del programa pClamp 9. Las neuronas disociadas también presentan una disminución en la capacidad de membrana por la ausencia de hormona tiroidea, aunque es de menor magnitud que en el caso de las registradas en rodaja, probablemente a consecuencia de la pérdida de la gran parte del árbol dendrítico producida durante el proceso enzimático y de disgregación de las células (Tabla 10). Dicha disminución es estadísticamente significativa en el grupo de neuronas disociadas para el estudio de las corrientes de potasio. Por otra parte, se produce una recuperación hacia los valores controles cuando se trata con T3 a las ratas hipotiroideas.

**Tabla 10.** Capacidad de membrana de las neuronas disociadas expresada en pF

Edad	Grupo	Estudio de la $I_T$ (n)	Estudio de las $I_A$ y $I_D$ (n)
9-12	Control	23,5 ± 0,9 (36)	17,8 ± 0,5 (78)
	TX	22,2 ± 0,7 (37)	15,6 ± 0,5 (88)**
	TX + T3	23,3 ± 0,7 (30)	
16-19	Control	22,1 ± 0,9 (34)	17,5 ± 0,5 (111)
	TX	20,2 ± 0,5 (44)	15,5 ± 0,5 (90)**
	TX + T3	24,1 ± 0,9 (27) <sup>##</sup>	

TX vs.Control: \*\* p<0,01.

TX+T3 vs. TX: <sup>##</sup> p<0,01.

### 1.2.4. Constante de tiempo de la membrana

La constante de tiempo de las células disociadas se obtiene de distinta forma que en las neuronas en rodaja. Puesto que se conoce la resistencia y la capacidad de la membrana mediante el “*test membrane*” del programa pClamp 9, por definición el producto de la mismas es la constante de tiempo ( $\tau = C_m \cdot R_m$ ). La ausencia de hormona tiroidea no altera significativamente la constante de tiempo en las células disociadas en ninguno de los grupos (Tabla 11), de forma similar al resultado obtenido en las neuronas registradas en rodaja.

**Tabla 11.** Constante de tiempo de membrana de las neuronas disociadas expresada en ms

Edad	Grupo	Estudio de la $I_T$ (n)	Estudio de las $I_A$ y $I_D$ (n)
9-12	Control	$39,9 \pm 2,7$ (36)	$12,8 \pm 0,7$ (78)
	TX	$44,1 \pm 2,8$ (37)	$11,6 \pm 0,8$ (88)
	TX + T3	$37,1 \pm 2,9$ (30)	
16-19	Control	$36,2 \pm 2,4$ (34)	$10,6 \pm 0,5$ (111)
	TX	$38,0 \pm 1,9$ (44)	$9,3 \pm 0,5$ (90)
	TX + T3	$37,2 \pm 1,8$ (27)	

### 1.2.5. Cambios durante el desarrollo

En las neuronas piramidales disociadas desaparecen gran parte de las diferencias en las propiedades electrofisiológicas básicas que presentan las neuronas registradas en rodaja durante el desarrollo postnatal, tanto en controles como en hipotiroides. Así, las diferencias observadas en la resistencia de membrana y en la constante de tiempo durante el desarrollo en las neuronas registradas en rodaja desaparecen en el grupo de células disociadas del estudio de la  $I_T$  de calcio (Tabla 12), pero se mantienen en el grupo de células disociadas del estudio de las  $I_A$  y  $I_D$  de potasio (Tabla 13). Desaparece por completo el aumento de la capacidad de membrana del grupo P16-19 con respecto al P9-12 que se observaba en las neuronas registradas en rodaja y que se relaciona con el aumento de la superficie celular por el desarrollo del árbol dendrítico (Tabla 12 y 13). Dicha desaparición posiblemente se debe a que el proceso de disociación homogeniza el tamaño celular. El potencial de membrana sigue sin alterarse durante el desarrollo en el grupo de células disociadas del estudio de la  $I_T$  de calcio, como ocurre en las neuronas registradas en rodaja.

**Tabla 12.** Propiedades electrofisiológicas básicas de las neuronas disociadas registradas en el estudio de la  $I_T$  durante el desarrollo

Grupo	Edad	Rm (M $\Omega$ )	Cm (pF)	Cte. de tiempo (ms)	Vm (mV)	Nº de células
Control	P9-11	1755 $\pm$ 135	23,5 $\pm$ 0,9	39,9 $\pm$ 2,7	-59,7 $\pm$ 0,2	36
	P17-19	1703 $\pm$ 126	22,1 $\pm$ 0,9	36,2 $\pm$ 2,4	-59,8 $\pm$ 0,3	34
TX	P9-11	2056 $\pm$ 146	22,2 $\pm$ 0,7	37,1 $\pm$ 2,9	-59,3 $\pm$ 0,3	37
	P17-19	1933 $\pm$ 112	20,2 $\pm$ 0,5	38,0 $\pm$ 1,9	-59,6 $\pm$ 0,2	44

**Tabla 13.** Propiedades electrofisiológicas básicas de las neuronas disociadas registradas en el estudio de las  $I_A$  y  $I_D$  durante el desarrollo

Grupo	Edad	Rm (M $\Omega$ )	Cm (pF)	Cte. de tiempo (ms)	Nº de células
Control	P9-12	727 $\pm$ 38	17,8 $\pm$ 0,5	12,8 $\pm$ 0,7	78
	P16-19	625 $\pm$ 31*	17,5 $\pm$ 0,5	10,6 $\pm$ 0,5*	111
TX	P9-12	753 $\pm$ 42	15,6 $\pm$ 0,5	11,6 $\pm$ 0,8	88
	P16-19	606 $\pm$ 28*	15,5 $\pm$ 0,5	9,3 $\pm$ 0,5*	90

Control vs. TX: \*  $p < 0,05$ .

### 1.2.6. Estudio morfológico de las neuronas disociadas

Como se describió en el apartado de Material y Métodos para obtener las células disociadas se somete a las rodajas de hipocampo a un proceso enzimático y a otro mecánico. Existe la posibilidad de que el proceso afecte de distinta forma a las células piramidales hipotiroideas con respecto a las controles, considerando que las células piramidales hipotiroideas presentan un árbol dendrítico alterado y un tamaño celular menor (Rami et al., 1986b). A fin de descartar esta hipótesis se realizó un estudio morfológico de las neuronas disociadas registradas, a partir de las imágenes tomadas justo antes del inicio del registro, midiendo el área de soma y de dendritas (Tabla 14).

A partir de dicho estudio se ha comprobado que las diferencias observadas entre controles e hipotiroideas en la capacidad de la membrana celular (Tabla 10), se relacionan con las del tamaño somático y no con las del árbol dendrítico (Tabla 14). Estos resultados permiten descartar que el proceso de disociación afecte de distinta forma a las células hipotiroideas frente a las controles, por lo que las diferencias encontradas en las

propiedades básicas no se relacionan con la extensión del árbol dendrítico, el cual se normaliza durante el proceso de disociación.

**Tabla 14.** Promedios del área del soma y de las dendritas de neuronas disociadas expresados en  $\mu\text{m}^2$

Edad	Grupo	Área de soma	Área de dendritas	Nº de células
P9-12	Control	253,7 $\pm$ 5,5	165,2 $\pm$ 6,0	110
	TX	210,1 $\pm$ 5,4***	156,2 $\pm$ 5,6	119
P16-19	Control	253,5 $\pm$ 7,0	157,1 $\pm$ 5,5	148
	TX	213,8 $\pm$ 5,3***	161,4 $\pm$ 5,7	128

\*\*\* p < 0,001

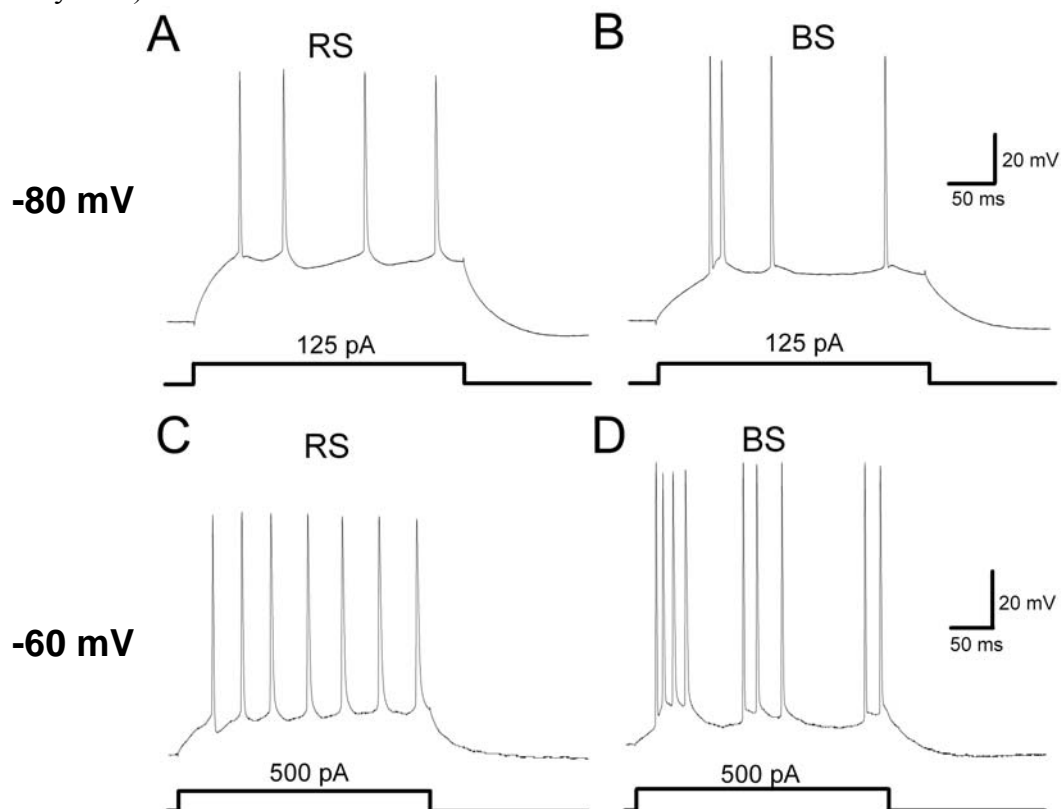
En resumen, las propiedades básicas de membrana en las neuronas disociadas sufren distintas alteraciones en ausencia de hormona tiroidea en función del estudio realizado, bien sea para el estudio de la corriente T, o para el estudio de las corrientes de potasio. La resistencia de membrana tiende a ser mayor en las neuronas disociadas hipotiroideas para el estudio de la corriente T, produciéndose una recuperación hacia valores controles con el tratamiento con T3, sin embargo, en el estudio de las corrientes de potasio la resistencia no se encuentra alterada en las neuronas disociadas hipotiroideas. La capacidad de membrana tiende a disminuir en ambos grupos en ausencia de hormona tiroidea, siendo esta disminución estadísticamente significativa en las neuronas para el estudio de las corrientes de potasio. Por el contrario, la constante de tiempo de membrana no se altera significativamente en las neuronas disociadas hipotiroideas en ninguno de los estudios, así como tampoco se altera el potencial de membrana en reposo medido en las neuronas para el estudio de la corriente T.

Durante el desarrollo, las neuronas disociadas para el estudio de las corrientes de potasio presentan una disminución de la resistencia y de la constante de tiempo de membrana, sin cambiar la capacidad de membrana. Por otro lado, las neuronas disociadas para el estudio de la corriente T no presentan ningún cambio significativo debido al desarrollo.

## 2. Efectos del hipotiroidismo sobre la excitabilidad intrínseca

### 2.1. Modificaciones en el patrón de disparo de los potenciales de acción

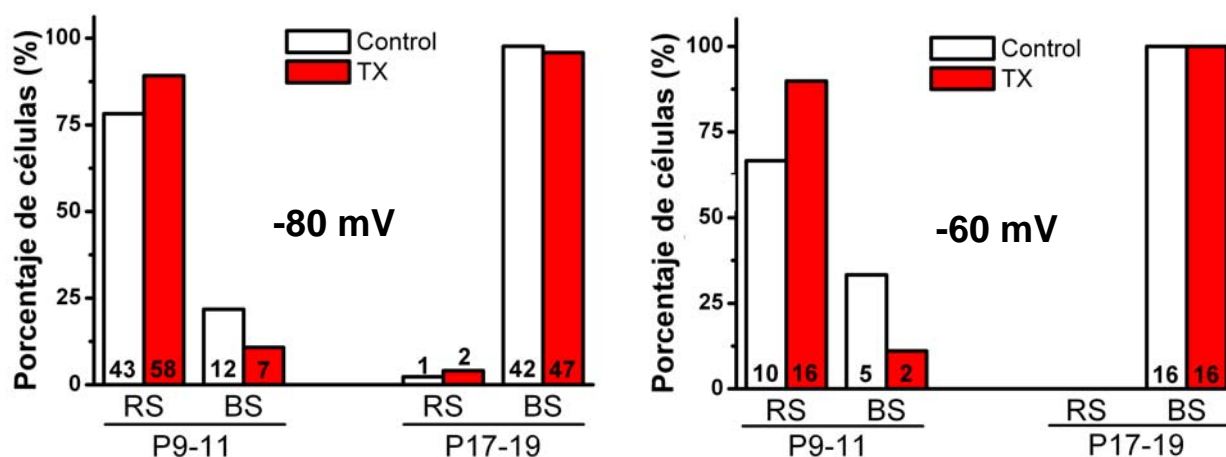
A continuación, dentro del estudio comparativo entre animales controles e hipotiroideos se estudiaron las modificaciones en el patrón de disparo de las neuronas piramidales del área CA1 durante el desarrollo postnatal. Las neuronas pueden responder ante una despolarización sostenida en el tiempo con diferentes patrones de disparo de potenciales de acción. En el caso de las neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo el patrón de disparo puede clasificarse en dos grupos que se expresan de forma diferente durante el desarrollo (Schwartzkroin, 1975). Un grupo que presenta un disparo regular (*regular-spiking*, RS), el cuál se caracteriza porque responde ante una despolarización sostenida con un tren de potenciales de acción separados de manera uniforme a lo largo de la despolarización (Figura 18A y 18C). Otro grupo que presenta un disparo en ráfagas o en *burst* (*burst-spiking*, BS), que se caracteriza por responder en forma de ráfagas de dos, tres o mas potenciales de acción, de forma irregular mientras dura la despolarización (Figura 18B y 18D).



**Figura 18.** Patrones de disparo en neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo de ratas controles. Registros realizados manteniendo a la célula en un potencial de membrana de -80 mV o de -60 mV, ejemplos de disparo regular o RS (A y C) y de disparo en ráfaga o BS (B y D).

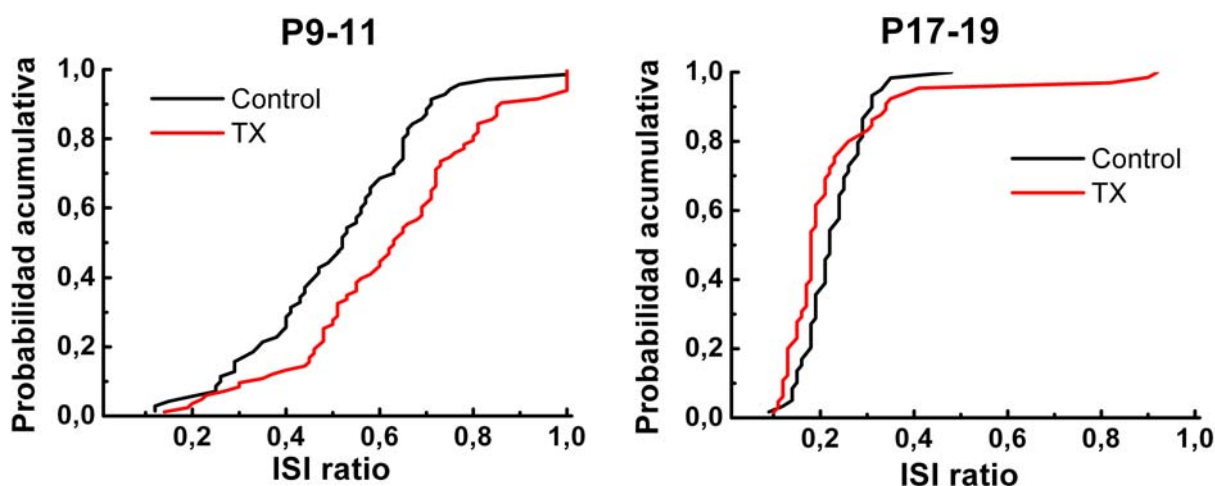
A fin de conocer las modificaciones provocadas por la deficiencia de hormona tiroidea sobre el patrón de disparo de las neuronas piramidales del área CA1 durante el desarrollo postnatal se realizaron una serie de experimentos mediante registros de *patch-clamp* en el modo de fijación de corriente en rodajas, manteniendo el potencial de membrana de la célula en torno a -80 mV o a -60 mV. Los trenes de potenciales de acción se provocaron mediante pulsos cuadrados despolarizantes de 300 ms de duración y entre 50-500 pA de intensidad. Para conocer los posibles cambios provocados por el hipotiroidismo durante el desarrollo el estudio se ha realizado en dos grupos de edad: grupo P9-11 (de 9 a 11 días de edad) y grupo P17-19 (de 17 a 19 días).

En los registros en los que se fijó el potencial de membrana de la célula en torno a -80 mV los animales hipotiroideos del grupo P9-11 muestran un mayor número de células RS (89,2% n=58) que los animales controles (78,2% n=43). Consecuentemente el número de células con un comportamiento de disparo en ráfaga es mayor en las neuronas controles (21,8% n=12) que en las hipotiroideas (10,8% n=7). Estas diferencias en el patrón de disparo prácticamente desaparecen en el grupo P17-19, en este estadio del desarrollo la mayoría de las neuronas controles e hipotiroideas disparan en ráfaga (control: 97,7% de células BS, n=42; TX: 95,9% de células BS, n=47) (Figura 19). Porcentajes similares de células BS y RS se observan cuando el potencial de membrana de la célula se mantiene a -60 mV (Figura 19).



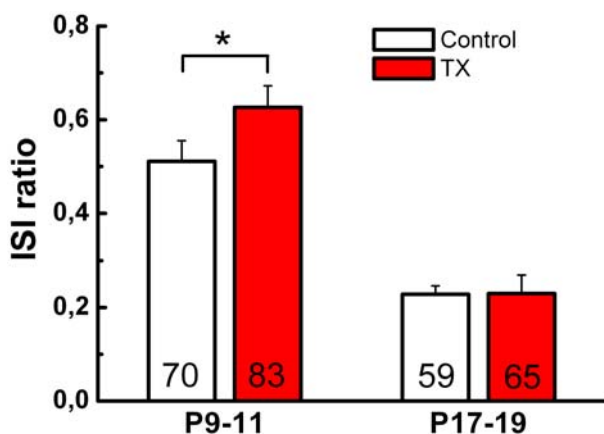
**Figura 19.** Efectos del hipotiroidismo sobre el patrón de disparo. Gráfica de barras que muestra el porcentaje de neuronas piramidales que disparan con un patrón regular (RS) o en ráfaga (BS), manteniendo a la célula en un voltaje de -80 mV (izquierda) o de -60 mV (derecha). El número de células de cada tipo aparece en cada barra.

A fin de clasificar con mayor rigor la distribución de los patrones de disparo se realizó un estudio sobre los intervalos de tiempo entre los potenciales de acción. Para cada célula se calculó el ratio del intervalo entre espigas (o ISI ratio, *shortest interspike interval ratio*), que se calcula dividiendo el intervalo entre espigas más corto entre el promedio del intervalo entre espigas (ver “Material y Métodos”). Esto permite determinar como células BS a las que tienen un ISI ratio inferior a 0,4 y como células RS aquellas cuyo ISI ratio tiene un valor superior. Una vez realizado el cálculo se representó a cada grupo en una gráfica de distribución de probabilidad acumulativa (Figura 20), comparando los animales controles frente a los hipotiroideos en los dos grupos de edad. En ambos casos la distribución acumulativa de ISI ratios es significativamente distinta entre controles e hipotiroideos (grupo P9-11  $p < 0,001$ ; grupo P17-19  $p < 0,001$ ; test de Kolmogorov-Smirnov).



**Figura 20.** Distribución de probabilidad acumulativa de los ISI ratios de los dos grupos de edad de neuronas controles e hipotiroideas representadas en las gráficas de barras de la Figura 19.

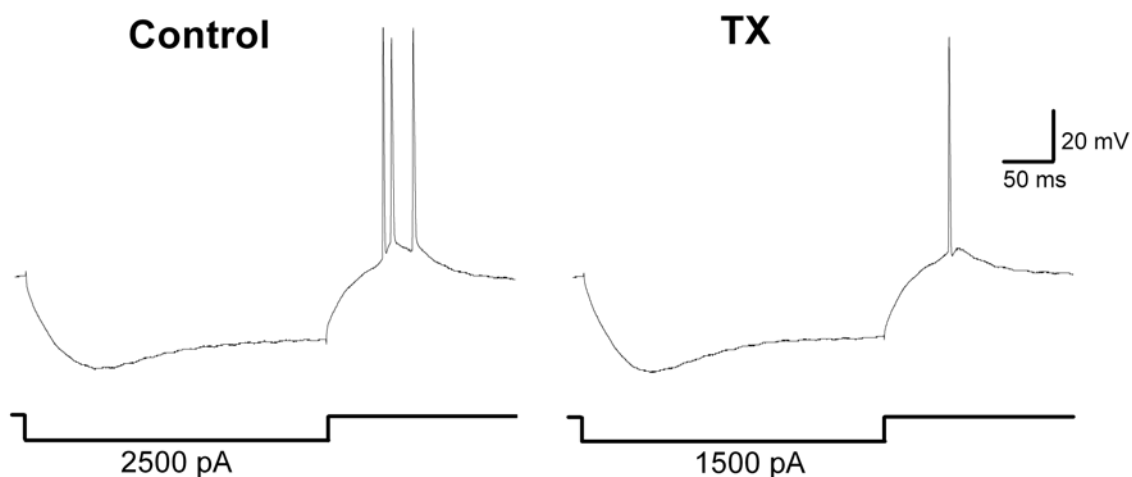
Cuando se analizan los ISI ratios de las neuronas durante el desarrollo postnatal (Figura 21), las neuronas hipotiroideas de 9 a 11 días de edad presentan un ISI ratio estadísticamente mayor que las controles (control:  $0,51 \pm 0,04$ ,  $n=70$  vs. TX:  $0,63 \pm 0,05$ ,  $n=83$ ;  $p < 0,001$ ). Este resultado está claramente relacionado con el menor número de células que disparan en ráfaga en los animales hipotiroideos a esta edad (Figura 19). Por otra parte, las neuronas hipotiroideas de 17 a 19 días de edad presentan el mismo ISI ratio que las controles (control:  $0,23 \pm 0,02$ ,  $n=59$  vs. TX:  $0,23 \pm 0,04$ ,  $n=65$ ), resultado estrechamente relacionado con que en este estadio del desarrollo la mayoría de las neuronas disparan en ráfaga, ya sean controles o hipotiroideas (Figura 19).



**Figura 21.-** Gráfica de barras de los valores promedio de los ISI ratio de los dos grupos de edad de neuronas controles e hipotiroideas. El número de neuronas aparece indicado en cada barra.

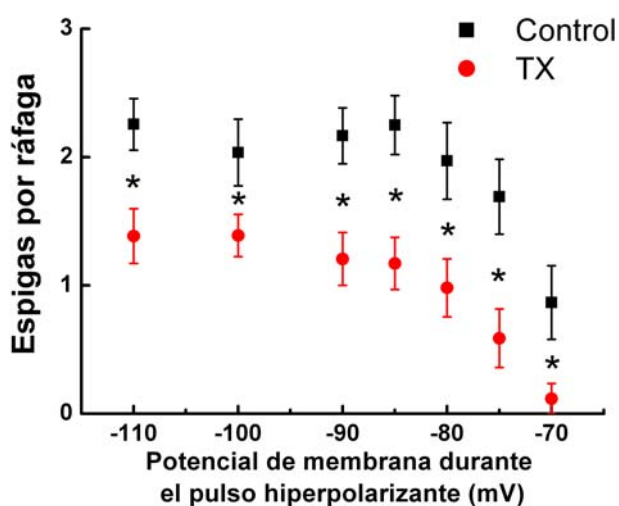
\*  $p < 0,05$ .

A pesar de las similitudes entre las neuronas hipotiroideas y controles del grupo de edad de 17 a 19 días en relación al porcentaje de células BS y al ISI ratio, si comparamos el ISI promedio, observamos que los potenciales de acción presentan un mayor intervalo entre espigas en las neuronas hipotiroideas que en las controles (control:  $47,59 \pm 1,59$  ms  $n=59$  vs. TX:  $54,81 \pm 1,93$  ms  $n=65$ ;  $p < 0,01$ ). Por lo tanto, el disparo entre neuronas controles e hipotiroideas no es igual, aunque ambos grupos disparen con un patrón en ráfaga. Por otra parte, en este estadio de desarrollo se han encontrado diferencias entre controles e hipotiroideas cuando se inducen ráfagas rebote (*rebound burst*) (Figura 22). Las ráfagas rebote se generaron mediante la aplicación de prepulsos hiperpolarizantes de 300 ms de duración a intensidades crecientes, a un potencial de membrana de -60 mV. Las neuronas hipotiroideas presentan una reducción significativa del número de potenciales de acción por ráfaga rebote respecto a las controles en todos los pulsos hiperpolarizantes realizados (Figura 23).



**Figura 22 .** Ejemplos representativos de registros de ráfagas rebote en una neurona control y otra hipotiroidea del grupo P17-19 en respuesta a un prepulso de corriente hiperpolarizante de 300 ms de duración. El número de potenciales de acción en el *rebound* tras el prepulso es mayor en la célula control a pesar de que la corriente inyectada ha generado voltajes hiperpolarizantes similares en ambas neuronas.

En resumen, teniendo en cuenta que las neuronas hipotiroideas del grupo de edad de 17 a 19 días presentan un ISI promedio mayor y que disparan menor número de potenciales de acción por ráfaga rebote, los resultados sugieren que existen diferencias en el disparo celular entre las neuronas controles e hipotiroideas a pesar de presentar un patrón de disparo similar.



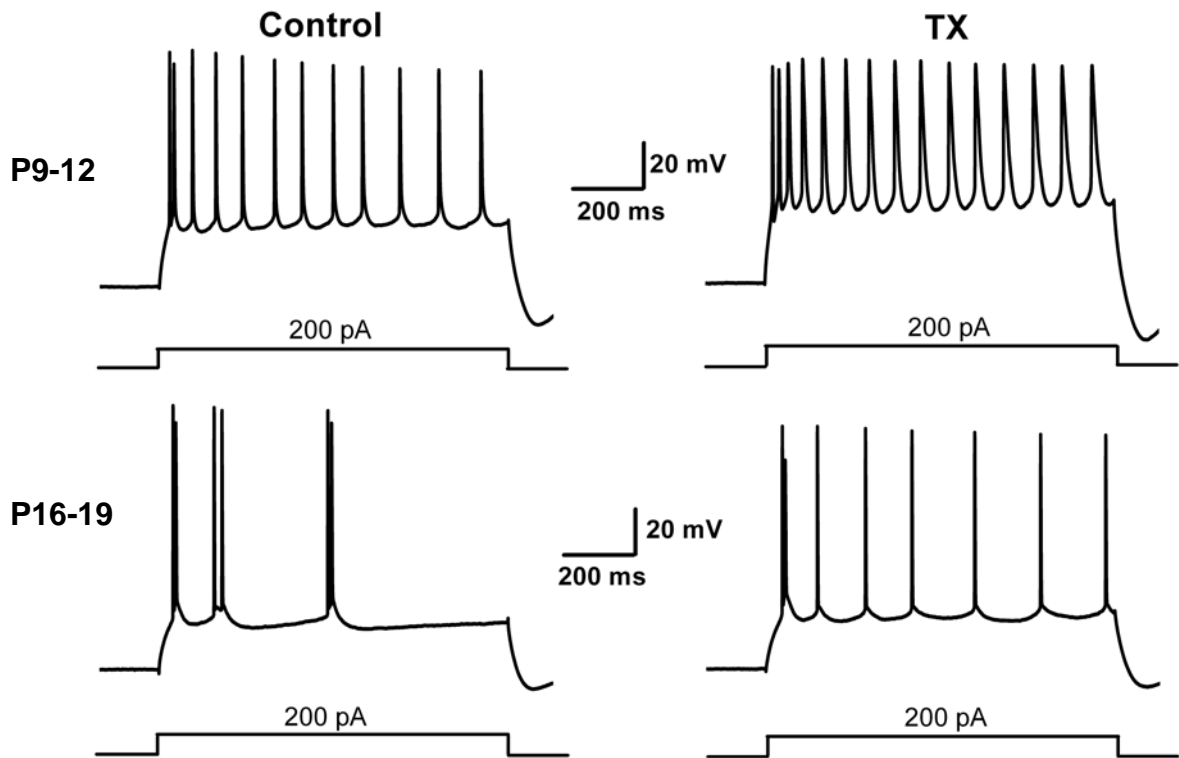
**Figura 23.** Gráfica de la relación entre el número de potenciales de acción generados en el *rebound* con respecto al voltaje de membrana que se alcanza al final del pulso hiperpolarizante, en el grupo de edad P17-19. Las neuronas hipotiroideas disparan significativamente menos PAs en todos los pulsos.

\*  $p < 0,05$ ,  $n = 18$  para ambos grupos.

## 2.2. Alteraciones en la frecuencia de descarga de los potenciales de acción

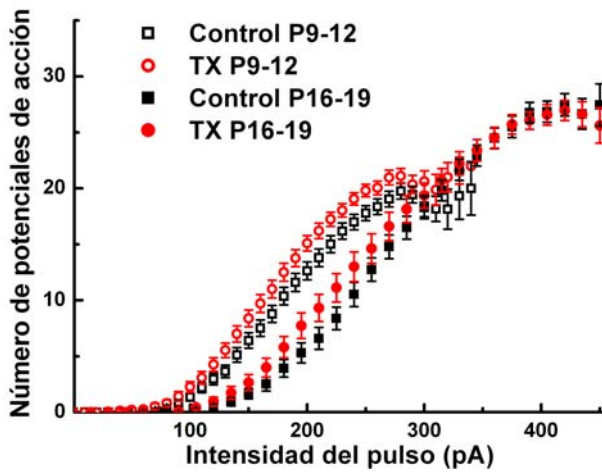
Las neuronas integran las aferencias sinápticas mediante su excitabilidad intrínseca y lo expresan mediante el disparo de potenciales de acción. Cambios en la excitabilidad intrínseca afectan a la relación entrada-salida de la neurona. A fin de analizar cómo la hormona tiroidea modula la excitabilidad se examinó la generación de potenciales de acción en controles e hipotiroideas durante el desarrollo (P9-12 y P16-19) mediante dos métodos.

En primer lugar se determinó la capacidad de generar potenciales de acción en respuesta a una misma inyección de corriente, a partir de un potencial de fijación de -80 mV. Para ello se aplicó una serie de pulsos de corriente (10-450 pA) de 1 s de duración (Figura 24) y se analizó la corriente necesaria para disparar PAs a distintas frecuencias mediante una curva de entrada-salida en la que se representa el número de potenciales de acción disparados con respecto a la intensidad de la corriente inyectada (Figura 25).



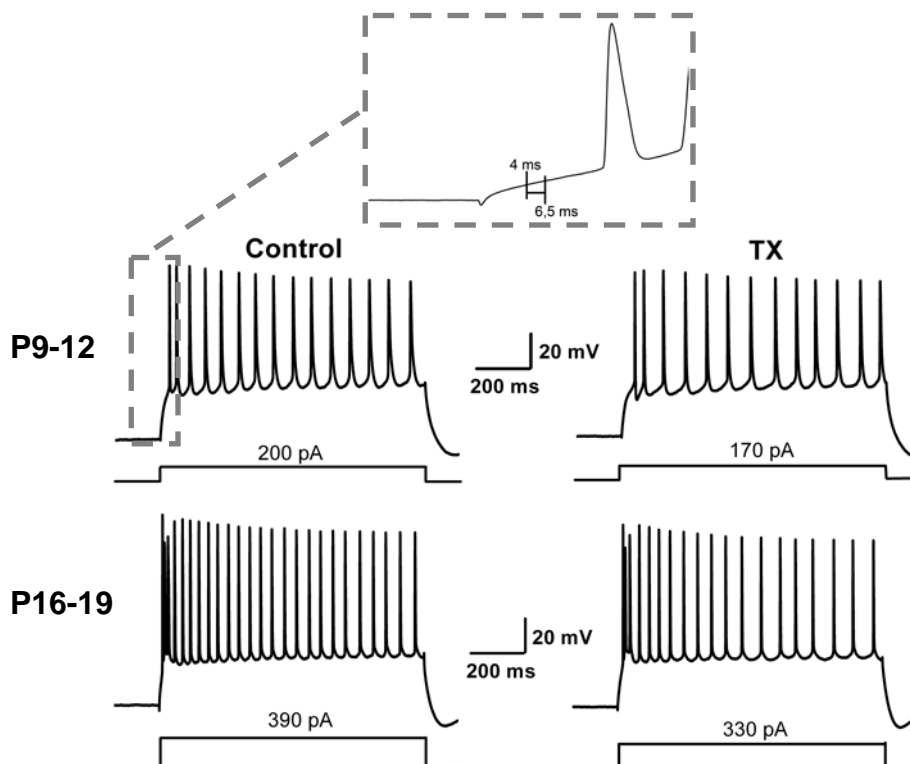
**Figura 24.** Ejemplos representativos de registros de potenciales de acción generados por pulsos despolarizantes de 1 s de duración y 200 pA de intensidad en neuronas controles e hipotiroideas de los dos grupos de edad. Se observa como el comportamiento es distinto dependiendo de la edad o la ausencia de hormona tiroidea.

Bajo estas condiciones se observa que los animales más jóvenes necesitan menos corriente para generar el mismo número de potenciales de acción, o lo que es lo mismo, los animales más jóvenes disparan más PAs para una misma intensidad de corriente (Figura 24 y 25). Por otra parte, si se analiza la gráfica desde el punto de vista de la ausencia de hormona tiroidea se observa que los animales hipotiroideos, para una misma intensidad de corriente, disparan más PAs que los controles. En resumen, la relación intensidad del pulso vs. número de PAs se desplaza a la izquierda en los animales jóvenes e hipotiroideos, estando estos resultados relacionados con las diferencias en las propiedades básicas de membrana (Tablas 4 y 7). En la sección 1.1. del apartado Resultados se demostró que las neuronas de los animales más inmaduros e hipotiroideos presentan resistencias de membrana estadísticamente mayores. Siguiendo la Ley de Ohm esto implica que frente a un mismo pulso de corriente, a mayor resistencia, mayor será la despolarización en la membrana y se generará un mayor número de potenciales de acción.



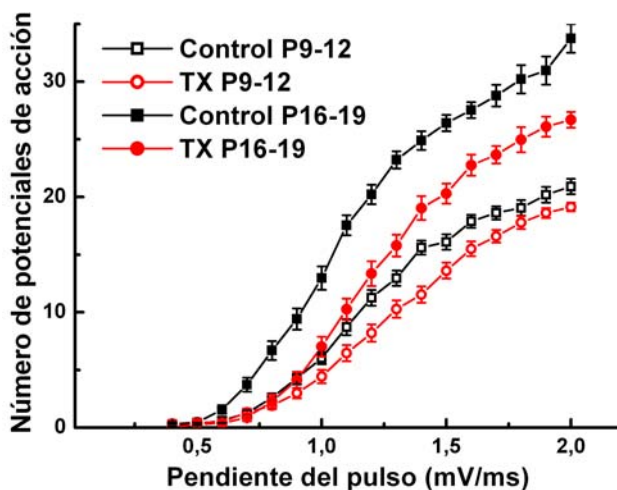
**Figure 25.** Gráfica de la relación entre el número de potenciales de acción generados por un pulso de corriente despolarizante de un segundo de duración con respecto a la intensidad del pulso. Comparando los resultados de los animales controles frente a los hipotiroideos se encuentran diferencias significativas en el grupo P9-12, entre 100 y 250 pA de intensidad ( $p < 0,05$ ).  $n = 28$  a 56 células.

En segundo lugar se determinaron las alteraciones en la frecuencia de disparo entre controles e hipotiroideas que no estuvieran relacionadas con las diferencias en las propiedades pasivas de la membrana, es decir, las alteraciones en la frecuencia de disparo provocadas por cambios en las propiedades activas. Con este fin se eliminó el factor resistencia de membrana, utilizando la pendiente de voltaje de membrana (cambio del potencial de membrana que se produce entre los 4 y 6,5 ms posteriores al inicio del pulso, ver Figura 26) necesaria para disparar PAs a distintas frecuencias en vez de la intensidad de corriente inyectada para generar el pulso. En una gráfica se representó una curva de entrada-salida que relaciona el número de PAs disparados frente a la pendiente de voltaje de membrana (Figura 27).



**Figura 26** Ejemplos representativos de registros de neuronas controles e hipotiroideas de ambos grupos de edad inducidos por pulsos despolarizantes de corriente de 1 s de duración a las intensidades indicadas en la gráfica que generan la misma pendiente de voltaje (1,5 mV/ms). En el recuadro superior se ha amplificado el registro a fin de mostrar la medición de la pendiente.

Bajo estas condiciones desaparece el desplazamiento a la izquierda de la relación entrada-salida que presentan las neuronas de los animales jóvenes e hipotiroideos en la Figura 25. Por el contrario, las células más maduras y controles necesitan menos pendiente para disparar el mismo número de potenciales de acción, o lo que es lo mismo, para una misma pendiente las células del grupo de P16-19 son más excitables que las más jóvenes, y las controles más que las hipotiroideas (Figura 27).



**Figura 27.** Gráfica de la relación entre el número de potenciales de acción generados por un pulso de corriente despolarizante de un segundo de duración con respecto a la pendiente del voltaje de membrana. Comparando los resultados de los animales controles frente a los hipotiroideos se encuentran diferencias significativas en el grupo P9-12 a partir de 1mV/ms ( $p < 0,05$ ) y en el P16-19 a partir de 0,7 mV/ms ( $p < 0,001$ ).  
n = 28 a 56 células.

Cabe destacar que las frecuencias de descarga máxima generadas por los animales más jóvenes fueron menores que las de los animales de más edad, tanto en el gráfico que representa el número de PAs disparados con respecto a la intensidad de la corriente inyectada (Figura 25), como en el que representa la relación entre el número de potenciales de acción disparados frente a la pendiente de voltaje (Figura 27).

En resumen, dentro de las alteraciones que provoca la ausencia de hormona tiroidea sobre la excitabilidad merece destacar que:

- El hipotiroidismo retrasa la aparición del patrón de disparo en ráfaga y disminuye el número de los potenciales de acción por ráfaga.
- La excitabilidad de las neuronas procedentes de animales hipotiroideos es menor que las controles considerando sus propiedades activas y mayor considerando sus propiedades pasivas.

### **3. Efectos del hipotiroidismo sobre la morfología del potencial de acción**

El estudio de los efectos del hipotiroidismo sobre la morfología del potencial de acción se planteó considerando que la unidad básica de información de las neuronas son los potenciales de acción y que la ausencia de hormona tiroidea modula la excitabilidad como se ha descrito en el apartado anterior.

#### **3.1. Efectos del hipotiroidismo y el desarrollo sobre los distintos parámetros del potencial de acción**

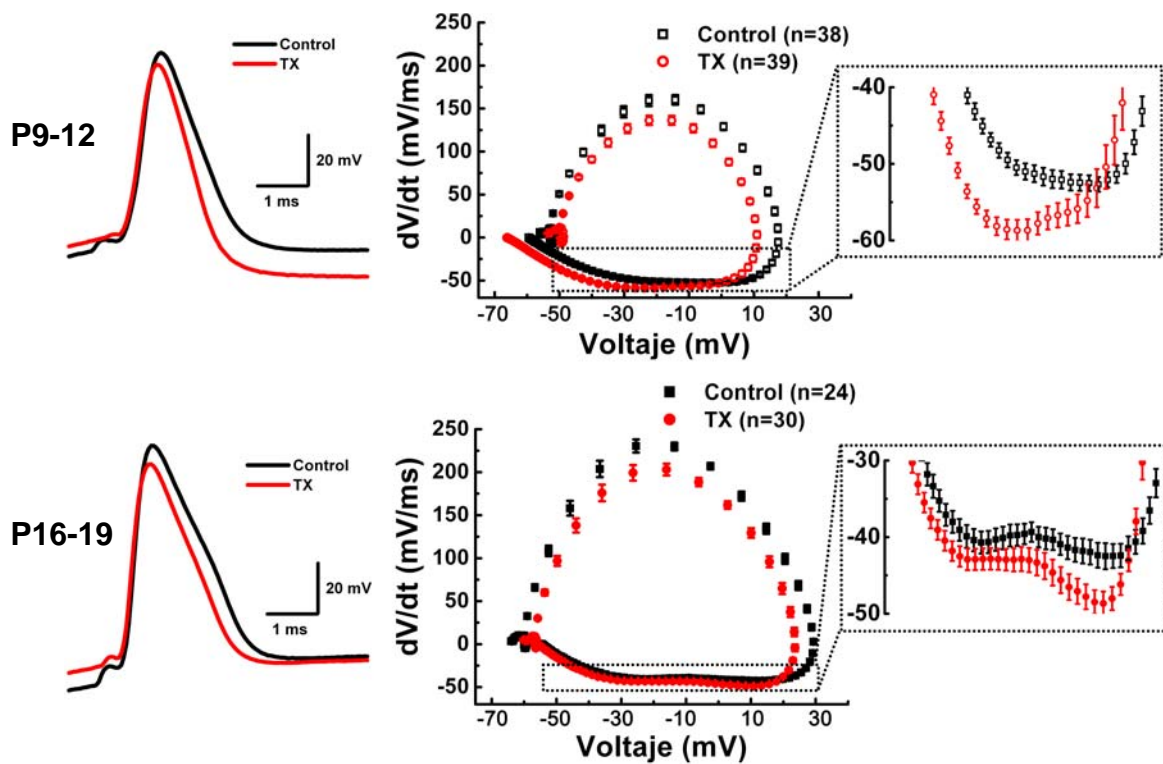
Para realizar este estudio se realizaron experimentos de *patch-clamp* en célula entera en fijación de corriente a un potencial de fijación de -80 mV en ratas controles e hipotiroideas durante el desarrollo (P9-12 y P16-19). A fin de analizar cómo la hormona tiroidea modula la excitabilidad se examinó la generación de PAs mediante dos protocolos:

En primer lugar se estudió la morfología del potencial de acción que se genera mediante un pulso de corriente despolarizante de 5 ms de duración y de alta intensidad que permite alcanzar el umbral de disparo a los pocos milisegundos del inicio del pulso. En estas condiciones, todos los parámetros analizados van cambiando a lo largo de las primeras semanas del desarrollo postnatal tanto en las neuronas controles como en las hipotiroideas (Tabla 15 y Figura 28). Resultados similares han sido descritos previamente por Spigelman *et al.* (1992). Cuando se comparan dichos parámetros entre el grupo control e hipotiroideo se observan cambios estadísticamente significativos en las dos edades. Así, los potenciales de acción de las neuronas de CA1 hipotiroideas presentan: un umbral más despolarizado, una amplitud máxima menor, una velocidad de despolarización más lenta, una menor duración a -20 mV y una velocidad de repolarización más rápida, tanto la máxima como la del primer tercio.

**Tabla 15.** Características del PA de las neuronas piramidales de CA1 generado mediante un pulso corto y de alta intensidad.

Edad	P9-12		P16-19	
Grupo	Control	TX	Control	TX
Amplitud máxima (mV)	98,6 ± 1,2	92,8 ± 1,1***	109,9 ± 1,1	104,9 ± 0,8***
Umbral de disparo (mV)	-55,9 ± 0,5	-53,2 ± 0,5***	-64,4 ± 0,7	-59,9 ± 0,6***
Velocidad despolarización max. (mV/ms)	169,5 ± 5,3	142,0 ± 5,4***	243,1 ± 4,3	217,8 ± 5,2***
Velocidad repolarización 1 <sup>er</sup> tercio (mV/ms)	-53,9 ± 0,9	-58,6 ± 1,2**	-44,4 ± 1,3	-50,3 ± 0,7**
Velocidad repolarización máx. (mV/ms)	-55,1 ± 1,0	-61,9 ± 1,2***	-46,5 ± 1,3	-50,8 ± 1,5*
Duración a -20 mV (ms)	1,25 ± 0,04	1,08 ± 0,02***	1,88 ± 0,06	1,53 ± 0,04***
Número de células	38	39	24	30

Efectos del hipotiroidismo sobre la morfología del PA generado mediante un pulso de 5 ms de duración y de alta intensidad, a un potencial de fijación de -80 mV (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001).



**Figura 28.** Efectos del hipotiroidismo sobre la morfología del PA. A la izquierda ejemplos representativos de potenciales de acción generados con un pulso despolarizante de 5 ms de duración y de alta intensidad, a un potencial de fijación de -80 mV, procedentes de neuronas controles e hipotiroideas de los dos grupos de edad. A la derecha se representa la gráfica de la relación entre la velocidad de cambio de voltaje durante el progreso del PA (primera derivada del PA, mV/ms) con respecto al potencial de membrana que presenta el PA en dicho instante. En el recuadro se ha amplificado la fase de repolarización de la gráfica para observar mejor las diferencias. El número de neuronas promediadas se indica en la leyenda entre paréntesis.

En segundo lugar se estudió la morfología del potencial de acción que se genera mediante un pulso de corriente despolarizante de 1s de duración y de baja intensidad que permite alcanzar el umbral de disparo a decenas de milisegundos desde del inicio del pulso. Bajo estas condiciones desaparecen las diferencias estadísticas (Tabla 15) entre el grupo control e hipotiroideo con respecto a las velocidades de repolarización en ambos grupos de edades y con respecto a la duración de los PAs para los animales más jóvenes (Tabla 16). Para profundizar en las implicaciones de este resultado se compararon los parámetros del potencial de acción generado por el pulso de 1 s de baja intensidad frente al generado por el pulso de 5 ms de alta intensidad. Así, los PAs inducidos por el pulso largo de menor intensidad presentan: una mayor amplitud, un umbral más despolarizado, una mayor duración y menores velocidades de repolarización (Figura 29). Todos estos resultados se observaron en los animales controles e hipotiroideas de los dos grupos de edad, aunque estas diferencias fueron más relevantes en los más jóvenes y en los hipotiroideos.

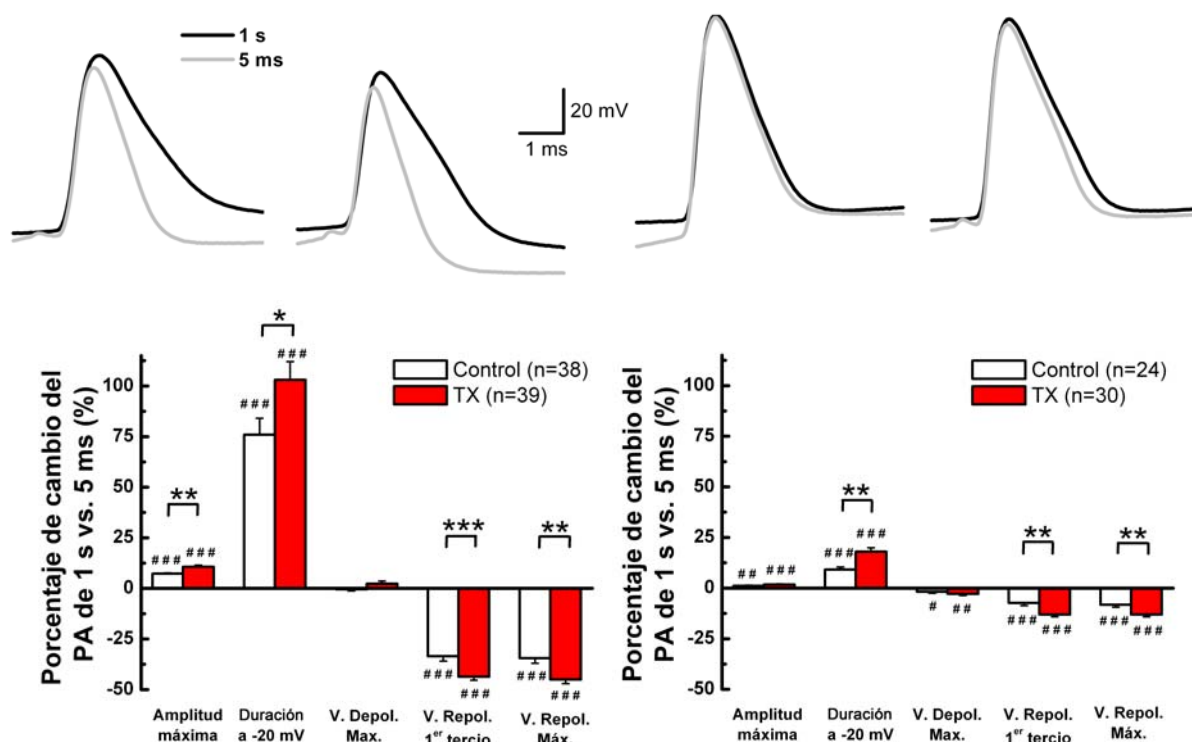
**Tabla 16.** Características del PA de las neuronas piramidales de CA1 generado mediante un pulso largo y de baja intensidad.

Edad	P9-12		P16-19	
Grupo	Control	TX	Control	TX
Amplitud máxima (mV)	105,5 ± 0,9	102,5 ± 0,7**	111,0 ± 0,9	106,7 ± 0,8***
Umbral de disparo (mV)	-54,8 ± 0,4	-52,0 ± 0,4***	-61,8 ± 0,5	-58,2 ± 0,6***
Velocidad despolarización max. (mV/ms)	168,5 ± 5,4	143,5 ± 5,0***	239,0 ± 3,6	211,9 ± 5,7***
Velocidad repolarización 1 <sup>er</sup> tercio (mV/ms)	-35,4 ± 1,1	-33,0 ± 1,1	-40,9 ± 1,2	-43,5 ± 1,1
Velocidad repolarización max. (mV/ms)	-35,5 ± 1,0	-33,7 ± 1,1	-42,4 ± 1,2	-44,0 ± 1,0
Duración a -20 mV (ms)	2,13 ± 0,02	2,17 ± 0,09	2,06 ± 0,07	1,79 ± 0,04***
Número de células	38	39	24	30

Efectos del hipotiroidismo en la morfología del potencial de acción generado mediante un pulso de 1 s de duración y de baja intensidad, a un potencial de fijación de -80 mV (\*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001).

Las diferencias observadas entre los PAs inducidos por los dos protocolos sugieren que existen corrientes transitorias de potasio activas a potencial de membrana subumbral que son funcionalmente más relevantes en la repolarización del PA en los animales más jóvenes e hipotiroideos. De modo que la parcial inactivación de estas corrientes durante el pulso largo provocaría la desaparición de las diferencias en la velocidad repolarización entre hipotiroideas y controles. Teniendo en cuenta que las corrientes subumbrales de potasio son la corriente A y D, siendo solo la corriente A transitoria; y que dicha corriente es más prominente en las neuronas inmaduras del hipocampo con respecto a las otras corrientes de potasio

(Spigelman et al., 1992; Klee et al., 1995), todo parece indicar que probablemente la inactivación de la corriente A es la causante de los cambios morfológicos observados en el PA generado por un pulso largo de baja intensidad cuando lo comparamos con el PA generado por un pulso corto de alta intensidad.



**Figura 29.** Cambios en los parámetros del potencial de acción cuando se compara un PA generado por un pulso de baja intensidad de 1 s con el generado por un pulso de alta intensidad de 5 ms, procedentes de neuronas controles e hipotiroideos de los dos grupos de edad. Arriba: ejemplos representativos de potenciales de acción generados por los dos protocolos: pulsos cortos de alta intensidad (gris) o largos de baja intensidad (negro). Abajo: gráfica de barras resumen de los cambios entre los animales controles y los hipotiroideos. Cuatro de los parámetros medidos presentan cambios significativos, siendo de mayor magnitud en las ratas más jóvenes. El número de neuronas promediadas se indica en la leyenda entre paréntesis.

TX vs. Control: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Pulso de 1 s vs. Pulso de 5 ms: #  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,01$ ; ###  $p < 0,001$ .

Todos los parámetros estudiados, tanto en células de animales controles como de hipotiroideos, van cambiando a lo largo de las primeras semanas postnatales. Por un lado, el potencial de acción sufre una serie de cambios con la edad, independientemente de como sea generado (pulso corto de alta intensidad o largo de baja intensidad), consistentes en un aumento de la amplitud máxima, un aumento de la velocidad de despolarización máxima y una hiperpolarización del umbral de disparo (Tablas 17 y 18). Por otro lado, cuando el PA

es generado por el pulso largo la velocidad de repolarización máxima aumenta con la edad y disminuye su duración a -20 mV. Sin embargo, si es generado por un pulso corto ocurre lo contrario, la repolarización máxima disminuye con la edad y la duración a -20mV aumenta (Tablas 17 y 18).

**Tabla 17.** Características del PA de las neuronas piramidales de CA1 generado mediante un pulso corto y de alta intensidad durante el desarrollo.

Grupo	Control		TX	
Edad	P9-12	P16-19	P9-12	P16-19
Amplitud máxima (mV)	98,6 ± 1,2	109,9 ± 1,1***	92,8 ± 1,1	104,9 ± 0,8***
Umbral de disparo (mV)	-55,9 ± 0,5	-64,4 ± 0,7***	-53,2 ± 0,5	-59,9 ± 0,6***
Velocidad despolarización max. (mV/ms)	169,5 ± 5,3	243,1 ± 4,3***	142,0 ± 5,4	217,8 ± 5,2***
Velocidad repolarización 1 <sup>er</sup> tercio (mV/ms)	-53,9 ± 0,9	-44,4 ± 1,3***	-58,6 ± 1,2	-50,3 ± 0,7***
Velocidad repolarización max. (mV/ms)	-55,1 ± 1,0	-46,5 ± 1,3***	-61,9 ± 1,2	-50,8 ± 1,5***
Duración a -20 mV (ms)	1,25 ± 0,04	1,88 ± 0,06***	1,08 ± 0,02	1,53 ± 0,04***
Número de células	38	24	39	30

Efectos del desarrollo en la morfología del potencial de acción generado mediante un pulso de 5 ms de duración y de alta intensidad, a un potencial de fijación de -80 mV (\*\*\*) p < 0,001).

**Tabla 18.** Características del PA de las neuronas piramidales de CA1 generado mediante un pulso largo y de baja intensidad durante el desarrollo.

Grupo	Control		TX	
Edad	9-12	16-19	9-12	16-19
Amplitud máxima (mV)	105,5 ± 0,9	111,0 ± 0,9***	102,5 ± 0,7	106,7 ± 0,8***
Umbral de disparo (mV)	-54,8 ± 0,4	-61,8 ± 0,5***	-52,0 ± 0,4	-58,2 ± 0,6***
Velocidad despolarización max. (mV/ms)	168,5 ± 5,4	239,0 ± 3,6***	143,5 ± 5,0	211,9 ± 5,7***
Velocidad repolarización 1 <sup>er</sup> tercio (mV/ms)	-35,4 ± 1,1	-40,9 ± 1,2**	-33,0 ± 1,1	-43,5 ± 1,1***
Velocidad repolarización max. (mV/ms)	-35,5 ± 1,0	-42,4 ± 1,2***	-33,7 ± 1,1	-44,0 ± 1***
Duración a -20 mV (ms)	2,13 ± 0,02	2,06 ± 0,07***	2,17 ± 0,09	1,79 ± 0,04**
Número de células	38	24	39	30

Efectos del desarrollo en la morfología del potencial de acción generado mediante un pulso de 1 s de duración y de baja intensidad, a un potencial de fijación de -80 mV (\*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001).

### 3.2. Efectos del hipotiroidismo sobre el PA en su relación con el tipo de disparo

Cambios en algunos parámetros del potencial de acción, como el umbral de disparo, la duración y las velocidades de repolarización se han asociado a modificaciones en el patrón de disparo (Akemann y Knöpfel, 2006). Por ello, es interesante analizar si los cambios en la morfología del potencial de acción producidos por la ausencia de hormona tiroidea explican las diferencias observadas en el patrón de disparo entre animales controles e hipotiroideos (Figura 19). Para realizar este estudio se analizó el primer potencial de acción inducido por pulsos despolarizantes de 300 ms de duración (utilizados durante la clasificación del patrón de disparo en el apartado 2.1), mediante experimentos de *patch-clamp* en célula entera en fijación de corriente a dos potenciales de fijación, -80 y -60 mV, en ratas controles e hipotiroideas durante el desarrollo (P9-11 y P17-19). Cuando se realizaron estos experimentos a potencial de fijación de -80 mV, se obtienen diferencias similares en los parámetros del potencial de acción entre las ratas controles e hipotiroideas a las descritas previamente en la Tabla 16 (Tabla 19). Sin embargo, cuando se realizaron los mismos experimentos a potencial de fijación de -60 mV las diferencias en los parámetros del potencial de acción entre controles e hipotiroideas desaparecen (Tabla 20). Por tanto, si consideramos que las diferencias en los parámetros del potencial de acción entre controles e hipotiroideas sólo se producen cuando el potencial de membrana es de -80 mV y que las neuronas controles presentan mayor porcentaje de células que disparan en ráfagas tanto a potenciales de fijación de -60 mV como de -80 mV (Figura 19), no parece que las diferencias en los parámetros del potencial de acción causados por la ausencia de la hormona tiroidea sea el factor fundamental de los cambios en el patrón de disparo.

**Tabla 19.** Características del primer PA de las neuronas piramidales de CA1 generado mediante un pulso de 300 ms de duración a un voltaje de -80 mV.

Edad	9-11		17-19	
Grupo	Control	TX	Control	TX
Amplitud máxima (mV)	98,6 ± 0,9	96,3 ± 0,7*	110,8 ± 0,7	108,9 ± 0,6*
Umbral de disparo (mV)	-50,6 ± 0,4	-49,3 ± 0,6*	-58,0 ± 0,6	-56,5 ± 0,4*
Velocidad despolarización max. (mV/ms)	106,1 ± 3,8	102,1 ± 3,6	193,7 ± 3,7	192,7 ± 3,3
Velocidad repolarización max. (mV/ms)	-29,9 ± 1,0	-31,5 ± 1,1	-40,8 ± 0,8	-45,1 ± 1,0**
Duración media (ms)	2,95 ± 0,10	2,84 ± 0,10	2,22 ± 0,04	2,00 ± 0,04***
Número de células	47	47	34	41

Efectos del hipotiroidismo en la morfología del potencial de acción generado mediante un pulso de 300 ms de duración a un potencial de fijación de -80 mV (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001).

**Tabla 20.** Características del primer PA de las neuronas piramidales de CA1 generado mediante un pulso de 300 ms de duración a un voltaje de -60 mV.

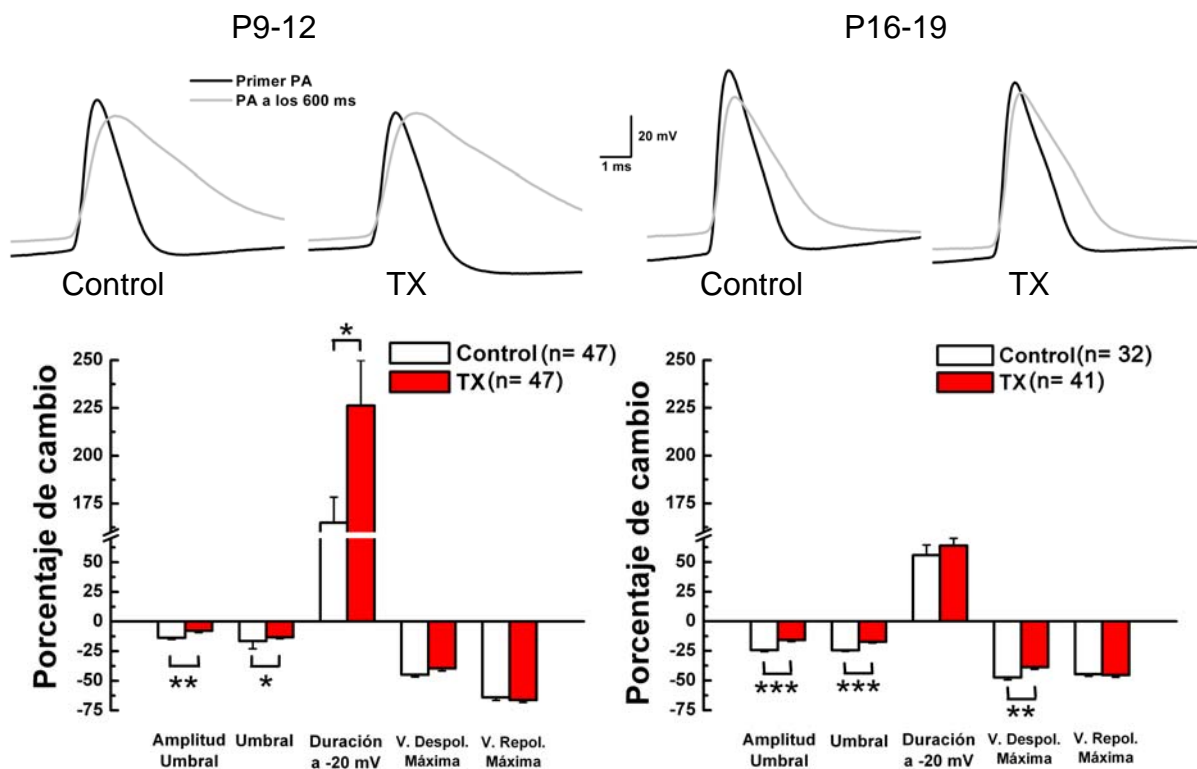
Edad	9-11		17-19	
Grupo	Control	TX	Control	TX
Amplitud máxima (mV)	88,57 ± 1,4	85,4 ± 2,4	95,26 ± 2,0	92,8 ± 2,6
Umbral de disparo (mV)	-46,4 ± 0,8	-47,4 ± 0,6	-54,9 ± 0,8	-53,3 ± 0,6
Velocidad despolarización max. (mV/ms)	128,15 ± 8,3	124,07 ± 0,1	197,75 ± 9,0	192,6 ± 6,8
Velocidad repolarización max. (mV/ms)	-36,84 ± 2,73	-34,2 ± 3,63	-54,51 ± 1,74	-51,21 ± 1,7
Duración media (ms)	2,09 ± 0,12	2,11 ± 0,13	1,58 ± 0,05	1,57 ± 0,05
Número de células	10	12	18	15

Efectos del hipotiroidismo en la morfología del potencial de acción generado mediante un pulso de 300 ms de duración a un potencial de fijación de -60 mV.

### 3.3. Efectos del hipotiroidismo y el desarrollo sobre el ensanchamiento del potencial de acción o *broadening* durante el disparo repetitivo

La morfología del potencial de acción cambia durante el disparo repetitivo. El mayor cambio se produce sobre la duración del potencial de acción el cual se incrementa progresivamente dependiendo de la frecuencia. (Aldrich et al., 1979; Ma y Koester, 1996; Shao et al., 1999). Este ensanchamiento del potencial de acción es un fenómeno que presentan la mayoría de las neuronas y en el que es esencial la inactivación de la corriente A de potasio a lo largo del pulso (Aldrich, 1981). Con el fin de estudiar si la ausencia de hormona tiroidea altera el ensanchamiento del potencial de acción durante un disparo repetitivo, se realizaron experimentos de *patch-clamp* en célula entera en fijación de corriente a un potencial de fijación de -80 mV en ratas controles e hipotiroideas durante el desarrollo (P9-12 y P16-19). Para eliminar las diferencias en la resistencia de membrana, los potenciales de acción se indujeron mediante una corriente despolarizante de 1 s de duración que genera una pendiente de voltaje de 1,5 mV/ms, medida entre los 4 y 6,5 ms posteriores al inicio del pulso. Durante el disparo repetitivo todos los parámetros del PA analizados en ratas controles e hipotiroideas durante el desarrollo se modifican cuando se comparan los parámetros del primer potencial de acción inducido por el pulso despolarizante frente a los del potencial de acción obtenido a los  $600 \pm 25$  ms del inicio del pulso (Figura 30). La amplitud máxima medida desde el umbral de disparo disminuye, el umbral de disparo se despolariza, la duración a -20 mV aumenta, y las velocidades

máximas de despolarización y repolarización disminuyen, siendo todos estos cambios estadísticamente significativos ( $p < 0,001$ ) en todos los grupos.



**Figura 30.** Cambios en los parámetros del potencial de acción cuando se compara el primer PA inducido por un pulso despolarizante frente al obtenido a los  $600 \pm 25$  ms del inicio del pulso. Arriba: ejemplos representativos del primer PA (negro) frente al generado a los  $600 \pm 25$  ms del inicio del pulso (gris) de registros de neuronas controles e hipotiroideas de ambos grupos de edad inducidos por pulsos despolarizantes de corriente de 1 s que generan la misma pendiente de voltaje ( $1,5$  mV/ms). Abajo: gráfica de barras resumen de los cambios entre los animales controles e hipotiroideos. La mayor diferencia se encuentra en la duración a  $-20$  mV del PA, siendo mucho mayor en el grupo de menor edad. El número de neuronas promediadas se indica en la leyenda entre paréntesis.

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Cuando se analizó si la ausencia de hormona tiroidea altera el ensanchamiento del potencial se observan diferencias estadísticas sólo en el grupo P9-12. Así, a los  $600$  ms del inicio del pulso la duración del PA a  $-20$  mV aumenta en un  $164,94 \pm 13,44$  % frente al primer PA en los animales controles y en un  $226,22 \pm 23,67$  en los hipotiroideos ( $p < 0,05$ ). Sin embargo en el grupo P16-19 las diferencias no son estadísticamente significativas entre los animales controles y los hipotiroideos (control:  $55,86 \pm 8,53\%$  vs. TX:  $63,89 \pm 6,23$ ).

Los resultados más dramáticos obtenidos en el grupo P9-12 están estrechamente relacionados con la mayor inactivación acumulativa de la corriente A que se observa en este grupo y con el hecho de que esta corriente de potasio presenta mayor relevancia en las células inmaduras respecto a las otras corrientes de potasio, que ganan importancia durante el desarrollo, enmascarando el papel de la corriente A. En relación a esta corriente A, al comparar el PA tras 600 ms del inicio del pulso respecto al primer PA, en el grupo control la velocidad máxima de repolarización también se ve más afectada en el grupo P9-12, disminuyendo un  $64,1 \pm 2,5$  % (n=47), que en el grupo P16-19, que disminuye un  $44,6 \pm 1,8$  % (n=32), siendo esta disminución estadísticamente mayor en el P9-12 que en el P16-19 ( $p < 0,001$ ). Se encuentran diferencias similares en el grupo hipotiroideo (P9-12:  $66,2 \pm 2,1$ %, n=47, vs. P16-19:  $45,4 \pm 1,8$ %, n=42;  $p < 0,001$ ).

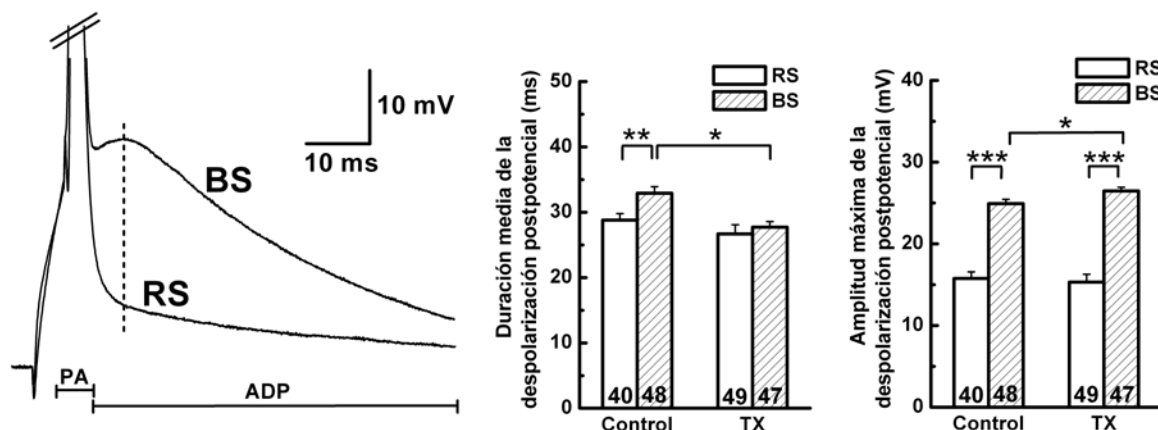
En resumen, la morfología del potencial de acción se encuentra alterada en ausencia de hormona tiroidea durante el desarrollo (Tabla 15), los potenciales de acción presentan menor amplitud, un umbral de disparo más despolarizado y velocidades de despolarización más lentas. Las velocidades de repolarización por otra parte, o bien son más rápidas en las neuronas hipotiroideas (Tabla 15), o bien cuando se inactiva la corriente A debido a un pulso largo despolarizante son iguales a los controles (Tabla 16). Lo que implica un papel fundamental de esta corriente en las alteraciones descritas con el hipotiroidismo. Además, es probable que esta corriente de potasio se encuentre alterada en el hipotiroidismo puesto que la duración del potencial de acción aumenta durante los procesos de *broadening* cuando se compara con los valores de duración de los animales controles.

## 4. Efectos del hipotiroidismo sobre la despolarización postpotencial o ADP

Bajo condiciones fisiológicas en las neuronas piramidales de CA1, la fase de repolarización de un potencial de acción no recupera el potencial de membrana que tenía la célula justo antes del disparo. Normalmente la repolarización es seguida por una despolarización postpotencial o ADP (*spike afterdepolarization*) (Schwartzkroin, 1975; Jensen et al., 1996). Diversos autores han mostrado que el tamaño de la despolarización postpotencial está correlacionado con la tendencia de las neuronas a disparar potenciales de acción en ráfagas o en *burst* (Jensen et al., 1996; Metz et al., 2005). A fin de conocer si la ausencia de hormona tiroidea altera la morfología del ADP se realizaron experimentos de *patch-clamp* en célula entera en fijación de corriente a un potencial de fijación de -80 mV en ratas controles e hipotiroideas durante el desarrollo (P9-11 y P17-19). Para realizar este estudio se emplearon pulsos despolarizantes de 5 ms de duración que generan un potencial de acción y su posterior despolarización postpotencial.

### 4.1. Diferencias en el ADP entre células que disparan con un patrón en ráfaga (BS) o regular (RS)

Cuando se analizó el ADP registrado en las neuronas controles se observó que la duración media y la amplitud máxima eran significativamente mayores en las neuronas que disparan con un patrón en ráfaga (BS) que en las neuronas que disparan con un patrón regular (RS) (duración media: RS:  $28,79 \pm 1,02$  ms, n=40 vs. BS:  $32,92 \pm 1,00$  ms, n=48,  $p < 0,01$ ; amplitud máxima: RS:  $15,76 \pm 0,81$  mV, n=40 vs. BS:  $24,92 \pm 0,54$  mV, n=48,  $p < 0,001$ ) (Figura 31). Se obtienen resultados similares en el caso de las neuronas hipotiroideas con respecto a la amplitud máxima del ADP, las células hipotiroideas que disparan en ráfaga tienen una mayor amplitud máxima que las de disparo regular (RS:  $15,31 \pm 0,97$  mV, n=49 vs. BS:  $26,47 \pm 0,45$  mV, n=47,  $p < 0,001$ ). No ocurre lo mismo con la duración media, en las células hipotiroideas la duración media del ADP no varía entre las células BS y RS (RS:  $26,68 \pm 1,41$  ms, n=49 vs. BS:  $27,73 \pm 0,85$  ms, n=47) (Figura 31).

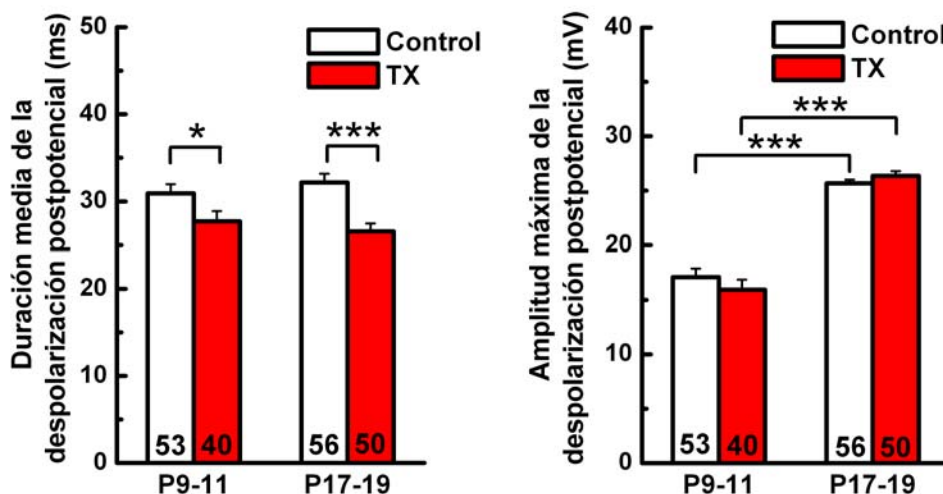


**Figura 31.** Cambios en la despolarización postpotencial entre neuronas con patrón de disparo regular o en ráfagas de ratas controles e hipotiroideas de 9 a 19 días de edad. A la izquierda se presentan dos ejemplos representativos de potenciales de acción truncados y sus correspondientes ADPs, procedentes de una neurona con patrón de disparo RS y de otra con patrón BS. A la derecha se presentan dos gráficas de los valores promedios de la duración media y la amplitud de la despolarización postpotencial de neuronas con patrones de disparo RS o BS procedentes de ratas controles e hipotiroideas. El número de neuronas de cada tipo aparece indicado en cada barra. (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

## 4.2. Efectos del hipotiroidismo y el desarrollo sobre los distintos parámetros de la despolarización postpotencial

Estudios previos de otros autores han mostrado que el tamaño del ADP aumenta entre P7 y P17 en las células piramidales de CA1 (Chen et al., 2005). Por lo tanto, se analizó si el aumento de la proporción de células que disparan en ráfaga a lo largo del desarrollo está relacionado con un incremento del tamaño de la despolarización postpotencial. Se ha encontrado que la amplitud máxima del ADP aumenta significativamente con el desarrollo en las neuronas controles (P9-11:  $17,1 \pm 0,78$  mV,  $n=53$  vs. P17-19:  $25,68 \pm 0,33$  mV,  $n=40$ ,  $p < 0,001$ ), mientras que la duración media del ADP no muestra un cambio significativo entre estas dos edades (P9-11:  $30,9 \pm 1,07$  ms,  $n=53$  vs. P17-19:  $32,17 \pm 0,99$  ms,  $n=40$ ) (Figura 32). Cuando estudiamos estos mismos parámetros desde P9-11 a P17-19 en los animales hipotiroideos encontramos cambios muy similares, la amplitud máxima aumenta con la edad, de  $15,95 \pm 0,91$  mV en P9-11 a  $26,36 \pm 0,42$  mV en P17-19 ( $p < 0,001$ ), y la duración media no cambia (P9-11:  $27,73 \pm 1,17$  ms,  $n=56$  vs. P17-19:  $26,55 \pm 0,91$  ms,  $n=50$ ) (Figura 32). Todos estos datos indican que existe

una fuerte correlación entre la aparición del patrón de disparo en ráfaga (Figura 19) y la amplitud máxima de la despolarización postpotencial durante el desarrollo (Figura 32).



**Figura 32.** Cambios en la despolarización postpotencial durante el desarrollo en neuronas controles e hipotiroideas. Gráficas de los valores promedios de la duración media y la amplitud máxima de la despolarización postpotencial procedentes de ratas controles e hipotiroideas de los dos grupos de edad. El número de células analizadas aparece indicado en cada barra (\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Como se ve en el apartado 2.1 de los Resultados, los animales controles del grupo P9-11 presentan mayor proporción de células BS que los animales hipotiroideos (Figura 19) y una semana después (P17-19) las neuronas controles presentan mayor número de PAs por ráfaga que los hipotiroideos (Figura 23), a pesar de que la proporción de neuronas BS sea muy similar en ambos grupos. Para comprobar si estas diferencias en el disparo en ráfaga se correlaciona con incrementos en el ADP, se compararon los resultados de todas las neuronas BS de animales controles e hipotiroideas de 9 a 19 días. Se observa cómo las neuronas BS hipotiroideas presentan una duración del ADP significativamente menor que las controles (control:  $32,92 \pm 1,00$  ms,  $n=48$ , vs. TX:  $27,73 \pm 0,85$  ms,  $n=49$ ,  $p < 0,001$ ). Por el contrario la amplitud máxima de las neuronas BS hipotiroideas es algo mayor que la amplitud de las controles (control:  $24,92 \pm 0,54$  mV,  $n=48$ , vs. TX:  $26,47 \pm 0,45$  mV,  $n=49$ ,  $p < 0,05$ ) (Figura 31).

Cuando se estudian las células en grupos de edad, independientemente de su patrón de disparo, se observa que la amplitud máxima del ADP aumenta significativamente durante el desarrollo, tanto en controles como en hipotiroideas, sin encontrar diferencias estadísticamente significativas en la amplitud debidas al hipotiroidismo (Figura 32). Por

otro lado, la duración media del ADP no cambia durante el desarrollo, ni en animales controles ni en hipotiroideos, aunque es mayor en el grupo control que en el hipotiroideo para ambas edades (Figura 32). Estos resultados se relacionan con las Figuras 19 y 23, deduciéndose que:

- Los animales hipotiroideos y controles de 17 a 19 días son capaces de inducir disparos en ráfaga, puesto que ambos grupos presentan una amplitud máxima del ADP similar y suficiente para alcanzar el umbral del disparo.
- Los animales hipotiroideos disparan menor número de potenciales de acción por ráfaga rebote que los controles, lo cual podría ser debido a la menor duración del ADP.

#### **4.3. Estudio de las corrientes implicadas en la formación de l ADP en animales controles e hipotiroideos**

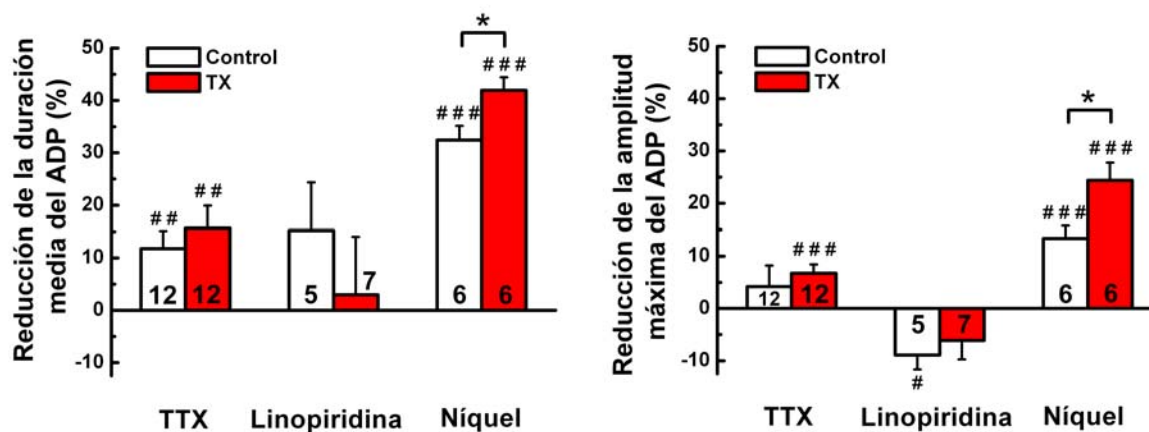
Se han propuesto diferentes corrientes que intervienen en la generación y forma de la despolarización postpotencial y que provocan el disparo en ráfaga durante el desarrollo de las neuronas piramidales de CA1. Las más relevantes para la generación del ADP son la corriente persistente de sodio y la corriente de tipo T voltaje-dependiente de calcio, mientras que la principal corriente que se opone a esta despolarización es la corriente M de potasio (Azouz et al., 1996; Magee y Carruth, 1999; Sanabria et al., 2001; Su et al., 2001, 2002; Yue y Yaari, 2004; Metz et al., 2005; Chen et al., 2005; 2008). Para estudiar el papel que juegan estas corrientes en el hipotiroidismo se realizó un estudio farmacológico utilizando bloqueantes de las corrientes implicadas en el ADP sobre neuronas controles e hipotiroideas que disparan en ráfagas.

Primero, se utilizó el bloqueante de canales de sodio TTX a una concentración de 10 nM, para estudiar el papel de la corriente persistente de sodio sobre el ADP de las neuronas BS de animales controles e hipotiroideos. El TTX provoca una leve reducción significativa de la duración media del ADP, del  $11,76 \pm 3,35\%$  en las células controles ( $p < 0,01$ ) y del  $15,65 \pm 4,28\%$  en las hipotiroideas ( $p < 0,01$ ). La reducción de la amplitud máxima es mínima, sin ser significativa en las células controles ( $-4,19 \pm 4,01\%$ ), aunque si en las hipotiroideas ( $-6,73 \pm 1,69\%$ ,  $p < 0,001$ ). Por otra parte, el TTX reduce el ADP de modo similar entre ambos grupos, tanto en la duración media (control:  $-11,76 \pm 3,35\%$ ,

n=12 vs. TX:  $-15,65 \pm 4,28\%$ , n=12), como en la amplitud máxima (control:  $-4,91 \pm 4,01\%$ , n=12 vs. TX:  $-6,73 \pm 1,69\%$ , n=12) (Figura 33).

Segundo, se comprobó si el bloqueante de la corriente M linopiridina ( $10 \mu\text{M}$ ) afecta al ADP de las neuronas BS de animales controles e hipotiroideos. La aplicación de la linopiridina produce un leve aumento en la amplitud máxima del ADP, significativo en las células controles ( $8,9 \pm 2,78\%$ ,  $p < 0,05$ ) y no significativo en las células hipotiroideas ( $6,12 \pm 3,6\%$ ). El efecto sobre la duración media del ADP es muy variable y no significativo, con un error muy elevado en los datos promedios, de  $-15,2 \pm 9,14\%$  para las neuronas controles y de  $-2,97 \pm 11,05\%$  para las hipotiroideas. Por otro lado, los efectos de la linopiridina son muy similares en ambos grupos, sin presentar diferencias estadísticas, ni sobre la duración media del ADP (control:  $-15,2 \pm 9,14\%$ , n=5 vs. TX:  $-2,97 \pm 11,05\%$ , n=7), ni sobre su amplitud máxima (control:  $8,9 \pm 2,78\%$ , n=5 vs. TX:  $6,12 \pm 3,6\%$ , n=7) (Figura 33).

Por último, se evaluó la participación de la corriente de tipo T de calcio sobre el tamaño y la forma del ADP de las neuronas BS de animales controles e hipotiroideos, mediante la aplicación de níquel ( $0,1 \text{ mM}$ ). A dicha concentración el níquel bloquea selectivamente los canales de calcio que se activan a bajo umbral (*low-voltage activated*, LVA) y que se corresponden con los canales de calcio de tipo T voltaje-dependientes, sin apenas afectar a los canales de calcio de alto umbral (*high-voltage activated*, HVA) (Catterall et al., 2005). La aplicación de níquel provoca una clara y muy significativa disminución de la duración media del ADP, que se reduce en un  $32,43 \pm 2,7\%$  en las células controles ( $p < 0,001$ ) y en un  $41,95 \pm 2,47\%$  en las hipotiroideas ( $p < 0,001$ ). La amplitud máxima aunque en menor magnitud también se reduce muy significativamente, en un  $13,36 \pm 2,4\%$  en las células controles ( $p < 0,001$ ) y en un  $24,4 \pm 2,47\%$  en las hipotiroideas ( $p < 0,001$ ). El efecto de la aplicación del níquel sobre el tamaño y la forma del ADP es significativamente mayor en los animales hipotiroideos, tanto en la duración media del ADP (control:  $-32,43 \pm 2,7\%$ , n=6 vs. TX:  $-41,95 \pm 2,47\%$ , n=6,  $p < 0,05$ ), como en la amplitud máxima (control:  $-13,36 \pm 2,4 \%$ , n=6 vs. TX:  $-23,4 \pm 3,37 \%$ , n=6,  $p < 0,05$ ) (Figura 33).



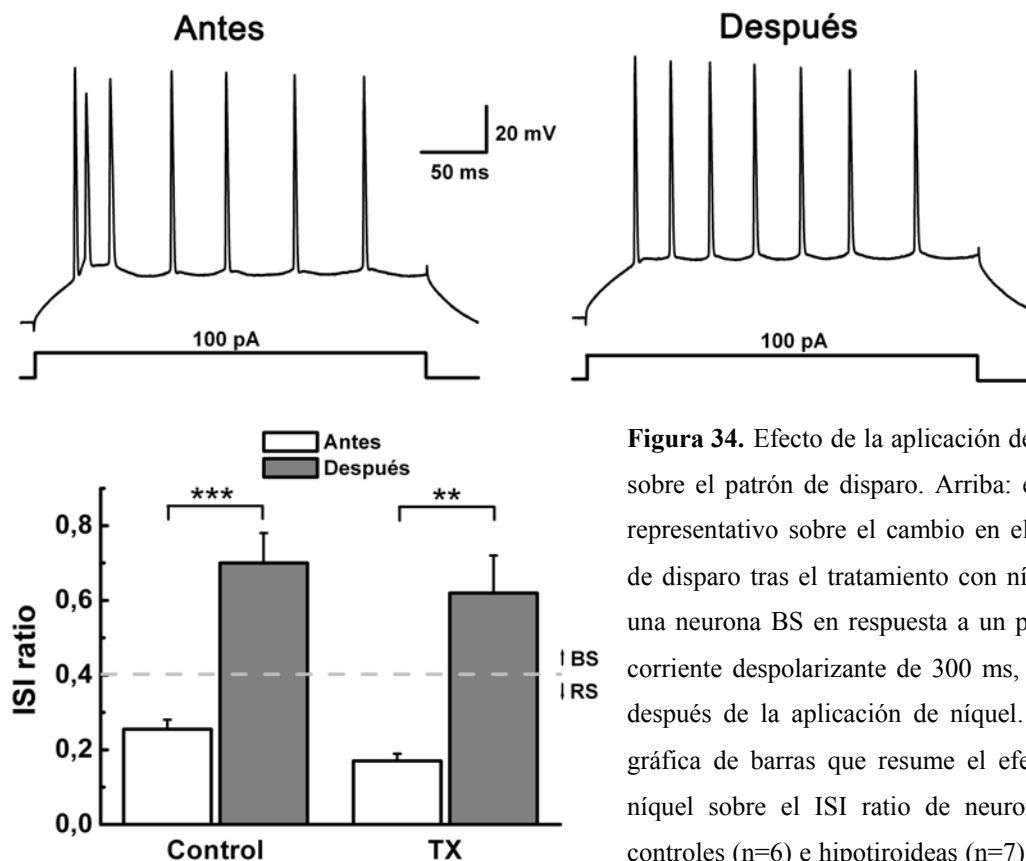
**Figura 33.** Gráfico resumen sobre la sensibilidad de la despolarización postpotencial a distintos bloqueantes farmacológicos. La duración media del ADP es sensible a TTX y a níquel, pero no a linopiridina. La amplitud máxima del ADP es sensible a níquel, y se ve ligeramente afectada por TTX y linopiridina. El tratamiento con níquel es el único que causa un efecto distinto entre células controles e hipotiroideas. El número de células analizadas está indicado en cada barra.

Control vs. TX: \*  $p < 0,05$ .

ADP sin bloqueante vs. ADP con bloqueante: #  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,01$ ; ###  $p < 0,001$ .

#### 4.4. Efectos del níquel sobre el patrón de disparo y relación con el ADP

El estudio farmacológico sobre las corrientes implicadas en el ADP pone de manifiesto que el efecto del níquel sobre el ADP es mucho mayor que el del TTX o la linopiridina, siendo el único que afecta de modo distinto las células hipotiroideas con respecto a las controles. A fin de comprobar si el efecto del níquel sobre el ADP se correlaciona con el disparo en ráfaga de las neuronas, se utilizó el ISI ratio como medida de reconocimiento del patrón de disparo (Metz et al., 2005; ver Material y Métodos), antes y después de la aplicación del níquel (0,1 mM) al medio extracelular (Figura 34). Los resultados muestran como el ISI ratio aumenta muy significativamente, tanto en las células controles, de  $0,26 \pm 0,03$  a  $0,7 \pm 0,08$  ( $n=6$ ;  $p < 0,001$ ) como en las hipotiroideas, de  $0,17 \pm 0,019$  a  $0,62 \pm 0,1$  ( $n=7$ ;  $p < 0,001$ ) tras la aplicación del níquel. De modo que el ISI ratio cambia de estar por debajo de 0,4 a superar este valor (Figura 34). Además, cinco de seis células controles y seis de siete células hipotiroideas cambian su patrón de disparo de BS a RS. Estos resultados sugieren que durante el desarrollo los mecanismos de regulación del patrón de disparo y el ADP postnatal dependen en gran medida de la activación de corrientes de calcio sensibles a níquel, como la corriente T. Por tanto, las diferencias descritas en el comportamiento de disparo entre los animales controles y los hipotiroideos podrían estar relacionadas con cambios en la corriente T.

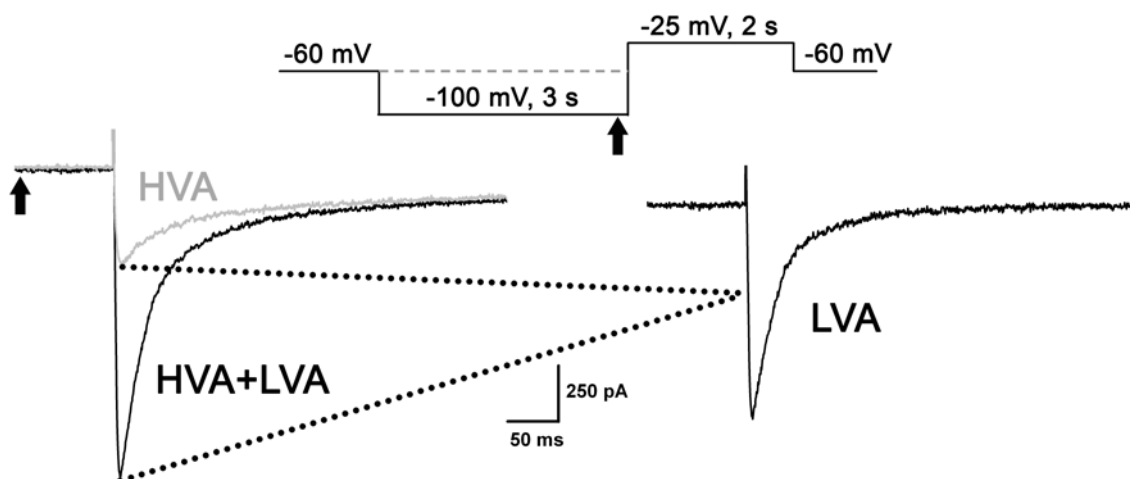


**Figura 34.** Efecto de la aplicación de níquel sobre el patrón de disparo. Arriba: ejemplo representativo sobre el cambio en el patrón de disparo tras el tratamiento con níquel de una neurona BS en respuesta a un pulso de corriente despolarizante de 300 ms, antes y después de la aplicación de níquel. Abajo: gráfica de barras que resume el efecto del níquel sobre el ISI ratio de neuronas BS controles (n=6) e hipotiroideas (n=7) antes y después del tratamiento. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Hasta ahora, dentro del estudio comparativo entre neuronas piramidales de CA1 de animales controles e hipotiroideos y mediante experimentos en fijación de corriente, se han encontrado modificaciones en el patrón de disparo (BS o RS, Figura 19), que se relacionan con cambios en el ADP (Figura 31). Asimismo, se han encontrado incrementos y decrementos en la excitabilidad (Figuras 25 y 27), que se relacionan con las diferencias en las propiedades pasivas (Tabla 7) y activas de membrana de las neuronas. Además, se han encontrado alteraciones en la morfología del potencial de acción (Tabla 15) que se relacionan con posibles cambios en las corrientes de potasio. A continuación mediante experimentos de fijación de voltaje se estudiarán: la corriente de calcio de bajo umbral, dada su posible implicación en los cambios observados en el ADP (Figura 33) y las corrientes de potasio A y D posiblemente implicadas en los cambios morfológicos del potencial de acción y de la excitabilidad.

## 5. Efectos del hipotiroidismo sobre la corriente de tipo T de calcio

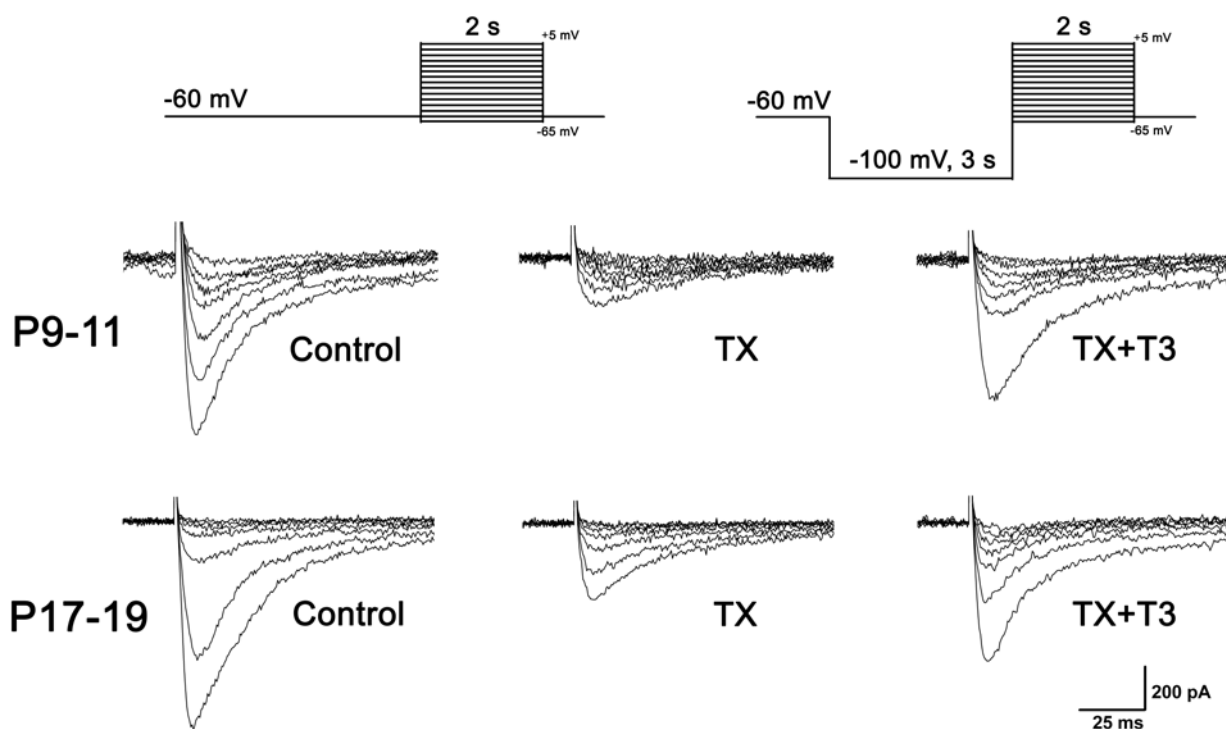
La corriente de calcio de bajo umbral o corriente T tiene un papel crucial en la generación de la despolarización postpotencial y en el control del comportamiento de disparo de las neuronas piramidales de CA1 durante el desarrollo. Como se vio en el apartado anterior el ADP es sensible al níquel, bloqueante de la corriente T de calcio (Figura 33), además, la aplicación de níquel es capaz de cambiar un comportamiento de disparo en ráfaga de una neurona piramidal a un patrón regular (Figura 34). A fin de comprobar la posible implicación de la corriente T en el patrón de disparo, se realizaron registros de *patch-clamp* en célula entera en las neuronas piramidales de CA1 disociadas en fijación de voltaje a un potencial basal de fijación de membrana de -60 mV.



**Figura 35.** Protocolo de sustracción de la corriente de tipo T de calcio. Arriba se muestran superpuestos los diagramas de los protocolos de estimulación, el trazado en negro con prepulso hiperpolarizante y en gris y discontinuo sin prepulso. Abajo, izquierda: el registro negro se obtiene tras un prepulso hiperpolarizante de 3 s y presenta las corrientes HVA+LVA y el registro gris se obtiene sin el prepulso y presenta sólo la corriente HVA. Abajo, derecha: la corriente T aislada es el resultado de la sustracción de los registros de la izquierda. La flecha en el protocolo de estimulación indica el inicio de los registros de las corrientes que se muestran abajo.

Para aislar la corriente de calcio de bajo umbral (LVA, *Low-voltage activated*) de las corrientes de alto umbral (HVA, *High-voltage activated*) se sustrajo el registro de corriente obtenido mediante un prepulso hiperpolarizante a -100 mV de 3 s de duración, que presenta todas las corrientes, del registro de corriente que se obtiene sin prepulso

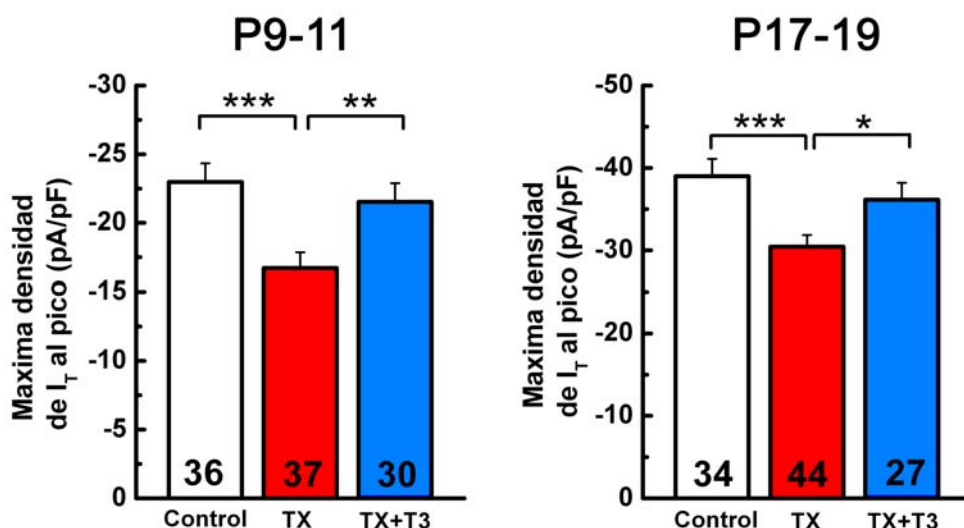
hiperpolarizante que presenta sólo las corrientes de calcio de alto umbral (Figura 35). La corriente T registrada mediante el protocolo de sustracción (Figura 36), así como su relación corriente-voltaje (Figura 38) es coherente con el rango de activación de las corrientes de calcio de bajo umbral registradas por otros autores en las neuronas piramidales disociadas del hipocampo (Thompson y Wong, 1991). Por tanto, se empleó este protocolo para estudiar la corriente T en neuronas disociadas de ratas controles, hipotiroideas e hipotiroideas tratadas con T<sub>3</sub> durante el desarrollo (P9-11 y P17-19) a un potencial basal de fijación de -60 mV. Todos los registros se realizaron en presencia de TTX (0,5  $\mu$ M) en el líquido extracelular para bloquear las corrientes voltaje-dependientes de sodio y con TEA (20 mM) en el líquido intracelular para bloquear corrientes de potasio.



**Figura 36.** Corrientes T registradas en neuronas disociadas controles, hipotiroideas (TX) e hipotiroideas tratadas con T<sub>3</sub> (TX+T3) en los dos grupos de edad. Arriba se muestran los protocolos de estimulación utilizados para aislar la corriente T inducida mediante pulsos crecientes despolarizantes (+5 mV) con o sin prepulso en un rango de voltaje de -65 a +5 mV. Abajo se presentan ejemplos representativos de las corrientes aisladas en un rango de voltaje de -55 a -25 mV en todos los grupos estudiados. Se observa una clara disminución de la corriente T en el hipotiroidismo y su recuperación tras el tratamiento con T<sub>3</sub>.

### 5.1. Estudio de la densidad máxima de corriente T al pico

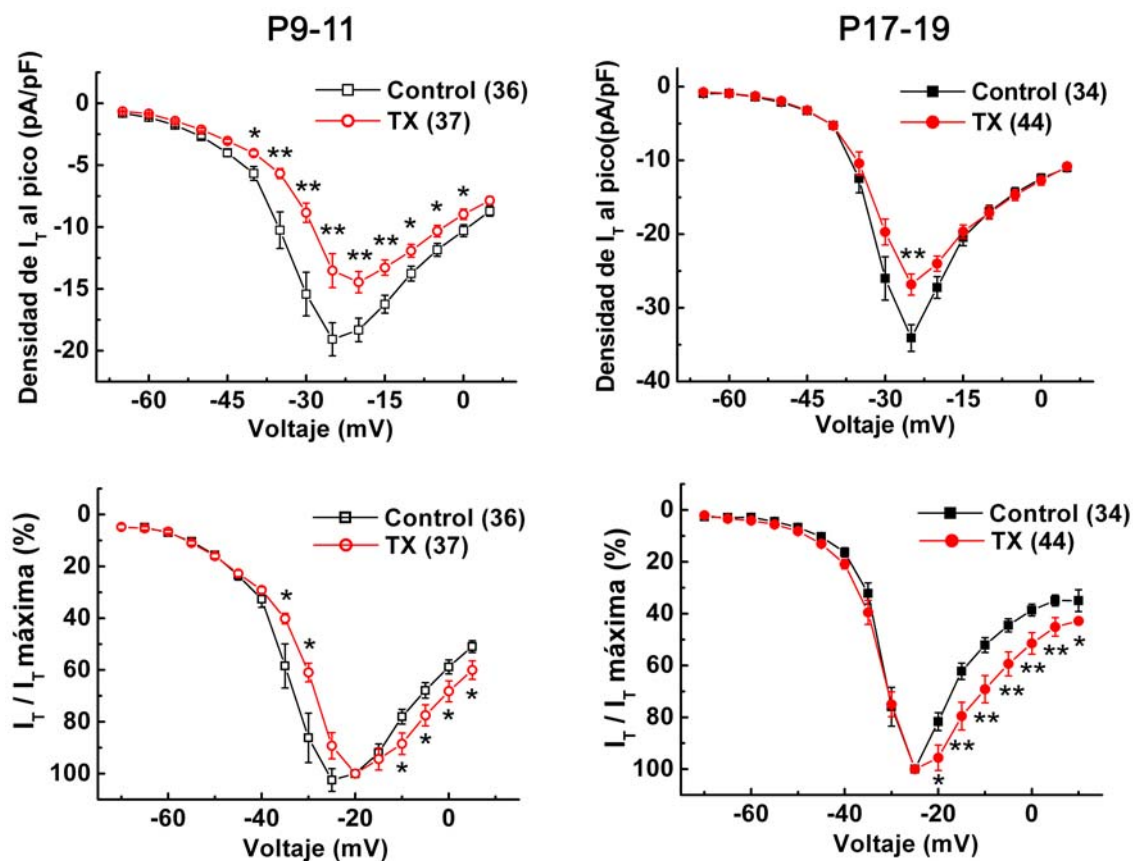
Primero, se analizaron las corrientes T obtenidas mediante pulsos crecientes de voltaje despolarizante de 2 s de duración y que se incrementan +5 mV desde -65 a +5 mV (Figura 36). En la Figura 36 se muestran ejemplos representativos de estos registros donde se aprecia una clara disminución de la corriente T en los animales hipotiroideos y su recuperación cuando se administra hormona tiroidea a las ratas hipotiroideas. Sin embargo, no se pueden comparar las corrientes registradas entre animales controles e hipotiroideos directamente debido a las diferentes capacidades de membrana que presentan estos animales entre sí. Por tanto, la densidad de corriente al pico se utilizó como medida de la corriente T (dividiendo la amplitud de la corriente medida al pico entre la capacidad de la membrana) para eliminar la influencia del tamaño celular sobre la cantidad de corriente registrada. La Figura 37 muestra que la máxima densidad de corriente al pico (obtenida mediante el protocolo de estimulación de la Figura 36 y a partir del voltaje que presenta la máxima amplitud al pico) es significativamente menor en las ratas hipotiroideas, en ambos grupos de edad, tanto en P9-11 (control:  $-22,98 \pm 1,36$  pA/pF, n=36 vs. TX:  $-16,71 \pm 1,15$  pA/pF, n=37;  $p < 0,001$ ), como en P17-19 (control:  $-39,00 \pm 2,09$  pA/pF, n=34 vs. TX:  $-30,44 \pm 1,4$  pA/pF, n=44;  $p < 0,001$ ) (Figura 37). Para determinar si los niveles de hormona tiroidea son los causantes de la disminución observada en la densidad de corriente T de calcio, se administró T3 a los animales hipotiroideos (grupo TX+T3, ver Material y Métodos), y se encontró que los valores de la corriente T se revierten a niveles similares al valor control, tanto en P9-11 (TX:  $-16,71 \pm 1,15$  pA/pF, n=37 vs. TX+T3:  $-21,53 \pm 1,36$  pA/pF, n=30;  $p < 0,001$ ), como en P17-19 (TX:  $-30,44 \pm 1,40$  pA/pF, n=44 vs. TX+T3:  $-36,14 \pm 2,05$  pA/pF, n=27;  $p < 0,05$ ).



**Figura 37.** Gráfica de barras con los valores promedios de la máxima densidad de corriente T al pico en los distintos grupos a las dos edades estudiadas. El número de células registradas se indica en cada barra (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

## 5.2. Estudio de la relación corriente-voltaje de la corriente T

Segundo, se comprobó si la ausencia de hormona tiroidea modulaba la relación corriente-voltaje. A partir de las corrientes T obtenidas mediante pulsos crecientes de voltaje despolarizante de 2 segundos de duración y que se incrementan +5 mV desde -65 a +5 mV (Figura 36) se puede construir la relación corriente-voltaje. Los resultados muestran como la densidad de la corriente T de las ratas hipotiroideas del grupo de edad P9-11 se reduce en un amplio rango de voltajes, desde -40 a 0 mV. Por otro lado en el grupo de edad P17-19 la reducción no es tan amplia, siendo la disminución significativa únicamente en el pulso de voltaje de -5 mV, que corresponde al voltaje al cual se obtiene la máxima densidad de corriente al pico (Figura 38). Por otra parte, cuando se normaliza la relación corriente-voltaje con respecto a la máxima densidad de corriente al pico, se observa que las neuronas hipotiroideas del grupo P9-11 presentan un desplazamiento a la derecha en los pulsos registrados entre -35 mV y +5 mV, mientras que en las del grupo P17-19 el desplazamiento a la derecha sólo se produce entre los pulsos -20 mV a +10 mV (Figura 38).



**Figura 38.** Relación corriente-voltaje de las neuronas controles e hipotiroideas en los dos grupos de edad. Arriba: Cada punto representa el valor promedio de la densidad de la corriente T al pico para cada voltaje. Abajo: normalización de la relación corriente-voltaje con respecto a la máxima densidad de corriente al pico. El número de células registradas se indica en la leyenda entre paréntesis (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ).

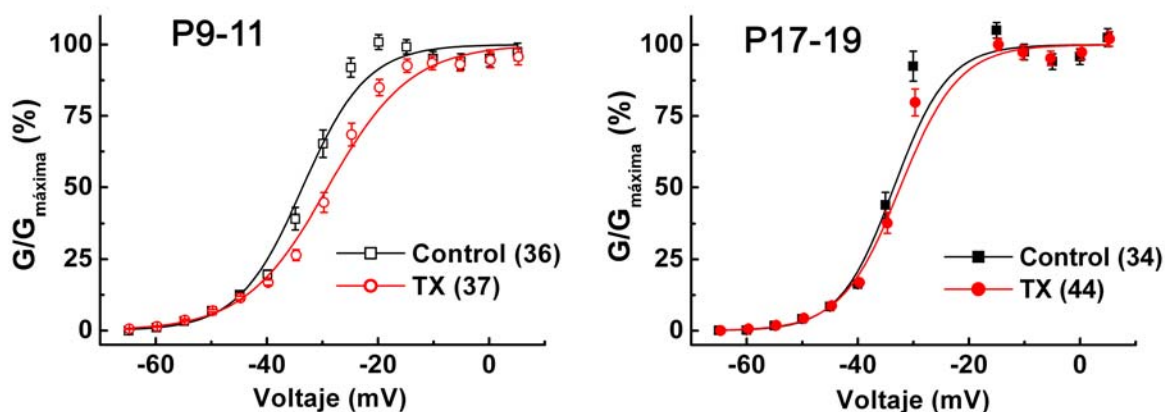
### 5.3. Estudio de las curvas de activación de la corriente T

Tercero, se analizó si la ausencia de hormona tiroidea modulaba las curvas de activación. Para analizar en mayor profundidad el desplazamiento a la derecha de la corriente T se requiere estudiar sus curvas de activación normalizándolas en función de sus conductancias. La conductancia ( $G$ ) para cada voltaje se calcula dividiendo la corriente al pico que se registra entre la fuerza electromotriz (que se define como la diferencia entre el potencial de equilibrio para el calcio y el potencial al cual se obtuvo la corriente). Una vez normalizada cada curva a su máximo de conductancia, se realiza un ajuste mediante la ecuación de Boltzmann ( $G=1/[1+\exp(V_{50}-V)/k]$ ), donde  $V_{50}$  es el voltaje medio de activación, y  $k$  la pendiente de la curva. En el grupo P9-11 las neuronas hipotiroideas presentan el voltaje medio de activación desplazado hacia valores más despolarizados que

las controles, mientras que en el grupo P17-19 los voltajes medios de activación son más similares (Figura 39, Tabla 21).

**Tabla 21.** Parámetros de las curvas de activación de la corriente T.

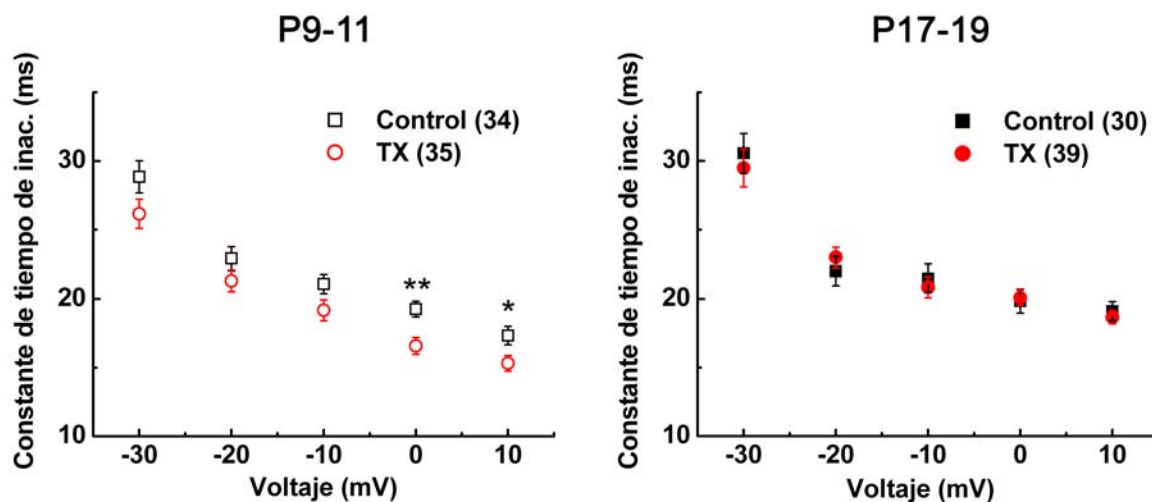
Edad	Tipo	$V_{50}$ (mV)	$k$	Nº de células
P9-11	Control	$-33,58 \pm 0,47$	$5,78 \pm 0,26$	36
	TX	$-29,05 \pm 0,56$	$7,49 \pm 0,29$	37
P17-19	Control	$-33,51 \pm 0,50$	$4,87 \pm 0,24$	34
	TX	$-32,40 \pm 0,52$	$5,28 \pm 0,26$	44



**Figura 39.** Curvas de activación de la corriente T para neuronas controles e hipotiroideas en los dos grupos de edad. Los datos se han obtenido a partir de la normalización con respecto a la máxima conductancia de las células de la Figura 38. El número de células registradas se indica en la leyenda entre paréntesis.

#### 5.4. Estudio de la cinética de inactivación de la corriente T

Por último, se estudió cómo la ausencia de hormona tiroidea modula la cinética de caída de la corriente T a lo largo del tiempo, o lo que es lo mismo, la constante de tiempo de inactivación. Los resultados de dicho estudio muestran que la ausencia de hormona tiroidea acelera significativamente las cinéticas de inactivación a potenciales de membrana por encima de 0 mV en neuronas del grupo P9-11 con respecto a las controles. En cambio, las neuronas controles e hipotiroideas del grupo P17-19 presentan valores similares a todos los potenciales de membrana estudiados (Figura 40).



**Figura 40.** Voltaje dependencia de la constante de tiempo de inactivación de la corriente T registrada en neuronas controles e hipotiroideas en los dos grupos de edad. Las neuronas hipotiroideas del grupo P9-11 presentan diferencias estadísticamente significativas a potenciales de membrana por encima de 0 mV. El número de células registradas se indica en la leyenda entre paréntesis.

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

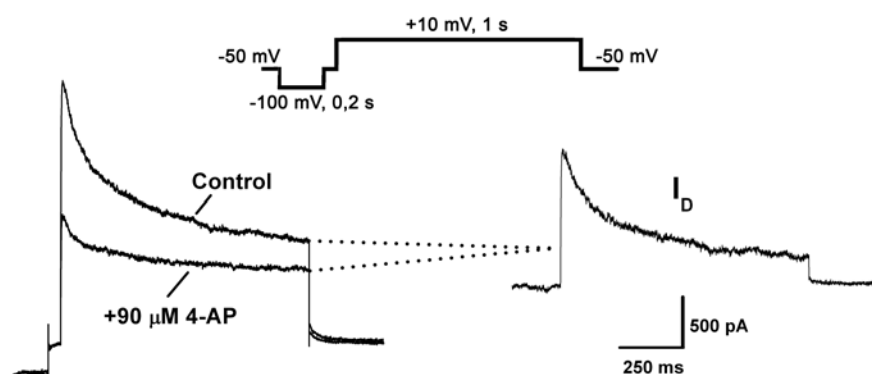
### 5.5. Estudio de la corriente T durante el desarrollo

Las corrientes de calcio dependientes de voltaje se desarrollan en las primeras semanas postnatales hasta alcanzar un estado adulto en torno al día 20 postnatal (Kortekaas y Wadman, 1997). En los resultados se observa cómo la densidad máxima de corriente T al pico aumenta significativamente con la edad, tanto en el grupo control como en el grupo hipotiroideo (Figura 37) aumentando la densidad de  $-22,98 \pm 1,36$  pA/pF en P9-11 a  $-39,00 \pm 2,09$  pA/pF en P17-19 en el grupo control ( $p < 0,001$ ), y de  $-16,71 \pm 1,15$  pA/pF a  $-30,44 \pm 1,40$  pA/pF en el grupo hipotiroideo ( $p < 0,001$ ). Por otro lado, en el grupo control no aparecen diferencias evidentes entre el grupo P9-11 y P17-19 ni en las curvas de activación (Tabla 21, Figura 39) ni en las constantes de tiempo de inactivación de la corriente T (Figura 40). Sin embargo, en el grupo hipotiroideo sí aparecen diferencias a lo largo del desarrollo, tanto de la curva de activación como de las constantes de inactivación, pasando de ser diferentes a los controles en el grupo P9-11 (Figuras 39 y 40) a similares en el grupo P17-19, indicando un posible retraso en la maduración de estos parámetros debido a la ausencia de hormona tiroidea.

**Implicaciones funcionales de estos resultados** : la densidad de corriente T al pico se encuentra disminuida en ausencia de hormona tiroidea durante el desarrollo (Figura 37), siendo mayor el efecto a P9-11, puesto que sólo a esta edad existe disminución de la corriente T en la mayor parte de los potenciales de membrana registrados (Figura 38). Asimismo, a P9-11, tanto la cinética de activación (Figura 39), como la constante de tiempo de inactivación de la corriente T (Figura 40) presentan diferencias con respecto a las controles, las cuales van disminuyendo con el desarrollo, siendo similares estos valores entre controles e hipotiroideos en el grupo P17-19. Dichas diferencias favorecen la disminución de corriente T y podrían ser las causantes del retraso en la aparición del patrón de disparo en ráfaga y de las alteraciones del ADP en los animales hipotiroideos.

## 6. Efectos del hipotiroidismo sobre la corriente de tipo D de potasio

La corriente de tipo D de potasio es una corriente de salida, de activación rápida y de inactivación lenta, dependiente de voltaje y sensible a bajas concentraciones de 4-AP y a  $\alpha$ -dendrotoxina. Fue descrita por primera vez en las neuronas piramidales de CA1 por Storm en 1988. Esta corriente es la responsable del retraso en la inducción del primer potencial de acción ante una despolarización de la membrana, interviene en la repolarización del potencial de acción y modula la liberación de neurotransmisores (Storm, 1988). A fin de comprobar la implicación de la corriente D, en relación a la disminución de la excitabilidad intrínseca y a los cambios en los parámetros del potencial de acción observados en los animales hipotiroideos, se llevaron a cabo experimentos de registro en fijación de voltaje en células dissociadas, en dos grupos de edad, P9-12 y P16-19, a un potencial basal de fijación membrana de -50 mV. Los experimentos se realizaron en presencia de TTX (0,5  $\mu$ M), para bloquear las corrientes voltaje-dependientes de sodio, y de cobalto (3 mM), para bloquear las corrientes voltaje-dependientes de calcio y las corrientes de potasio dependientes de calcio, en el líquido extracelular. Para aislar la corriente D del resto de las corrientes de potasio, se sustrajo el registro en presencia de 90  $\mu$ M de 4-AP (bloquea la corriente D) del registro en ausencia de 4-AP (Figura 41). Asimismo, se aplicó un prepulso de 50 ms a -50 mV antes del pulso despolarizante para eliminar la corriente transitoria de potasio A. La corriente registrada mediante este protocolo de sustracción es una corriente D-like coherente con el rango de activación de la corriente D (Storm, 1988).

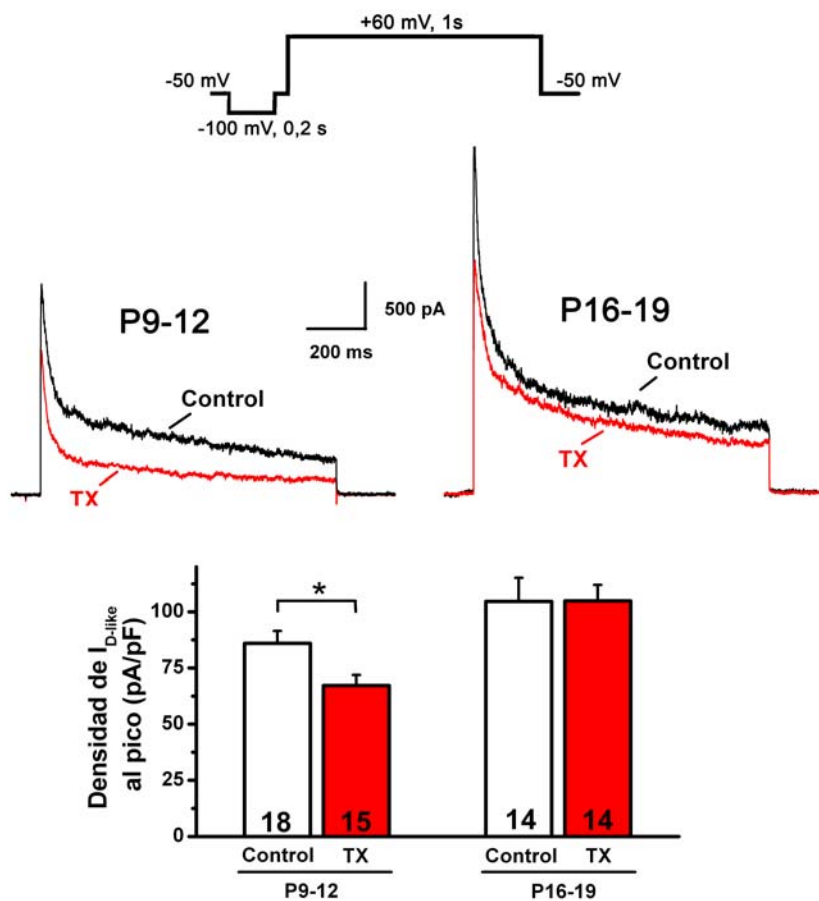


**Figura 41.** Protocolo de sustracción de la corriente de tipo D-like de potasio. Arriba se muestra el diagrama del protocolo de estimulación utilizado para aislar la corriente D. Esta corriente se obtiene mediante la sustracción de dos registros

(abajo, izquierda): uno en el que se ha eliminado la corriente D mediante 4-AP (90  $\mu$ M) (registro de las corrientes de potasio menos la D) y otro el que no se ha aplicado el bloqueante. La corriente D aislada (abajo, derecha) es el resultado de la sustracción de los registros de la izquierda.

### 6.1. Estudio de la densidad de corriente D-like al pico

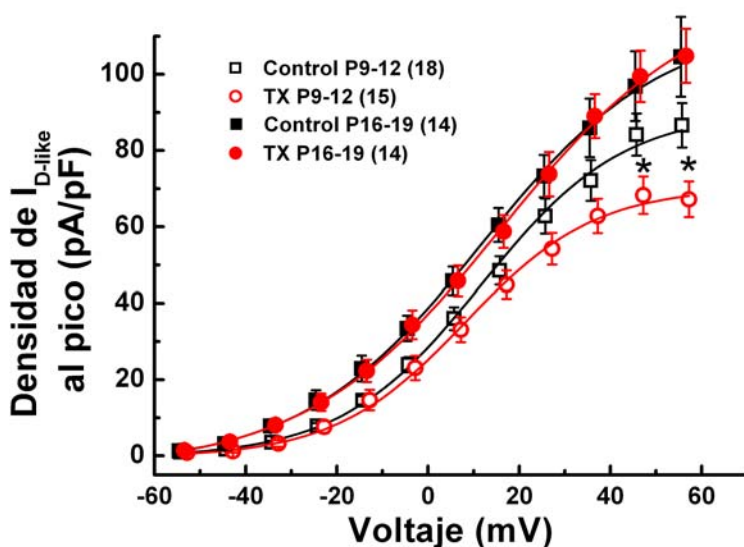
Primero, se comprobó si la ausencia de hormona tiroidea modulaba la densidad de corriente D-like al pico en neuronas piramidales dissociadas de CA1 mediante un pulso de voltaje que lleva a la célula a +60 mV. Se utilizó como medida de la corriente D-like la densidad de corriente al pico (dividiendo la amplitud de la corriente al pico entre la capacidad de la célula). Existe una disminución de la corriente D-like en los animales hipotiroideos del grupo P9-12 (Figura 42). Las células hipotiroideas del grupo P9-12 presentan una densidad de corriente D-like significativamente menor que las controles (control:  $85,95 \pm 5,53$  pA/pF,  $n=18$  vs. TX:  $67,22 \pm 4,69$  pA/pF,  $n=15$ ;  $p < 0,05$ ), sin embargo el grupo P16-19 no presenta diferencias (control:  $104,65 \pm 10,48$  pA/pF,  $n=14$  vs. TX:  $104,89 \pm 7,09$  pA/pF,  $n=15$ ) (Figura 42).



**Figura 42.** Efectos del hipotiroidismo sobre la corriente D-like de potasio. Ejemplos representativos de registros de corriente D-like en neuronas controles (negro) e hipotiroideas (rojo) de los dos grupos de edad. Gráfica de barras con los valores promedios de la densidad de corriente D-like al pico en los diferentes grupos. El número de células registradas se indica en cada barra (\*  $p < 0,05$ ).

## 6.2. Estudio de la relación corriente-voltaje de la corriente D-like

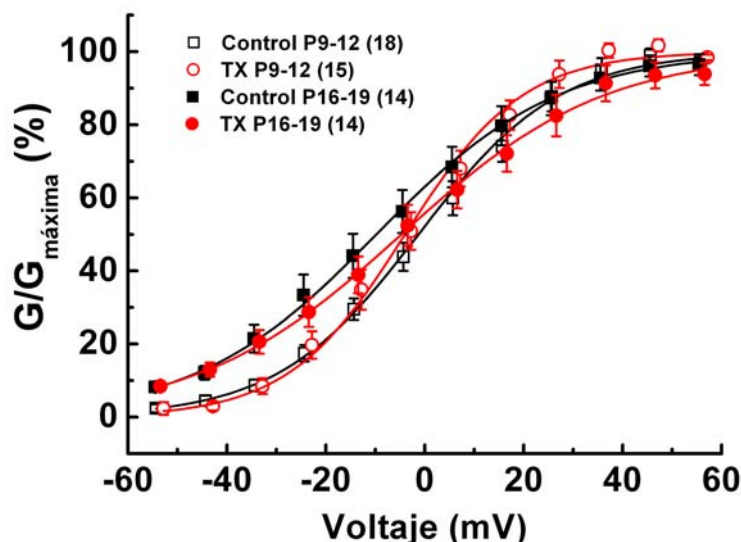
Segundo, se estudió si la ausencia de hormona tiroidea modulaba la relación corriente-voltaje de la corriente D-like. A partir de las corrientes D-like obtenidas mediante pulsos crecientes de voltaje despolarizante de 1 s de duración y que se incrementan +10 mV desde -50 a +60 mV se puede construir la relación corriente-voltaje. En la Figura 43 se muestra cómo la densidad de corriente al pico aumenta significativamente en las neuronas controles con respecto a las hipotiroideas cuando se aplican pulsos de voltaje de +50 mV y de +60 mV en el grupo de P9-12, sin presentar diferencias en la edad más adulta.



**Figura 43.** Relación corriente-voltaje de las neuronas controles e hipotiroideas en los dos grupos de edad. Cada punto representa el valor promedio de la densidad de la corriente D-like al pico para cada voltaje. El número de células para cada caso se indica en la leyenda entre paréntesis (\*  $p < 0,05$ ).

## 6.3. Estudio de las curvas de activación de la corriente D-like

Tercero, se analizó si la ausencia de hormona tiroidea alteraba las curvas de activación. Cuando se normalizó la relación corriente-voltaje con respecto a su conductancia máxima, como se hizo en el apartado anterior para la corriente T, se encontró que la voltaje dependencia de la curva de activación es similar entre controles e hipotiroideas en ambas edades (Figura 44). Así como los valores del voltaje medio de activación y la pendiente de la curva, existiendo sólo diferencias durante el desarrollo (Tabla 22).



**Figura 44.** Curvas de activación de la corriente D-like para neuronas controles (negro) e hipotiroideas (rojo) en los dos grupos de edad. Los datos se han obtenido a partir de la normalización con respecto a la máxima conductancia de las células de la Figura 43. Sólo se observan diferencias debidas al desarrollo. El número de células para cada caso se indica en la leyenda entre paréntesis

**Tabla 22.** Parámetros de la curva de activación de la corriente D-like.

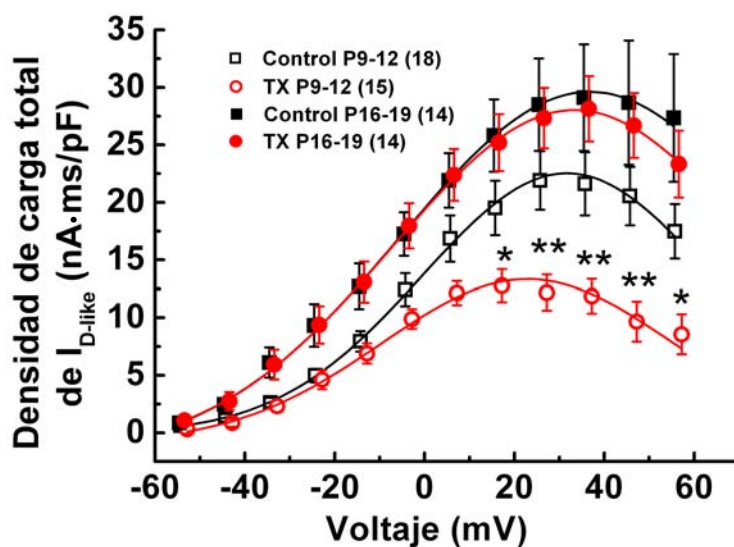
Edad	Tipo	$V_{50}$ (mV)	$k$	Nº de células
P9-12	Control	$-1,27 \pm 1,35$	$14,27 \pm 1,26$	18
	TX	$-4,01 \pm 1,50$	$11,88 \pm 1,20$	15
P16-19	Control	$-9,80 \pm 3,02$	$18,29 \pm 3,19$	14
	TX	$-4,76 \pm 3,10$	$20,49 \pm 3,79$	14

#### 6.4. Estudio de la cinética de inactivación de la corriente D-like

Cuarto, se analizó si la ausencia de hormona tiroidea cambiaba la cinética de caída de la corriente D-like a lo largo del tiempo tras su activación. Los resultados de dicho estudio muestran que la ausencia de hormona tiroidea acelera significativamente las cinéticas de inactivación, como queda reflejado en unas constantes de tiempo de inactivación más rápidas, cuando se administra un pulso despolarizante a +60 mV. La constante de tiempo de las controles del grupo P9-12 es de  $42,11 \pm 5,65$  ms (n=18), mientras que el de las hipotiroideas es significativamente menor ( $28,07 \pm 2,78$  ms, n=15;  $p < 0,05$ ). En el grupo P16-19 las controles también tienen una constante mayor, pero en este caso la diferencia no es estadísticamente significativa (control:  $61,36 \pm 10,82$  ms, n=14 vs. TX:  $46,96 \pm 3,02$  ms, n=14).

### 6.5. Estudio de la densidad de carga total de la corriente D-like

Por último, se comprobó cómo la ausencia de hormona tiroidea cambiaba la carga total de la corriente D-like a lo largo del tiempo. Si se considera que los animales hipotiroideos presentan una disminución en la densidad de corriente al pico junto con unas constantes de inactivación más rápidas, se deduce que debe haber una disminución de la carga total de la corriente. Además, puesto que la corriente D-like inactiva lentamente es importante conocer la densidad de carga total. La densidad de carga total se mide como el área debajo de la curva del registro de la corriente D-like aislada (corriente  $\cdot$  tiempo) entre la capacidad de membrana de la célula (ver Material y Métodos). Los animales hipotiroideos del grupo P9-12 presentan una densidad de carga total de la corriente significativamente menor frente a los controles cuando se aplican pulsos de voltaje superiores a +20 mV (Figura 45). En el caso del pulso despolarizante de +60 mV las neuronas controles presentan una densidad de carga total de  $17,37 \pm 2,37$  nA  $\cdot$  ms/pF mientras que las hipotiroideas de  $8,56 \pm 1,74$  nA  $\cdot$  ms/pF ( $p < 0,05$ ). No ocurre lo mismo en el grupo P16-19, donde no existen diferencias estadísticamente significativas entre controles e hipotiroideos a ningún voltaje.



**Figura 45.** Relación de la densidad de carga total de la corriente D-like con respecto al voltaje de las neuronas controles e hipotiroideas en las dos grupos de edad. Cada punto representa el valor promedio de la densidad de carga total de la corriente D-like para cada voltaje. El número de neuronas registradas se indica en la leyenda entre paréntesis.

(\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ).

## 6.6. Estudio de la corriente D-like durante el desarrollo

Con respecto al desarrollo de la corriente D en estas primeras semanas postnatales, los resultados muestran cómo la densidad de corriente al pico aumenta con la edad cuando se aplican pulsos de voltaje +60 mV, siendo este aumento estadísticamente significativo en el grupo hipotiroideo ( $p < 0,001$ ) pero no en el control (Figura 42). Además, el aumento de la corriente D-like en el grupo P16-19 con respecto al P9-12 en los animales hipotiroideos es estadísticamente significativo en prácticamente todos los voltajes estudiados (Figura 43), mientras que en los animales controles el grupo P9-12 presenta valores mucho más cercanos al P16-19. La curva de activación se desplaza con la edad hacia la izquierda, sobre todo en los voltajes más hiperpolarizados en ambos grupos, control e hipotiroideo (Figura 44). Por otro lado, las constantes de tiempo de la inactivación se vuelven más lentas con la edad, sin ser significativo el cambio en el grupo control (P9-12:  $42,11 \pm 5,65$  ms ( $n=18$ ) vs. P16-19:  $61,36 \pm 10,82$  ms,  $n=14$ ), pero sí en el hipotiroideo (P9-12:  $28,07 \pm 2,78$  ms,  $n=15$  vs. P16-19:  $46,96 \pm 3,02$  ms,  $n=14$ ;  $p < 0,001$ ). Estas cinéticas de inactivación más lentas son en parte responsables de la mayor densidad de carga total de la corriente D en el grupo P16-19 frente al P9-12 (Figura 45). En los animales controles el aumento de la densidad de carga total de corriente D con el desarrollo sólo es significativamente mayor en el rango de voltajes de -30 a 0 mV ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, el aumento es significativamente mayor para todos los voltajes ( $p < 0,001$ ) en los animales hipotiroideos, al igual que ocurría con la densidad al pico.

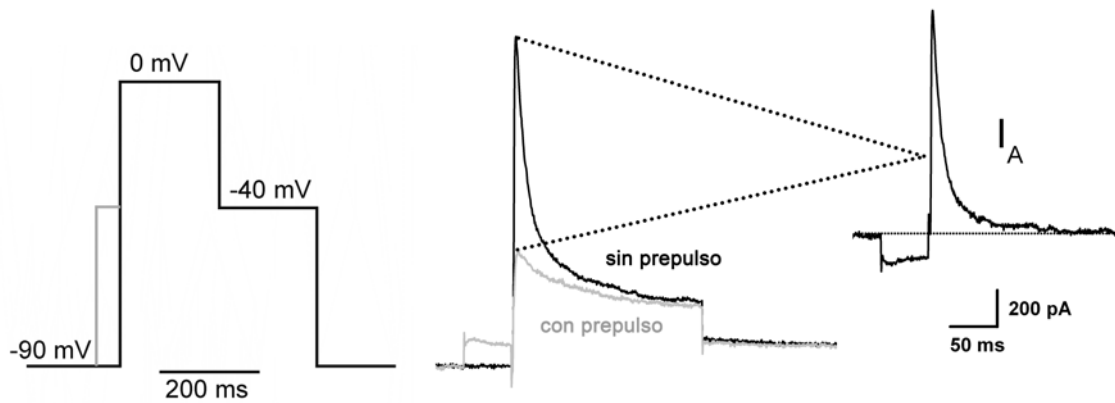
**Implicaciones funcionales de estos resultados:** la densidad de corriente D-like de potasio se encuentra disminuida en ausencia de la hormona tiroidea entre los 9 y 12 días de edad (Figura 42 y 43). Asimismo, a P9-12, la constante de tiempo de inactivación de la corriente D-like de los animales hipotiroideos con respecto a los controles es más rápida y la densidad de la carga total menor (Figura 45). Sin embargo, estos resultados de la corriente D-like no se pueden relacionar con las diferencias encontradas en relación a la excitabilidad y la morfología del potencial de acción.

## **7. Efectos del hipotiroidismo sobre la corriente de tipo A de potasio**

La corriente de tipo A de potasio es una corriente transitoria, de activación e inactivación rápida, dependiente de voltaje (Hille, 2001). Interviene en la repolarización del potencial de acción, modula la frecuencia de descarga y tiene un papel fundamental en el procesamiento de las señales en las dendritas (Connor y Stevens, 1971; Hoffman et al., 1997; Johnston et al., 2000). Con el fin de comprobar la implicación de la corriente A, en relación a la disminución de la excitabilidad intrínseca y a los cambios en los parámetros del potencial de acción observados en los animales hipotiroideos, se llevaron a cabo experimentos de registro en fijación de voltaje en células disociadas, en dos grupos de edad, P9-12 y P16-19. Los experimentos se realizaron en presencia de TTX (0,5  $\mu$ M) y de cobalto (3 mM) y a un potencial basal de fijación de membrana de -90 mV. La corriente A se aisló mediante dos métodos.

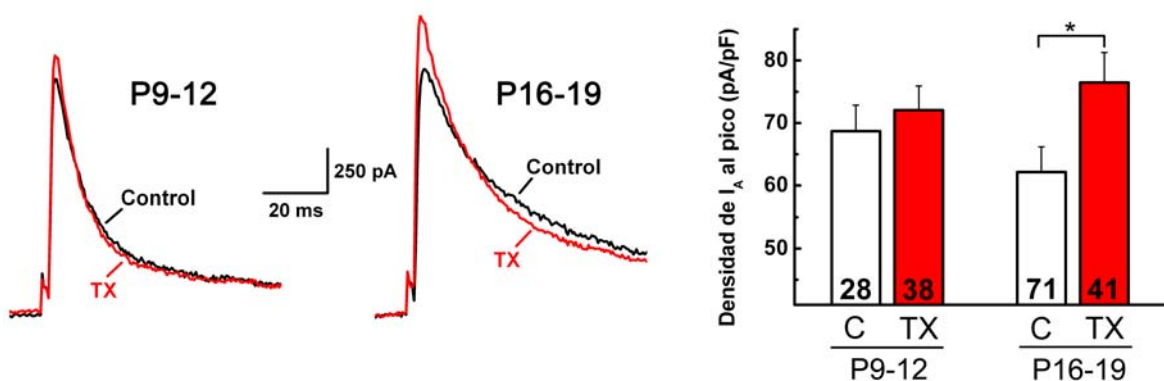
### **7.1. Estudio de la densidad de corriente A al pico aislado por un prepulso de inactivación**

En un primer grupo de experimentos la corriente A se aisló mediante un prepulso de inactivación. A partir de un potencial basal de fijación de -90 mV se aplicó un pulso test de voltaje para despolarizar la membrana a 0 mV, obteniendo una corriente con dos componentes cinéticos, uno rápido y otro lento. Si un prepulso de -40 mV y 50 ms de duración precede el pulso test, la mayor parte de la corriente transitoria se inactiva, permaneciendo sólo una corriente de inactivación lenta (Connor y Stevens, 1971; Numann et al., 1987; Klee et al., 1995; Mitterdorfer y Bean, 2002). La sustracción de la corriente obtenida con el prepulso de la obtenida sin el prepulso produjo una corriente transitoria de activación e inactivación rápida con las mismas características de la corriente A de potasio (Figura 46).



**Figura 46.** Protocolo para aislar la corriente A de potasio mediante un prepulso de inactivación. A la izquierda se muestra el diagrama del protocolo de estimulación utilizado para aislar la corriente A, mediante un prepulso de inactivación (gris). Esta corriente se obtiene mediante la sustracción de dos registros (en el centro de la figura se muestra un ejemplo representativo de los mismos): uno en el que se ha eliminado la corriente A mediante un prepulso de inactivación (gris) y otro que se obtiene sin el prepulso en el que se registran todas las corrientes de potasio (negro). A la derecha se muestra un ejemplo representativo de la corriente A aislada mediante la sustracción de los dos registros del centro de la figura.

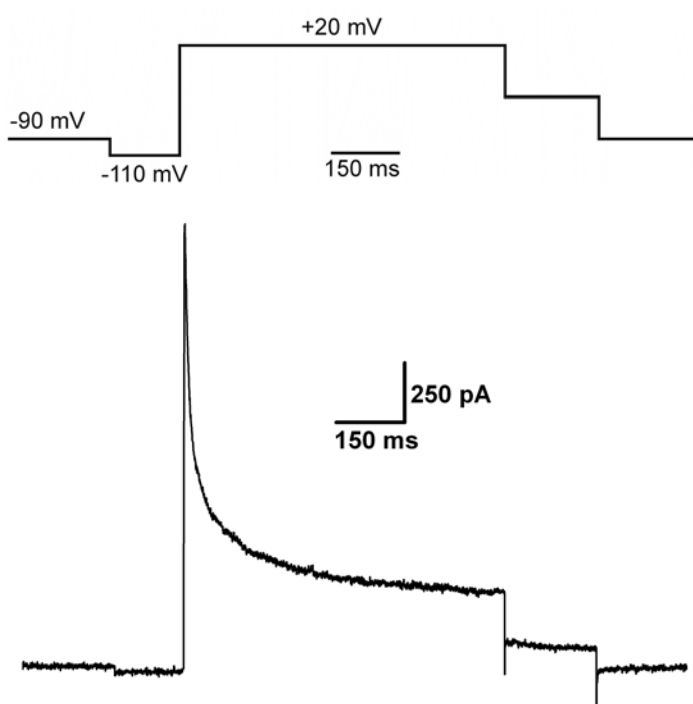
Cuando se estudió si la densidad de corriente A aislada eléctricamente se modificaba por ausencia de la hormona tiroidea, se encontró que las células hipotiroideas presentan mayor densidad de corriente al pico que las controles, siendo esta diferencia estadísticamente significativa en el grupo de mayor edad, P16-19 (control:  $62,15 \pm 4,01$  pA/pF,  $n=71$  vs. TX:  $76,47 \pm 4,80$  pA/pF,  $n=41$ ;  $p < 0,05$ ), pero no en el grupo de menor edad, P9-12 (control:  $68,69 \pm 4,16$  pA/pF,  $n=28$  vs. TX:  $72,05 \pm 3,87$  pA/pF,  $n=38$ ) (Figura 47).



**Figura 47.** Efectos del hipotiroidismo sobre la corriente A aislada por inactivación mediante el protocolo de prepulso descrito en la Figura 46. Izquierda: ejemplos representativos de registros de corriente A sustraída por prepulso de inactivación en neuronas controles (negro) e hipotiroideas (rojo) de los dos grupos de edad. Derecha: gráfica de barras de los valores promedios de la máxima densidad de corriente A al pico en los distintos grupos. El número de células registradas se indica en cada barra. \*  $p < 0,05$ .

## 7.2. Estudio de la densidad de corriente A al pico aislada por farmacología

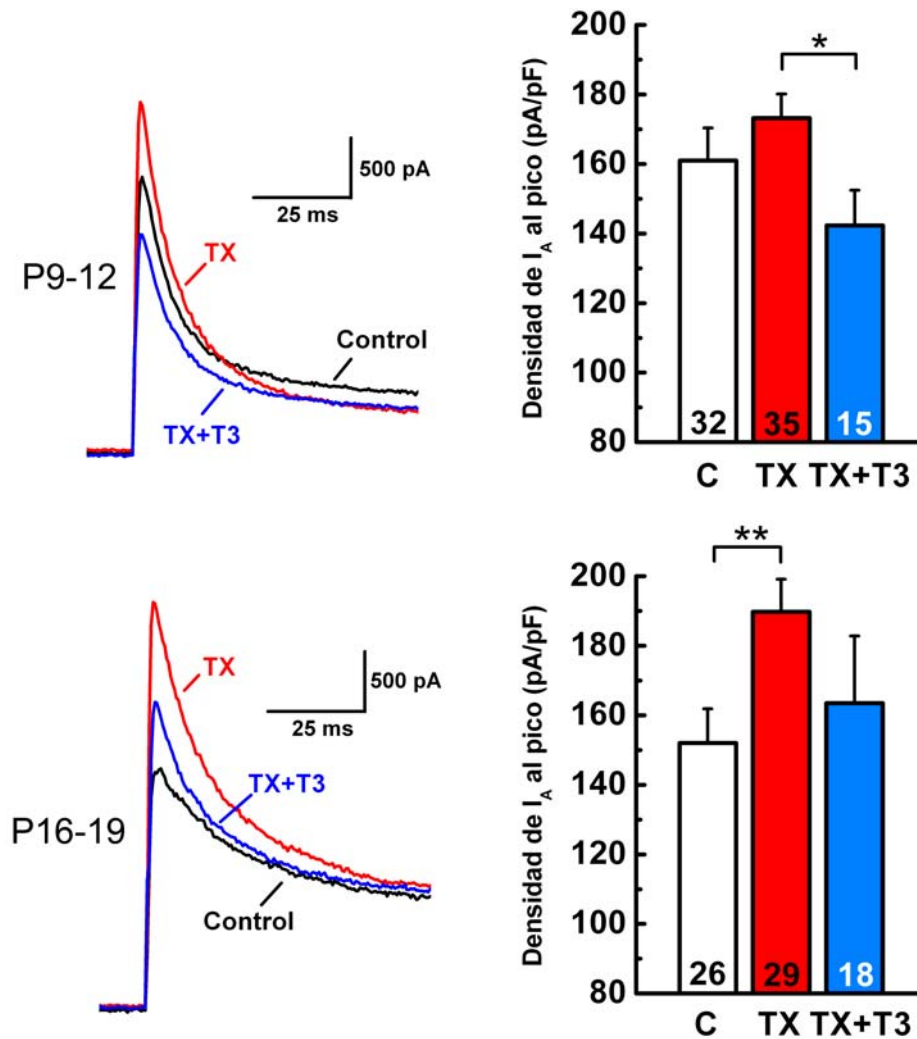
En un segundo grupo de experimentos la corriente A se aisló por farmacología. Para aislar farmacológicamente la corriente A se eliminó del registro la corriente D, mediante la administración extracelular de 4-AP (30  $\mu$ M), y la corriente K (corriente de potasio de activación muy lenta, que no se inactiva, y es sensible al TEA extracelular), mediante la administración extracelular de TEA (25 mM). La corriente que se registra en estas condiciones se corresponde con la  $I_A$ . En la Figura 48 se muestra el protocolo de estimulación de la corriente A aislada por farmacología, en el que a partir de un potencial basal de fijación de -90 mV, se aplicó un pulso test de voltaje para despolarizar la membrana hasta +20 mV, precedido de un prepulso hiperpolarizante a -110 mV de 150 ms de duración. Mediante este protocolo de estimulación la corriente aislada por farmacología presenta las mismas características que la corriente A de potasio.



**Figura 48.** Corriente A aislada por farmacología. Arriba: Protocolo de estimulación de la de la corriente A. Abajo: ejemplo representativo de un registro obtenido mediante dicho protocolo de estimulación en presencia de los bloqueantes de la corriente D (30  $\mu$ M de 4-AP) y de la corriente K (25 mM de TEA). La corriente que permanece presenta una activación e inactivación rápidas que corresponden con las características de la corriente A de potasio.

Cuando se estudió si la densidad de corriente A aislada por farmacología se modificaba por ausencia de hormona tiroidea mediante el protocolo descrito en la Figura 48, se encontraron diferencias muy similares entre controles e hipotiroideas a las obtenidas cuando se aísla por prepulso de inactivación. Es decir, un aumento de la densidad de corriente al pico de las neuronas hipotiroideas frente a las controles, siendo dicha diferencia estadísticamente significativa en el grupo P16-19 (control:  $152,03 \pm 9,85$  pA/pF,  $n=26$  vs.

TX:  $189,80 \pm 9,34$  pA/pF,  $n=29$ ;  $p < 0,01$ ), pero no en el grupo P9-12 (control:  $160,95 \pm 9,38$  pA/pF,  $n=32$  vs. TX:  $173,23 \pm 6,87$  pA/pF,  $n=35$ ) (Figura 49). Para determinar si la reducción en los niveles de hormona tiroidea es la causa del aumento de la densidad de corriente A, se administró T3 a los animales hipotiroideos (ver Material y métodos), y se encontró que el aumento de la densidad de corriente A al pico se revierte a niveles similares a los obtenidos en los animales controles en las dos edades de estudio, P9-12 ( $142,31 \pm 10,13$  pA/pF,  $n=15$ ;  $p < 0,05$  vs. TX) y P16-19 ( $163,48 \pm 19,33$  pA/pF,  $n=18$ ).



**Figura 49.** Efectos del hipotiroidismo sobre la corriente A aislada por farmacología. Izquierda: ejemplos representativos de la corriente A aislada por farmacología en neuronas controles (negro), hipotiroideas (rojo) e hipotiroideas tratadas con T3 (azules) de los dos grupos de edad. Derecha: gráfica de barras de los valores promedios de la máxima densidad de corriente A al pico en los distintos grupos. El número de células registradas se indica en cada barra.

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

### 7.3. Estudio de la cinética de inactivación de la corriente A

A continuación se analizó si la ausencia de hormona tiroidea cambiaba la cinética de caída de la corriente A, estudiando las constantes de tiempo de inactivación. Cuando se administra un pulso despolarizante a +20 mV, la corriente A presenta dos constantes de tiempo de inactivación, una rápida ( $\tau_{fast}$ ) y otra lenta ( $\tau_{slow}$ ), ajustándose la caída a una ecuación biexponencial (Tabla 23).

**Tabla 23.** Constantes de tiempo de inactivación de la corriente A

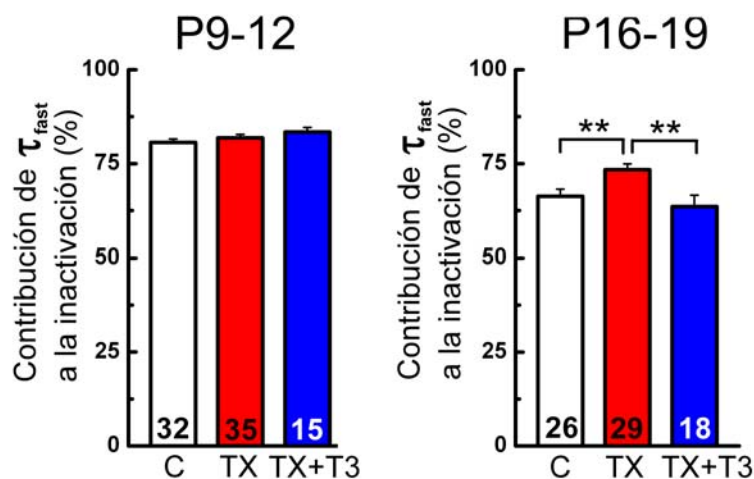
Edad	Tipo	$\tau_{fast}(ms)$	$\tau_{slow}(ms)$	Nº de células
	Control	15,67 ± 0,62	161,80 ± 7,16	32
P9-12	TX	15,45 ± 0,39	144,58 ± 4,46*	35
	TX+T3	13,71 ± 0,91 <sup>#</sup>	160,69 ± 7,09	15
	Control	21,87 ± 1,32	215,63 ± 12,59	26
P16-19	TX	18,65 ± 0,88*	181,39 ± 6,26*	29
	TX+T3	18,66 ± 1,8	259,63 ± 35,06 <sup>##</sup>	18

Constantes de tiempo de inactivación rápida ( $\tau_{fast}$ ) y lenta ( $\tau_{slow}$ ) para un voltaje de +20 mV.

TX vs. control: \*  $p < 0,05$ .

TX+T3 vs. TX: <sup>#</sup>  $p < 0,05$ ; <sup>##</sup>  $p < 0,01$ .

Como se observa en la Tabla 23 la constante de tiempo de inactivación lenta es siempre menor en las neuronas hipotiroideas que en las controles, en ambos grupos de edad, mientras que la constante rápida sólo es menor en las hipotiroideas de P16-19. El tratamiento con T3 a las ratas hipotiroideas sólo revierte a los valores controles a la constante lenta (Tabla 23). La contribución de la constante de tiempo rápida a la inactivación total es siempre mayor que la contribución de la constante lenta en todos los grupos, controles, hipotiroideos e hipotiroideos tratados (Figura 50), sobre todo en el grupo P9-12, donde el porcentaje es del 80% para  $\tau_{fast}$  y sólo del 20% para  $\tau_{slow}$ . La contribución de la  $\tau_{fast}$  presenta diferencias estadísticamente significativas en el grupo P16-19 entre controles, hipotiroideas e hipotiroideas tratadas con T3, siendo la contribución del  $66,28 \pm 0,91\%$  en controles, del  $73,42 \pm 0,51\%$  en hipotiroideas ( $p < 0,01$  vs. control) y recuperándose los valores controles tras el tratamiento con T3 ( $63,60 \pm 3,01\%$ ;  $p < 0,01$  vs. TX) (Figura 50).

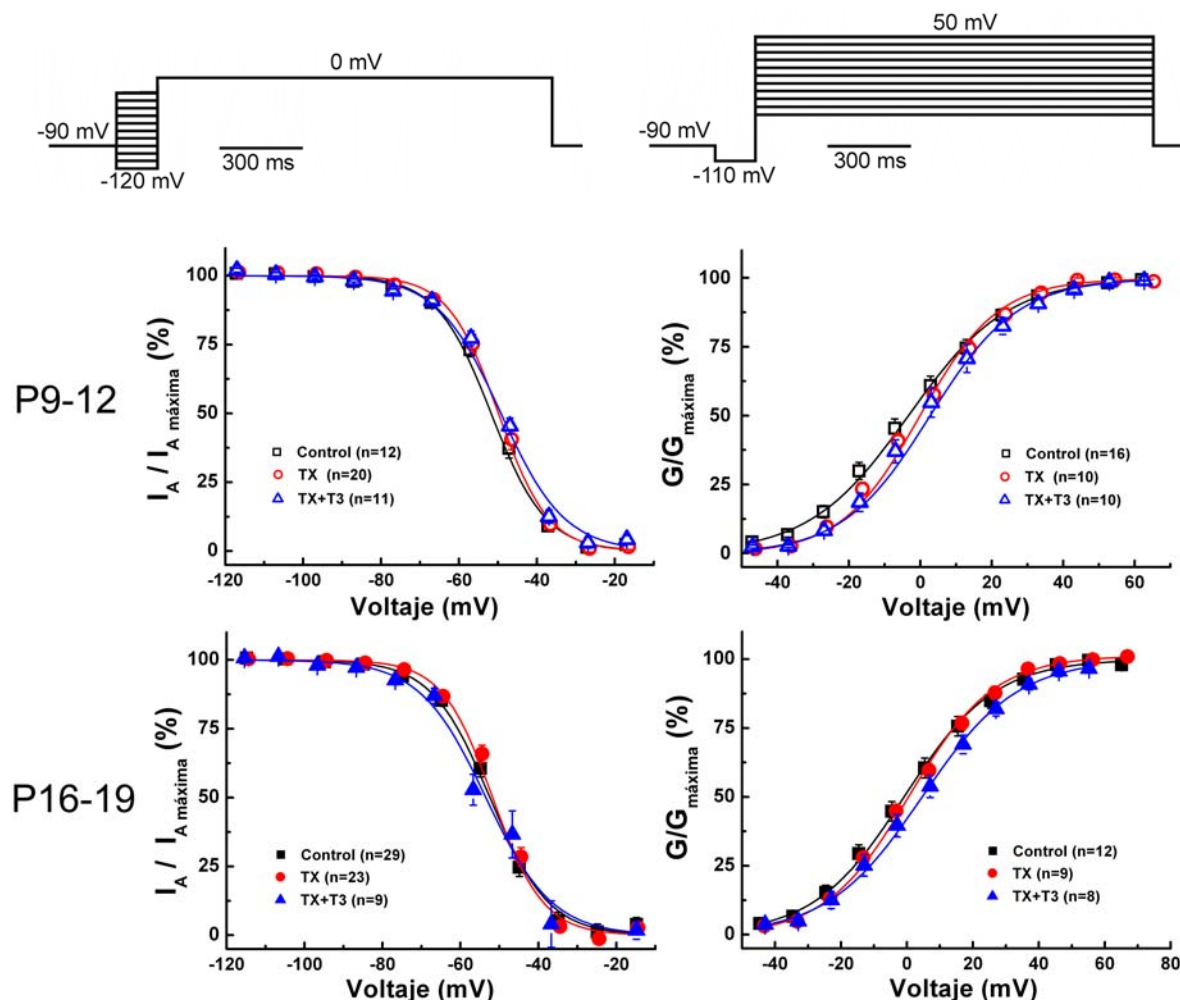


**Figura 50** . Contribución de la constante de tiempo rápida con respecto a la inactivación total de la corriente A. Gráfica de barras con los valores promedios del porcentaje de contribución de la  $\tau_{fast}$  con respecto a la inactivación total de la corriente A en neuronas controles (C), hipotiroideas (TX) e hipotiroideas tratadas (TX+T3) registradas mediante el protocolo descrito en la Figura 48. La diferencia respecto al

100% se corresponde con la contribución de la  $\tau_{slow}$  a la inactivación total de la corriente A. El número de neuronas registradas se indica en cada barra. \*\*  $p < 0,01$ .

#### 7.4. Estudio de las curvas de activación e inactivación de la corriente A

Finalmente se examinó el efecto del hipotiroidismo sobre la dependencia de voltaje de la activación e inactivación de la corriente A. La curva de activación se obtuvo a partir de la corriente A generada mediante pulsos crecientes de voltaje despolarizante de 1,5 s de duración y que se incrementan +10 mV desde -50 a +50 mV partiendo de un voltaje de -110 mV. Esta relación corriente-voltaje se normaliza respecto a la conductancia máxima, al igual que se hizo para la corriente T y D en los apartados anteriores. La curva de inactivación se obtuvo a partir de la corriente A generada mediante un pulso de voltaje despolarizante a 0 mV de 1,5 s de duración, precedido por prepulsos de 150 ms que se incrementan +10 mV desde -120 mV hasta -10 mV, normalizando la relación corriente-voltaje respecto a la corriente máxima (Figura 51). En la Figura 51 se puede apreciar que la dependencia de voltaje apenas varía, tanto en la curva de activación como en la de inactivación, entre las neuronas controles, hipotiroideas e hipotiroideas tratadas (Tablas 24 y 25). Por lo que el aumento de la densidad de corriente al pico observado en las ratas hipotiroideas no es debido a cambios en la dependencia de voltaje de los canales implicados en la generación de la corriente A.



**Figura 51.** Curvas de activación e inactivación de la corriente A aislada por farmacología. Protocolos de inactivación (arriba, izquierda) y activación (arriba, derecha) de la corriente A. Curvas de inactivación (izquierda) y activación (derecha) de neuronas controles, hipotiroideas e hipotiroideas tratadas de los dos grupos de edad. Los datos para construir la curva de activación se han obtenido a partir de la normalización con respecto a la máxima conductancia. En cada gráfica aparece su correspondiente  $V_{50}$  (voltaje de inactivación y activación medio) y  $k$  (pendiente de la curva en su punto medio). El número de neuronas registradas se indica en la leyenda entre paréntesis.

**Tabla 24.** Parámetros de la curva de inactivación de la corriente A.

Edad	Tipo	$V_{50}$ (mV)	$k$	Nº de células
P9-12	Control	$-51,74 \pm 0,57$	$7,02 \pm 0,32$	21
	TX	$-49,88 \pm 0,71$	$6,43 \pm 0,50$	20
	TX+T3	$-49,24 \pm 0,73$	$8,13 \pm 0,41$	11
P16-19	Control	$-52,43 \pm 0,73$	$7,51 \pm 0,44$	29
	TX	$-51,75 \pm 0,59$	$6,49 \pm 0,32$	23
	TX+T3	$-53,47 \pm 1,73$	$8,47 \pm 1,05$	9

**Tabla 25.** Parámetros de la curva de activación de la corriente A.

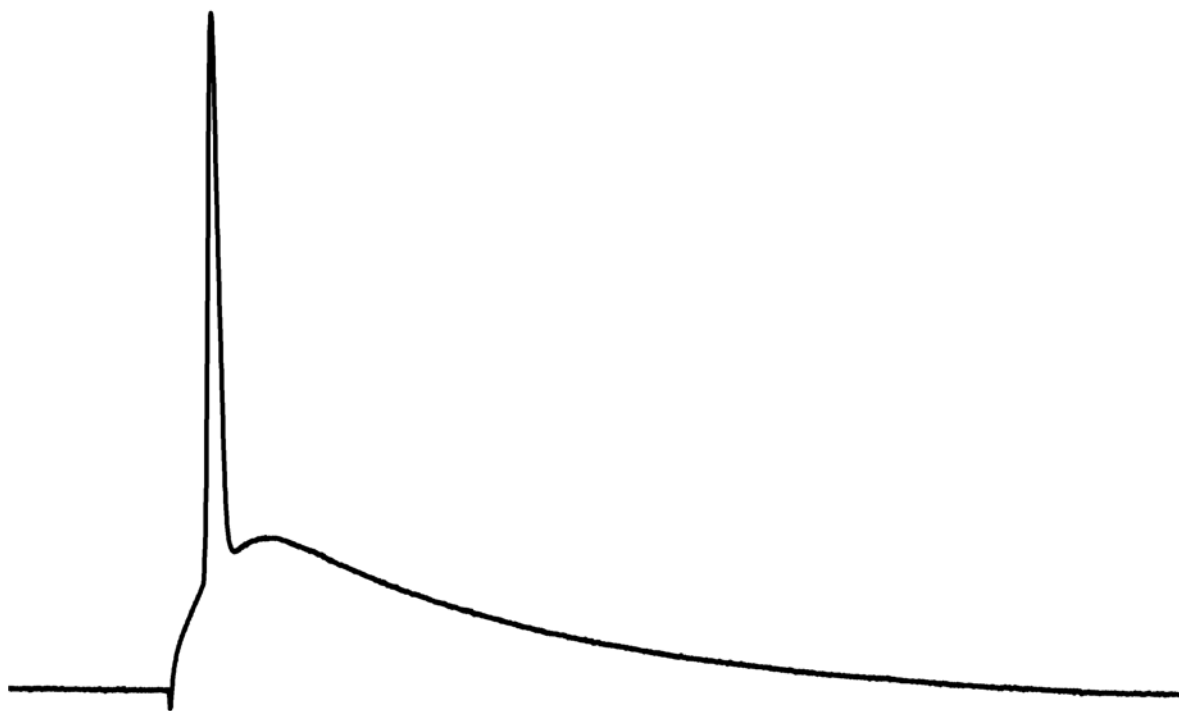
Edad	Tipo	V <sub>50</sub> (mV)	k	Nº de células
P9-12	Control	-3,34 ± 1,04	13,91 ± 0,86	16
	TX	-0,21 ± 0,71	11,02 ± 0,52	20
	TX+T3	2,65 ± 1,14	12,20 ± 0,68	10
P16-19	Control	-0,86 ± 1,14	13,68 ± 1,00	12
	TX	0,69 ± 0,63	12,82 ± 0,58	9
	TX+T3	4,58 ± 1,49	14,35 ± 1,46	8

### 7.5. Estudio de la corriente A durante el desarrollo

Durante las primeras semanas postnatales la corriente A tiene una gran importancia funcional (Spigelman et al, 1992), según avanza el desarrollo esta corriente disminuye y otras corrientes de potasio incrementan su expresión (Klee et al., 1995). En los resultados (Figura 47 y 49) no se observan diferencias estadísticamente significativas en la densidad de corriente A al pico con el desarrollo ni en el grupo control ni en el hipotiroideo. Sí existe en los animales controles una tendencia a que la corriente A disminuya con la edad, y por el contrario, a que aumente en los animales hipotiroideos, probablemente debido a un retraso en la maduración de los animales hipotiroideos, lo cual puede repercutir en una aparición tardía de la máxima densidad de corriente A y de su posterior disminución. Por otro lado, las dos constantes de inactivación de la corriente A aumentan de forma muy significativa durante el desarrollo (Tabla 23,  $p < 0,001$  para todos los valores comparando P9-12 vs P16-19), tanto en el grupo control como en el hipotiroideo, pero la voltaje dependencia de la corriente no parece verse alterada entre P9 y P19 (Figura 51, Tablas 24 y 25).

**Implicaciones funcionales de estos resultados:** La densidad de corriente A de las neuronas hipotiroideas frente a las controles se encuentra aumentada, sobre todo en el grupo de edad P16-19, y tras la administración de hormona tiroidea se recuperan los valores controles (Figuras 47 y 49). Este aumento no se debe ni a un cambio en la dependencia del voltaje de la corriente A (Figura 51) ni a los cambios en sus cinéticas de inactivación (Tabla 23). Estos resultados podrían estar relacionados con los previamente descritos en animales hipotiroideos, como la disminución de la excitabilidad intrínseca (Figura 27) o los cambios en los parámetros del potencial de acción (Tabla 15).

## 5. DISCUSIÓN



Los cambios en la excitabilidad intrínseca neuronal son cruciales durante el desarrollo de los patrones de disparo y en el establecimiento de ritmos neuronales que son la base del procesamiento cognitivo (Leung y Yim, 1991; Hu et al., 2002; 2009). Además, se sabe que los paradigmas de condicionamiento clásicos provocan un aumento a largo plazo de la excitabilidad neuronal en las neuronas de CA1 (Moyer et al., 1996; Oh et al., 2003). A lo largo de la tesis se demuestra que el déficit de hormona tiroidea altera la excitabilidad intrínseca de dos formas antagónicas o contrarias. Por un lado, incrementa la excitabilidad a través de las propiedades pasivas de membrana (aumento de la resistencia, disminución de la capacidad y despolarización del potencial de membrana) y por otro lado la disminuye a través de las propiedades activas (aumento de la corriente A, disminución de la corriente T y disminución de la corriente de sodio voltaje-dependiente). Estos datos revelan nueva información de gran importancia para entender los déficits cognitivos que causa la ausencia congénita de la hormona tiroidea, planteando que alguno de los problemas de aprendizaje asociados al hipotiroidismo pudieran estar relacionado con los cambios en la excitabilidad intrínseca descritos en esta tesis.

## **1. El Hipotiroidismo altera las propiedades de membrana en reposo**

Se conoce desde hace tiempo que la hormona tiroidea juega un papel crucial en el desarrollo neuronal, Nicholson y Altman (1972) pusieron de manifiesto que las neuronas de las ratas hipotiroideas son más pequeñas, se encuentran más empaquetadas y presentan un árbol dendrítico menos desarrollado con alteración de sus espinas dendríticas. Por ello, primero se realizó un estudio con el fin de caracterizar y diferenciar los efectos del hipotiroidismo sobre las propiedades pasivas de membrana, de los causados a través de mecanismos activos.

### **1.1. Despolarización del potencial de membrana en reposo**

En los resultados se ha puesto de manifiesto que el potencial de membrana de las neuronas piramidales del área CA1 de las ratas hipotiroideas se encuentra más despolarizado en reposo que el de las ratas controles. A continuación se discutirán las posibles corrientes implicadas:

**Corrientes de sodio y potasio.** El potencial de la membrana en reposo depende principalmente de la permeabilidad de los canales de potasio y de sodio y de los potenciales de equilibrio de dichos iones. Si nos atenemos a la ecuación de Goldman para el potencial de membrana en reposo, observamos que una disminución de la permeabilidad de la membrana al potasio conllevaría una menor contribución relativa de este ión al potencial de reposo de la membrana, el cual derivaría hacia valores más despolarizados. Existen varias posibilidades que podrían explicar una menor permeabilidad al potasio y, por consiguiente, un potencial de membrana en reposo más despolarizado, como son una reducción del número de canales por unidad de superficie de membrana o una menor conductancia de dichos canales.

$$V_m = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K [K]_o + P_{Na} [Na]_o + P_{Cl} [Cl]_i}{P_K [K]_i + P_{Na} [Na]_i + P_{Cl} [Cl]_o} \quad \text{Ecuación de Goldman}$$

Aunque en esta tesis no se ha realizado un estudio de los canales de sodio y potasio que intervienen en el mantenimiento del potencial de membrana en reposo, sí se ha observado que las diferencias en el potencial de membrana que aparecen entre controles e hipotiroideas en las células registradas en rodaja (Tabla 3) desaparecen cuando se registran células disociadas (Tabla 8). Como la medición del potencial de membrana en reposo de las neuronas disociadas se realizó con TEA en el líquido intracelular (Tabla 2) que bloquea una gran variedad de corrientes de potasio de forma inespecífica (Hille, 2001), es lógico suponer que estas corrientes sensibles a TEA puedan intervenir en las diferencias observadas entre el potencial de membrana en reposo de las neuronas registradas en rodaja de las ratas hipotiroideas con respecto a las controles, ya que al bloquearse en los registros de las neuronas disociadas las diferencias en el potencial de membrana en reposo desaparecen.

**Corrientes de fuga.** El potencial de reposo de la membrana celular depende en gran medida de las conductancias voltaje-independientes presentes, siendo la principal de ellas una conductancia de potasio (Lamas et al., 2002). Estas conductancias voltaje-independientes, también llamadas corrientes de fuga (*leakage*) o de fondo (*background*), cuya existencia fue postulada por Hodgkin y Huxley (1952), constituyen un determinante principal del potencial de membrana en reposo y de la resistencia de membrana, dos elementos clave de la excitabilidad neuronal. Los canales de las corrientes de fuga presentan una estructura molecular de 4 dominios transmembrana con dos regiones de poro (K2P, *two-pore domain K+ channel*) (Lesage y Lazdunski, 2000), son selectivos para el potasio y codificados por 15 genes de la familia KCNK que se subdividen en 6 subfamilias basadas en secuencias

similares: TWIK, TREK, TASK, TALK, THIK y TRESK. Los canales K2P, además de mantener el potencial de membrana en reposo y regular la excitabilidad, están implicados en otras funciones celulares, tales como: el transporte de iones, la regulación del volumen celular, la regulación metabólica y la apoptosis (Lotshaw, 2007). Los canales K2P, presentan muy poca voltaje o tiempo dependencia, se encuentran abiertos en reposo y nunca se inactivan (Patel y Honoré, 2001; Lesage, 2003). Una disminución de la expresión o de la conductancia de los canales K2P podría ser responsable de la despolarización del potencial de membrana en reposo en las neuronas hipotiroideas, de modo similar a lo que ocurre cuando estos canales se encuentran bloqueados farmacológicamente o a través de regulación por segundos mensajeros (Millar et al., 2000).

**Corrientes H y M.** La cooperación de las corrientes M (corriente de potasio activada por despolarización) y H (corriente catiónica activada por hiperpolarización) es importante en la estabilización del potencial de membrana en reposo (Halliwell y Adams, 1982). La corriente M hiperpolariza la membrana cuando se despolariza, mientras que la H la despolariza cuando se hiperpolariza (Hu et al., 2002; Storm, 1990). Por tanto, cabe la posibilidad de que el hipotiroidismo pudiera estar afectando a alguna de estas dos corrientes voltaje-dependientes, bien reduciendo la corriente M o bien aumentando la corriente H.

**Bomba  $Na^+/K^+$ .** También contribuye a fijar el valor del potencial de membrana en reposo la bomba  $Na^+/K^+$  (Lamas et al., 2002). Dado que en el hipotiroidismo se encuentra alterada la expresión de las dos formas moleculares de la  $Na^+/K^+$  ATPasa de la membrana plasmática (Schmitt y McDonough, 1988), no se puede descartar la posible implicación de esta bomba en las alteraciones detectadas.

## 1.2. Aumento de la resistencia y disminución de la capacidad de membrana

Las neuronas piramidales del hipocampo de rata sufren considerables cambios en sus propiedades electrofisiológicas y morfológicas durante el primer mes de desarrollo postnatal. Así se ha observado un incremento en el diámetro de su soma, en el grado de arborización dendrítica (Schwartzkroin et al., 1981; Rami et al., 1986; Oppenheimer y Schwatz, 1997) y en sus conexiones sinápticas (Pokorny y Yamamoto, 1981). Estos cambios morfológicos conllevan una disminución en la resistencia durante este periodo (Spigelman et al., 1992), ya que la resistencia de membrana está inversamente relacionada con el tamaño de su superficie.

Similares resultados a lo largo del desarrollo se describen en esta tesis, en la que se muestra claramente que la resistencia de membrana disminuye y la capacidad de membrana aumenta durante las primeras semanas postnatales en las neuronas controles e hipotiroideas registradas en rodaja. Sin embargo, existe un retraso en la maduración de estos parámetros en ausencia de la hormona tiroidea, de modo que las neuronas hipotiroideas presentan una resistencia de membrana mayor y una capacidad menor con respecto a las controles. Además, los valores en las neuronas hipotiroideas no se igualan a los de las controles a lo largo de la maduración, ya que las ratas hipotiroideas adultas presentan cuerpos celulares más pequeños y una menor arborización dendrítica (Oppenheimer y Schwartz, 1997; Chan y Kilby, 2000). En este sentido, estudios de Rami *et al.* (1986b) muestran una reducción en el volumen del soma de las neuronas del hipocampo de ratas hipotiroideas, además de una disminución en el número y ramificación de sus dendritas. Puesto que esto conlleva una disminución de la superficie total de la membrana, es lógico pensar que el aumento de resistencia observado en las neuronas de las ratas hipotiroideas pueda deberse a este motivo. Además, la disminución de la superficie de membrana se relaciona de forma directa con la capacidad de membrana que, como se ha descrito en los resultados de esta tesis, se encuentra disminuida en las células hipotiroideas, apoyando esta hipótesis. Por otra parte, otro factor que conduce a aumentar la resistencia de la membrana es la disminución en el número o conductancia de los canales de membrana. En este sentido, las neuronas hipotiroideas presentan mayor resistencia específica de membrana que las controles, como se calcula al dividir la resistencia (Tabla 4) entre la capacidad de membrana (Tabla 6).

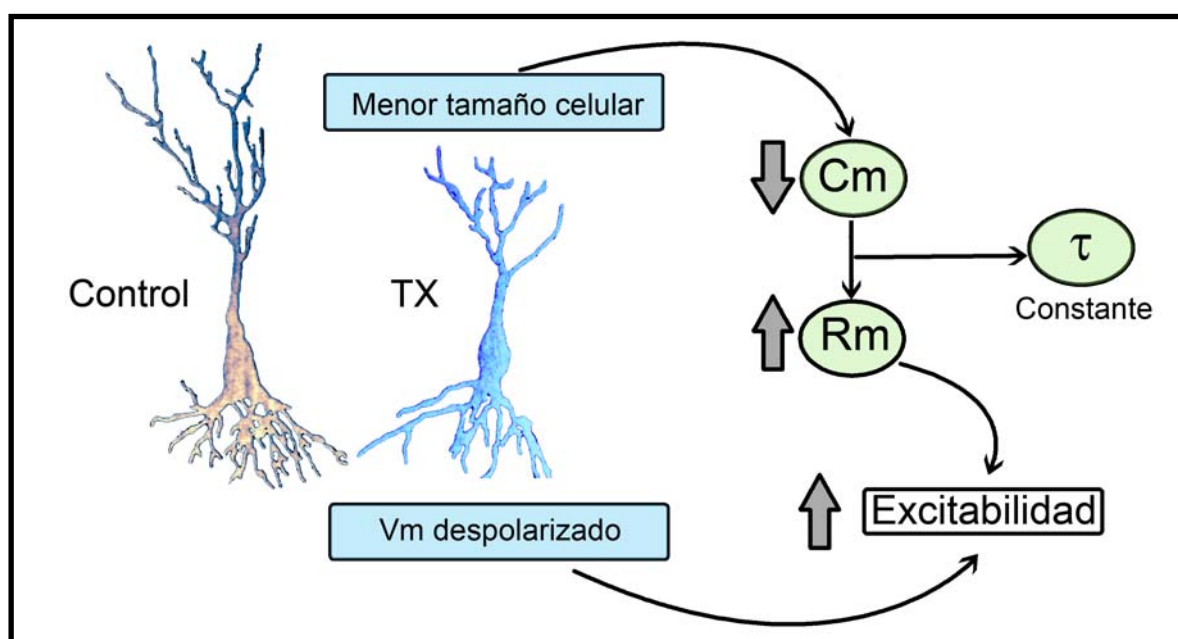
### 1.3. La constante de tiempo de membrana no varía

Spigelman *et al.* (1992) demostraron que la constante de tiempo de membrana disminuye durante el primer mes de vida postnatal en las neuronas de CA1 del hipocampo de rata. Los resultados de esta tesis corroboran que esta constante disminuye desde P9 a P19, tanto en los registros de neuronas en rodajas como en los de disociadas de animales controles e hipotiroideos. Sin embargo, la constante de tiempo de membrana es similar entre las neuronas controles e hipotiroideas (Tabla 5), a pesar de que las hipotiroideas presentan mayor resistencia y menor capacidad de la membrana con respecto a las controles (Tablas 4 y 6). Aparentemente los cambios en la resistencia membrana se contrarrestan con los cambios capacitivos, sugiriendo la presencia de algún tipo de mecanismo homeostático que regula el ajuste entre el tamaño y la forma de los procesos

neuronales y sus específicas propiedades pasivas y activas de membrana. La importancia fisiológica de que las constantes de tiempo de membrana sean similares en ambos grupos radica en que el tiempo que la membrana necesita para cambiar el voltaje ante un pulso de corriente es igual, y por lo tanto, las oportunidades de inactivación de las corrientes transitorias serán las mismas.

#### 1.4. Efectos sobre la excitabilidad neuronal

Los cambios de las propiedades de membrana en reposo de las neuronas hipotiroideas aumentan su excitabilidad intrínseca. Así, el aumento de la resistencia de membrana (Tabla 4) justifica que ante una misma inyección de corriente las neuronas hipotiroideas se despolaricen más y generen mayor número de potenciales de acción que las controles (Figuras 24 y 25). Además, hay que considerar que el potencial de membrana en reposo se encuentra más despolarizado en ausencia de hormona tiroidea.



**Figura 52.** Esquema de los efectos del hipotiroidismo sobre las propiedades de membrana en reposo y su relación con la excitabilidad intrínseca. La imagen de las células ha sido adaptada de Rami et al., 1986.

## **2. Elementos responsables de las alteraciones en el patrón de disparo en las neuronas hipotiroideas**

Los procesos cognitivos están regulados en gran parte por las secuencias de los eventos sinápticos y por la excitabilidad intrínseca de las neuronas que codifican y comunican las señales siguiendo patrones de comportamiento que determinan los disparos neuronales. Durante la última década muchos estudios han demostrado cómo la ausencia de hormona tiroidea afecta a la transmisión sináptica del hipocampo en múltiples niveles, incluyendo efectos presinápticos sobre la liberación de neurotransmisor (Vara et al., 2002; Sui y Gilbert, 2003) y alteraciones plásticas presinápticas a corto plazo y postsinápticas a largo plazo (Vara et al., 2002; 2003; Gerges y Alkadhi, 2004; Fernández-Lamo et al., 2009). A pesar de estos conocimientos poco se conoce sobre los efectos del hipotiroidismo congénito sobre la excitabilidad intrínseca de las neuronas y su impacto sobre el comportamiento de disparo.

### **2.1. Importancia del disparo en ráfaga**

El cambio en el patrón de disparo altera drásticamente el procesamiento de las aferencias por parte de las neuronas (Magee y Carruth, 1999). Existen evidencias de que los potenciales de acción disparados en ráfaga pueden ser unidades de información más importantes que los potenciales de acción únicos (Lisman, 1997). Además, se ha sugerido que la importancia del disparo en ráfaga radica en la consolidación de nuevas memorias, proceso en el cual el hipocampo es una estructura fundamental (Buzsaki, 1989; Cattaneo et al., 1981). La ausencia congénita de hormona tiroidea altera el comportamiento de disparo neuronal durante las primeras semanas de desarrollo postnatal, retrasando la aparición del patrón de disparo en ráfaga y disminuyendo el número de los potenciales de acción por ráfaga (Figuras 19, 22 y 23). Por otra parte, este patrón de disparo regula tanto el procesamiento como el almacenaje de la información neuronal (Magee y Carruth, 1999). Puesto que el hipotiroidismo experimental en ratas neonatas provoca deficiencias en el aprendizaje (Hashimoto et al., 2001), parte de estas deficiencias pueden estar causadas por las alteraciones en el patrón de disparo en los animales hipotiroideos (Figura 19). Los posibles responsables de las diferencias en el patrón de disparo entre neuronas controles e hipotiroideas pueden ser debidas a:

- Cambios en la morfología del potencial de acción que influyan en la capacidad de la neurona para disparar con determinado patrón de disparo.
- Cambios en la morfología de la despolarización postpotencial.

## **2.2. La morfología del potencial de acción no está implicada en las diferencias en el patrón de disparo**

Las neuronas hipotiroideas presentan diferencias en la morfología del potencial de acción con respecto a las controles cuando el voltaje de fijación es de -80 mV y no cuando es de -60 mV (Tablas 19 y 20). Sin embargo, el porcentaje de neuronas que disparan en ráfaga es menor para las neuronas hipotiroideas que para las controles, en ambos voltajes de fijación (Figura 19). Por lo tanto, las corrientes voltaje-dependientes responsables de la morfología no están directamente implicadas en las alteraciones del patrón de disparo descritas.

## **2.3. La despolarización postpotencial es también implicada en las diferencias en el patrón de disparo**

**ADP y disparo en ráfaga.** Los cambios en la despolarización postpotencial del potencial de acción están implicados en la aparición del disparo en ráfaga durante el desarrollo de las neuronas piramidales de CA1 (Jensen et al., 1994; 1996; Chen et al., 2005; Schorge y Walter, 2009; Jarsky et al., 2008). Existe una cierta discrepancia en los mecanismos iónicos responsables del ADP y cuál de ellos prevalece sobre los demás. Hay estudios que sugieren que la corriente persistente de sodio es la responsable (Azouz et al., 1996), otros que la más importante es la corriente de calcio de bajo umbral (Hoffman et al., 1997), mientras que Brown y Randall (2009) han visto como la activación de la corriente M disminuye el ADP. Teniendo en cuenta que la activación de la corriente de calcio sensible a níquel genera el disparo en ráfaga (Williams y Stuart, 1999) la Figura 33 indica que en ausencia de hormona tiroidea la responsable de los cambios en el ADP y en el patrón de disparo es la corriente de calcio de bajo umbral,

**Corriente persistente de sodio.** La Figura 33 indica que el bloqueo de la corriente persistente de sodio apenas afecta la morfología del ADP, resultados similares han sido

descritos por otros autores (Metz et al., 2005). Por lo que esta corriente no parece influir demasiado en el ADP, al menos en las neuronas piramidales de CA1 durante estas primeras semanas postnatales.

**Corriente M de potasio.** El efecto de esta corriente sobre la morfología del ADP, según los resultados obtenidos de su bloqueo con linopiridina, es escaso y parecido al provocado por la corriente persistente de sodio en cuanto a la magnitud del efecto (Figura 33). Es posible que el efecto moderado de la corriente M sobre la morfología del ADP esté relacionado con la expresión durante el desarrollo del canal Kv7, responsable de la corriente M. La subunidad Kv7.2 está muy poco expresada en células piramidales inmaduras de CA3 y aumenta su expresión posteriormente (Safiulina *et al.*, 2008), al ser una corriente que se opone al ADP, esto favorecería la aparición del patrón de disparo en ráfaga durante las primeras semanas postnatales. El aumento en la expresión de Kv7 y el de la corriente M tras los primeros días postnatales explicaría que el patrón de disparo en ráfaga en el hipocampo se reduzca a partir del día 20 postnatal (Chen et al., 2005).

**Corriente T de calcio.** Los resultados obtenidos por el bloqueo con níquel (Figura 33) señalan a la corriente de bajo umbral de calcio como la principal causante de las diferencias observadas en la morfología del ADP entre controles e hipotiroideas. De hecho, la aplicación de níquel produjo mayor disminución en el ADP que el resto de los bloqueantes y además, los efectos del mismo son mayores en los animales hipotiroideos que en los controles. Aunque farmacológicamente, cuando se bloquea con níquel no se pueden diferenciar los canales de calcio de tipo T y R, es más probable que los canales responsables del cambio en el ADP sean los de tipo T, dado el bajo umbral de activación y las lentas cinéticas de desactivación de los mismos respecto a los R (Randall y Tsien, 1997; Su et al., 2002) Además, las neuronas hipotiroideas registradas presentan menor densidad de corriente T (Figura 37), lo que sugiere que esta sea responsable de las diferencias en el ADP y en el patrón de disparo.

**Corrientes A y D de potasio.** Otras corrientes de potasio además de la M pueden estar disminuyendo la despolarización postpotencial, como se sugiere en el trabajo de Metz *et al.* (2005). La corriente A es improbable que puedan influir en el ADP debido a su rápida inactivación, la importancia de la misma en relación al disparo en ráfaga se encontraría más en la modulación de la propagación retrógrada de los potenciales de

acción dendríticos (Magee y Carruth, 1999). Por otro lado la corriente D según el trabajo de Metz et al. (2007) solo influiría en el inicio o primeros milisegundos del ADP.

En resumen, la disminución en la densidad de las corrientes T y D en los animales hipotiroideos explicaría la diferente morfología del ADP de las neuronas BS. En concreto, las neuronas hipotiroideas BS presentan un ADP de mayor amplitud y de menor duración que las controles (Figura 31). La disminución en la densidad de corriente D contribuiría al aumento de la amplitud al pico del ADP, considerando que el pico se produce cuando esta corriente aún está activa (primeros milisegundos del ADP). La disminución en la densidad de corriente T contribuiría a disminuir la duración del ADP.

#### **2.4. Modelo para la generación del disparo en ráfaga**

Siguiendo el modelo de la generación de disparo en ráfaga propuesto por Magee y Carruth (1999), la corriente transitoria de potasio (fundamentalmente la corriente A) regularía el disparo de potenciales de acción de las neuronas piramidales de CA1 modulando la propagación de los potenciales de acción dendríticos hacia el soma. La reducción de la corriente A permitiría a los potenciales de acción dendríticos activar canales de calcio (fundamentalmente de tipo T y R) que aumentarían sustancialmente la duración de los mismos. Así mismo, las corrientes de calcio se propagan al soma generando un ADP capaz de iniciar múltiples potenciales de acción somáticos y axonales. Este proceso estaría regulado por una intrincada relación entre los principales canales iónicos dependientes de voltaje ( $K^+$ ,  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$ ), por lo tanto la inducción del patrón de disparo en ráfaga dependería de todos ellos. El modelo propuesto por Magee y Carruth permite explicar las diferencias en el patrón de disparo de los animales hipotiroideos. Así, el aumento de la densidad de corriente A y la reducción de la densidad de corriente T descritas en este trabajo y la reducción de la corriente de  $Na^+$  descrita por Potthoff y Dietzel (1997) justifica que los animales hipotiroideos tengan más dificultades para expresar el patrón de disparo en ráfaga y que su excitabilidad intrínseca se encuentre disminuida.

**Importancia funcional.** Durante el desarrollo postnatal las neuronas presentan diferentes patrones de descarga que son esenciales para la correcta maduración del sistema

nervioso (Chen et al., 2005). Así, al disparo en ráfaga se le atribuyen varias funciones. Por un lado, es una forma específica de codificación a través de: la duración de la ráfaga, el número de espigas por ráfaga o/y la frecuencia de las mismas (Harris et al., 2001; Kepecs et al., 2002). Por otro lado, está implicado en la modulación de la eficacia sináptica (Harris et al., 2001; Brumberg et al., 2000). Además, uno de los mejores modelos celulares del aprendizaje asociativo, la *spike-timing dependent plasticity*, depende de la coordinación temporal entre la propagación retrógrada de los potenciales de acción y la actividad sináptica que afectan a los circuitos relacionados con el aprendizaje (Froemke y Dan, 2002; Froemke et al., 2007; Wang et al., 2005), estos eventos plásticos deben tener lugar en una estrecha ventana de tiempo entre la propagación del potencial de acción y la entrada sináptica (Caporale y Dan, 2008). Parece razonable esperar que diferencias en la forma de disparo, como el disparo en ráfaga de potenciales de acción, puedan afectar a la duración de esta ventana y/o la extensión de la *spike-timing dependent plasticity* (Kampa et al., 2006; Froemke et al., 2006; 2007). Por lo tanto, las neuronas hipotiroideas podrían tener problemas en cualquiera de estas funciones, al presentar alteraciones en el patrón de disparo en ráfaga.

### **3. Alteraciones en la excitabilidad neuronal y su relación con la morfología del potencial de acción**

*Excitabilidad intrínseca.* Se ha sugerido que la maduración postnatal de la excitabilidad intrínseca coincide e interactúa con el desarrollo de programas o procesos que conllevan crecimiento neuronal de axones y dendritas, así como con el desarrollo de las conexiones sinápticas (Moody, 1998). Los resultados de esta tesis indican que la deficiencia de hormona tiroidea reduce la excitabilidad intrínseca: despolariza el umbral de disparo, disminuye la frecuencia de descarga ante la misma pendiente de voltaje y aumenta la densidad de corriente A. Por otra parte, la menor excitabilidad de los animales menos desarrollados (Figura 27) también se puede relacionar con el incremento de la corriente A en estos estadios.

*Frecuencia máxima de descarga.* La excitabilidad en los animales hipotiroideos está aumentada en respuesta a un pulso de intensidad fija, debido a la mayor resistencia de

membrana (Figura 25) y está disminuida debido a su patrón de disparo (Figura 19) y a su respuesta ante una pendiente de voltaje similar (Figura 27). Independientemente de estos resultados los animales más jóvenes e hipotiroideos presentan menor frecuencia máxima de descarga y alcanzan antes la saturación, como se aprecia en las curvas de entrada-salida de las Figuras 25 y 27. Estos resultados indican que el máximo número de potenciales de acción que pueden disparar los animales más jóvenes por unidad de tiempo es menor que los más adultos, así como también es menor en los animales hipotiroideos respecto a los controles. La limitación de la frecuencia máxima de descarga podría estar relacionada con la expresión de los canales de corriente A, puesto que dicha corriente juega un papel muy importante en la regulación del disparo repetitivo (Connor y Stevens, 1971). Asimismo, y relacionado con los resultados de esta tesis, Kim *et al.* (2005) han demostrado que la frecuencia de disparo se reduce tras una sobreexpresión del canal Kv4.2. y otros investigadores han puesto de manifiesto que la función de la corriente A es mayor en las neuronas inmaduras con respecto al resto de las corrientes repolarizantes de potasio (Spigelman *et al.*, 1992; Klee *et al.*, 1995). Por tanto, una posible causa de que las neuronas hipotiroideas presenten una mayor densidad de corriente A sería debido a la inmadurez de estas neuronas frente a las controles. Además, esto explicaría que la frecuencia de descarga para una misma pendiente de voltaje sea menor en las hipotiroideas (Figura 27).

### **3.1. La morfología del potencial de acción se encuentra alterada en el hipotiroidismo**

**Corrientes de sodio.** Las neuronas tienen múltiples canales dependientes de voltaje que se activan durante la generación de un potencial de acción y cuya activación e inactivación a voltajes subumbrales modula la frecuencia de disparo. La deficiencia de hormona tiroidea causa alteraciones en algunas de las características de los potenciales de acción de las neuronas piramidales del hipocampo, tales como las velocidades de despolarización y repolarización, la amplitud, el umbral y la duración (Figura 28 y Tabla 15). Varias corrientes podrían estar implicadas en estas diferencias. Por un lado, que las neuronas hipotiroideas tengan un umbral de disparo más despolarizado y una menor velocidad de despolarización puede deberse a una disminución en la densidad de los canales dependientes de voltaje de sodio (Hodgkin y Huxley, 1952; Carter y Bean, 2009). En relación con esta hipótesis en el trabajo de Hoffmann y Dietzel (2004) se muestra cómo

la ausencia de hormona tiroidea en cultivos primarios de hipocampo provoca una disminución de las corrientes de sodio voltaje-dependientes. Por otro lado, las diferencias en la duración del potencial de acción y en su velocidad de repolarización de las neuronas hipotiroideas se pueden deber a un aumento en las corrientes de potasio que intervienen en esta repolarización, como son las corrientes A y D (Storm, 1987; Sah, 1996; Mitterdorfer y Bean, 2002). Además los canales responsables de las corrientes A y D se encuentran activos a potenciales de membrana subumbrales (Mitterdorfer y Bean, 2002), por lo que un incremento en estas corrientes también puede contribuir en la despolarización del umbral de disparo junto con la disminución de las corrientes de sodio.

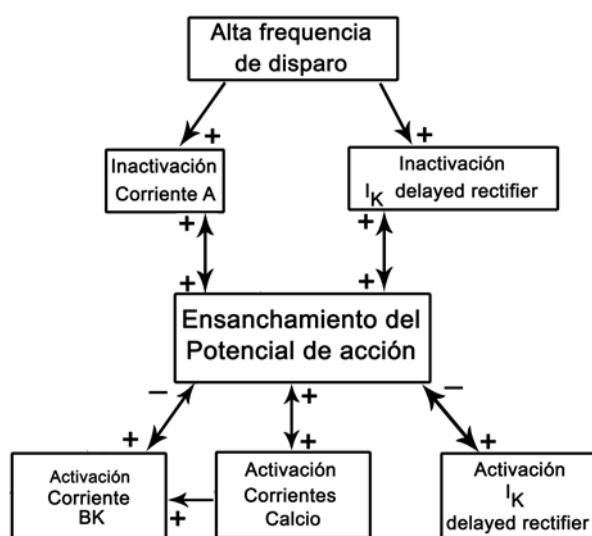
**Corriente A.** Los resultados de esta tesis demuestran que la parcial inactivación de la corriente A (potencial de acción inducido por un pulso largo de baja intensidad) disminuye las diferencias en la duración y elimina las diferencias en la velocidad de repolarización de los potenciales de acción entre animales controles e hipotiroideos descritas cuando la corriente A no está parcialmente inactiva (potencial de acción inducido por un pulso corto de alta intensidad) (Tabla 15 vs. 16). Estos datos sugieren que el incremento de la densidad de corriente A inducido por la ausencia de hormona tiroidea, está muy relacionado con las diferencias en la duración y velocidad de repolarización del potencial de acción. De hecho, los resultados publicados en este laboratorio empleando técnicas de Western blot (Sanchez-Alonso et al., 2012) confirman que la expresión de los canales Kv4.2 y Kv4.3 es mayor en el área CA1 del hipocampo de las ratas hipotiroideas. Por otro lado, los efectos de la corriente A sobre la velocidad de repolarización y duración del PA son más relevantes en los animales inmaduros, con respecto a otras corrientes de potasio, puesto que la inactivación parcial de la misma provoca cambios mayores en el grupo P9-12 con respecto al grupo P16-19 (Figura 29). Spigelman *et al.* (1992) obtuvieron resultados similares en las neuronas inmaduras del hipocampo, es decir, mayor participación de la corriente A sobre la repolarización del PA con respecto al resto de corrientes repolarizantes. Esta explicación sobre los cambios en los parámetros del potencial de acción concuerda con los resultados empleando técnicas de Western blot (Sanchez-Alonso et al., 2012), en los que se pone de manifiesto que la expresión de los canales Kv4.2 y Kv4.3 es mayor en el área CA1 de las ratas más inmaduras. Coincidiendo con los trabajos de otros autores que argumentan que la expresión de la corriente A disminuye con la edad, mientras que la expresión de otras corrientes de potasio aumentan (Klee et al., 1995).

**Corriente D.** Aunque la corriente D de potasio puede influir en la repolarización del potencial de acción (Storm, 1987), los resultados de esta tesis indican que su disminución en los animales hipotiroideos frente a los controles no se relaciona con las diferencias en la morfología del potencial de acción y en la frecuencia de descarga. Al contrario de lo que ocurre con la corriente A y la expresión de sus canales, la expresión del canal Kv1.2 responsable de la corriente D de potasio aumenta desde P9-12 a P16-19 (Sánchez-Alonso et al., 2012). Sin embargo, la disminución de la corriente D en los animales hipotiroideos a P9-12 (Figura 42), está enmascarada por el aumento de la corriente A (Figuras 47 y 49), lo que justifica el aumento en la velocidad de repolarización del potencial de acción. Similares resultados obtuvieron Martina *et al.* (1998), quienes concluyeron que la mayor parte de las neuronas piramidales de CA1 expresan el mRNA de Kv4 (89%), entre P11-16, mientras que solo un 33% de ellas expresan el mRNA de Kv1.2. Todos estos resultados ponen de manifiesto la importancia de la corriente A frente a la corriente D durante este periodo de desarrollo postnatal.

### **3.2. El *broadening* aumenta en ausencia de hormona tiroidea y disminuye durante el desarrollo**

El ensanchamiento de los potenciales de acción o *broadening* durante el disparo repetitivo es un fenómeno generalizado en los somas y dendritas de las células nerviosas (Aldrich et al., 1979; Gainer et al., 1986; Jackson et al., 1991; Andreasen y Lambert, 1995; Ma y Koester, 1996). En el trabajo de Kim *et al.* (2005) se demuestra cómo la sobreexpresión del canal Kv4.2 conlleva un aumento de este fenómeno en neuronas piramidales de CA1 del hipocampo, aumentando la duración media de los potenciales de acción durante un disparo repetitivo. La relación entre la corriente A y el *broadening* permite explicar parte de los resultados obtenidos sobre este fenómeno. En ausencia de hormona tiroidea la expresión de los canales responsables de la corriente A es mayor que en las neuronas controles (Sánchez-Alonso et al., 2012) y consecuentemente el *broadening* también, aumentando más la duración de los potenciales de acción en las neuronas hipotiroideas con respecto a las controles durante el disparo repetitivo, sobre todo en el grupo P9-12 como se aprecia en la Figura 30. Durante el desarrollo se observa que el *broadening* es más acusado en los animales más jóvenes, alterándose más los parámetros del potencial de acción durante el disparo repetitivo en el grupo P9-12 que en el grupo

P16-19 (Figura 30). Esta diferencia puede estar causada por dos motivos. Por un lado, como ya se ha comentado, en las neuronas inmaduras la función de la corriente A es mayor con respecto al resto de las corrientes repolarizantes de potasio. (Spigelman et al., 1992; Klee et al., 1995). Por otro lado, los canales BK de potasio dependientes de calcio, que en animales adultos contribuyen significativamente a la repolarización y facilitan el aumento de la frecuencia de descarga (Storm, 1987; Shao et al., 1999; Gu et al., 2007), no colaboran en la repolarización del potencial de acción en neuronas jóvenes, como se describe en los trabajos de Mitterdorfer y Bean (2002) cuando eliminan el calcio extracelular. Por lo tanto, siguiendo el modelo de Ma y Koaster (1996) sobre el mecanismo del *broadening* (Figura 53) se plantean dos situaciones: en el grupo P9-12, los canales de corriente A serían predominantes sobre los demás, con muy poca participación de los canales BK, fomentando un aumento del *broadening*; en el grupo P16-19, la relevancia de la corriente A en la repolarización del potencial de acción decrece, mientras que se incrementa significativamente la contribución de los canales BK, disminuyendo de este modo el ensanchamiento de los potenciales de acción durante el disparo repetitivo.



**Figura 53** . Resumen de las principales corrientes que intervienen en el fenómeno del *broadening*, adaptado de Ma y Koaster (1996). En el grupo P9-12 la función de la corriente A es mayor con respecto al resto de las corrientes repolarizantes y la corriente BK apenas colabora, por lo que se favorecería el ensanchamiento de los potenciales de acción durante un disparo repetitivo. En el grupo P16-19 aumenta la participación de los canales BK y la corriente A pierde relevancia, por lo que disminuiría el fenómeno de *broadening*.

En resumen, el aumento de la velocidad de repolarización en ausencia de hormona tiroidea conlleva una disminución de la duración del potencial de acción (Tabla 15), por lo que las neuronas hipotiroideas podrían presentar mayor frecuencia de descarga que las controles. Sin embargo, la frecuencia de descarga máxima en los animales hipotiroideos disminuye al aumentar el *broadening* (Tabla 30) provocado por la relevancia de la corriente A frente al resto de las corrientes repolarizantes. En definitiva, la limitación de la

frecuencia máxima de descarga altera la capacidad de comunicación de la célula y su excitabilidad intrínseca.

#### **4. Alteraciones en los canales dependientes de voltaje y su relación con la excitabilidad intrínseca**

Hasta ahora se han discutido los resultados obtenidos en los experimentos en fijación de corriente registrados en las neuronas de rodajas hipocampales, analizando las diferencias entre animales hipotiroideos y controles en cuanto al patrón de disparo, la morfología del potencial de acción, la despolarización postpotencial y la frecuencia de descarga. Asimismo, se han relacionado estas diferencias con las posibles corrientes responsables de las mismas. En este apartado se discutirán los resultados obtenidos en los experimentos en fijación de voltaje registrados en las células disociadas, analizando los cambios entre animales hipotiroideos y controles en los canales voltaje-dependientes de dichas corrientes y se tratarán de explicar los posibles mecanismos implicados en estos cambios.

##### **4.1. La corriente T de calcio disminuye en ausencia de hormona tiroidea**

*Desarrollo de la corriente T.* En muchos tipos de neuronas, incluyendo las hipocampales, los canales de calcio voltaje-dependientes tipo T son los primeros que se expresan durante el desarrollo (Yaari et al., 1987), mediante una regulación hormonal (Lory et al., 2006). La implicación de estos canales en la diferenciación neuronal ha sido estudiada en modelos celulares que simulan estadios tempranos de esta diferenciación. Un ejemplo es el aportado por el trabajo de Chemin *et al.* (2002) que demuestra cómo la inhibición de la actividad del canal Cav3.2 reduce la neuritogénesis en la línea celular neuroblastoma-glioma NG108-15. A partir de estos datos se puede pensar que la distribución anormal de las espinas dendríticas durante el desarrollo en los animales hipotiroideos está relacionada con la disminución en la densidad de la corriente de calcio LVA descrita en esta tesis.

***Isoformas del canal tipo T.*** En la rata adulta las neuronas piramidales de CA1 expresan altos niveles de los 3 tipos de RNAs mensajeros y las proteínas para Cav3.1, Cav3.2 y Cav3.3. (Talley et al., 1999; Craig et al., 1999; McKay et al., 2006). Se han identificado a estas 3 isoformas como las responsables de la corriente T. Los tres subtipos de canales Cav3.x se distribuyen por el soma y las dendritas apicales, aunque estudios de inmunofluorescencia muestran como Cav3.1 se localiza principalmente en la región de las dendritas proximales, Cav3.2 en la región dendrítica media y Cav3.3 se extiende por las dendritas distales (Craig et al., 1999; McKay et al., 2006). La subunidad Cav3.3 es diferente desde el punto de vista de sus propiedades cinéticas. Así, las subunidades Cav3.1 y Cav3.2 presentan propiedades cinéticas similares (Chemin et al., 2002) mientras que la subunidad Cav3.3 presenta unas cinéticas mas lentas. Sin embargo todas comparten que sus cinéticas de activación son 10 veces más rápidas que sus cinéticas de inactivación. Por otra parte, la subunidad Cav3.3 presenta la mayor conductancia de canal único (Perez-Reyes, 2003).

Los experimentos realizados en esta tesis demuestran que las neuronas piramidales de las ratas hipotiroideas presentan menor densidad de corriente LVA de calcio. La explicación admite diversas hipótesis:

***1. Expresión de Cav3 en el hipotiroidismo.*** La hipótesis más obvia que explicaría la reducción de la densidad de corriente LVA de calcio sería la disminución en la expresión de canales T en la membrana de las neuronas hipotiroideas. Sin embargo, las diferentes cinéticas de la corriente T registrada en las neuronas hipotiroideas indican que la proporción de los subtipos de los canales expresados en las neuronas hipotiroideas pudiera ser distinta al de las controles. Así, la constante de tiempo de inactivación es más rápida en las neuronas hipotiroideas del grupo P9-11 (Figura 40), lo que pudiera indicar que la ausencia de hormona tiroidea disminuye en mayor medida la expresión de la isoforma Cav3.3. Aparte de las diferentes cinéticas de la corriente T registrada en animales hipotiroideos, en esta tesis se muestra que la despolarización postpotencial está mas afectada en los animales hipotiroideos que en los controles, tras la aplicación de níquel en el líquido extracelular (Figura 33). Si consideramos que la sensibilidad al níquel de la isoforma Cav3.2 es del orden de 20 veces mayor que en las isoformas Cav3.1 y Cav3.3 (Lee et al., 1999), una hipótesis que explicaría la reducción de la densidad de corriente T en los animales hipotiroideos sería que estos animales presenten

diferentes ratios en las subunidades Cav3.x. Facilitándose la expresión o inserción en la membrana de la isoforma Cav3.2, con más sensibilidad al níquel y de inactivación más rápida, frente a la isoforma Cav3.3, de menor sensibilidad al níquel y cinética mucho mas lenta. En este sentido, en el trabajo de Chevalier *et al.* (2006) se argumenta que la isoforma Cav3.3 es capaz de generar el disparo en ráfaga por si sola. Por lo tanto, la hipótesis que se plantea sería que en condiciones controles, durante la aparición del comportamiento de disparo en ráfaga se expresaría en mayor proporción la isoforma Cav3.3, que presenta unas cinéticas de corriente más lentas, con respecto a la expresión de la isoforma Cav3.2, de inactivación más rápida. En el hipotiroidismo este proceso de maduración se encontraría alterado, de modo que la isoforma Cav3.3 no se expresaría en la ventana de desarrollo adecuada.

**2. Hipótesis alternativa.** Una hipótesis alternativa para explicar esta reducción en la corriente LVA de calcio es que la conductancia de canal único se encuentre desregulada en el hipotiroidismo por alteraciones enzimáticas. Los canales de tipo T de calcio son sensibles a varias quinasas (Welsby et al., 2003; Iftinca y Zamponi, 2009; Joksovic et al., 2010) que a su vez están reguladas por las hormonas tiroideas (Alzoubi et al., 2004; Wang et al., 2010).

Sin embargo harían falta experimentos específicos para discernir cual de estas hipótesis o una mezcla de ellas se ajusta más a nuestros resultados.

**Importancia funcional.** En general, el calcio intracelular regula prácticamente todos los procesos celulares, incluyendo la proliferación, diferenciación, crecimiento, apoptosis y muerte celular (Berridge, 1998). Los cambios que se producen durante el desarrollo en los canales de calcio dependientes de voltaje tienen efectos importantes en procesos calcio-dependientes, como el crecimiento de dendritas o la formación de sinapsis (Spitzer et al., 1995). En este sentido los canales LVA de las neuronas piramidales de CA1 presentan un desarrollo temprano durante las primeras semanas postnatales, para a continuación ir perdiendo importancia a favor de los HVA (Kortekaas y Wadman, 1997). El desarrollo temprano de los LVA en las neuronas inmaduras permitiría el disparo en ráfagas y modularía las señales de calcio fundamentales para la neuritogénesis, la sinaptogénesis y las primeras plasticidades (Spitzer, 1994; Spitzer et al., 1995). Es lógico

pensar que parte de las alteraciones que presentan los animales hipotiroideos en el desarrollo del árbol dendrítico se deban en parte a problemas en los procesos calcio-dependientes, probablemente relacionados con la expresión de los canales de calcio LVA, que como se ha descrito en esta tesis presentan una menor densidad de corriente en ausencia de la hormona tiroidea. Además, existen plasticidades que se relacionan con retraso mental, que podrían estar alteradas en el hipotiroidismo, como por ejemplo la LTD mediada por mGluR (Bear et al., 2004) que depende de la activación de los canales de tipo T de calcio (Oliet et al., 1997).

#### **4.2. Corrientes de potasio: la corriente A aumenta en ausencia de hormona tiroidea, enmascarando los efectos funcionales de la leve disminución de la corriente D**

En general, el incremento de la corriente A que se observa en los animales hipotiroideos parece ser un factor determinante que controla la excitabilidad de las neuronas piramidales de CA1, a pesar de la disminución de la corriente D en estas mismas neuronas. La mayor densidad de corriente A en los animales hipotiroideos no es debida a una inactivación más lenta de sus canales, ya que las constantes de tiempo de inactivación son más rápidas en los animales hipotiroideos (Tabla 23), lo que provocaría, por el contrario, una disminución de la corriente A. Su mayor densidad parece mas bien relacionada con un aumento en la expresión de los canales de corriente A, tanto de la expresión de Kv4.2 como de Kv4.3 (Sánchez-Alonso et al., 2012). En las células piramidales de CA1 se han identificados ambos subtipos de canales en ratas de P11 a P16 días de edad (Martina et al., 1998), mientras que en la edad adulta solo permanece el subtipo Kv4.2 (Rhodes et al., 2004).

***Expresión de Kv4 y sus subunidades auxiliares en el hipotiroidismo.*** La cinética de inactivación tiempo-dependiente de la corriente A es más rápida en las neuronas hipotiroideas, puesto que sus constantes de tiempo de inactivación son menores (Tabla 23). Esto se puede explicar por un incremento de la expresión del subtipo Kv4.2 frente al Kv4.3 en las células hipotiroideas, ya que el subtipo Kv4.3 presenta una inactivación más lenta que el Kv4.2 (Serodio et al., 1994; 1996; Jerng et al., 2004). Sin embargo, es imposible comprobar esta explicación mediante los estudios de *Western Blot*, ya que la contribución

relativa de cada subtipo no se puede estimar. Otra explicación sobre la rápida cinética de inactivación de la corriente A en las neuronas hipotiroideas es que se deba a las interacciones de Kv4.2 y Kv4.3 con sus subunidades auxiliares. Por un lado, aumentaría la cinética en las neuronas hipotiroideas si predominará la subunidad auxiliar KChIP3 frente a las otras, dado que la interacción del canal Kv4.2 con KChIP3 presenta unas constantes de tiempo de inactivación menores. Sin embargo, este no es el caso dado que la interacción de Kv4.2 con sus subunidades auxiliares modifica las curvas de activación e inactivación (An et al., 2000), las cuales son similares entre controles e hipotiroideas (Figura 51). Por otro lado, la interacción de la subunidad KChIP1 con el canal Kv4.3 disminuye las constantes de tiempo de inactivación sin alterar las dependencias del voltaje de las curvas de activación e inactivación (An et al., 2000), por lo que una hipótesis posible para explicar los cambios en la cinética de inactivación de la corriente A de las neuronas hipotiroideas es que existan alteraciones del canal Kv4.3 y sus subunidades auxiliares KChIP. Aunque existen otras subunidades auxiliares del complejo del canal Kv4, como son las dipeptidilpeptidasas, DPP6 y DPP10, no parecen afectadas en las neuronas hipotiroideas ya que alterarían las curvas de activación e inactivación (Maffie y Rudy, 2008; Pongs y Schwarz, 2010).

**Importancia funcional.** La corriente A contribuye a la repolarización del potencial de acción, modula la frecuencia de los PAs en el disparo repetitivo (Connor y Stevens, 1971; Johnston et al., 2000), modula la amplitud del potencial de acción durante la propagación retrograda, se opone a la iniciación del PA y regula las entradas y las integraciones sinápticas (Cai et al., 2004; Hoffman et al., 1997; Kim et al., 2005; Losonczy y Magee, 2006), siendo en resumen una importante reguladora de la excitabilidad (Beck y Yaari, 2008). Cambios en la distribución y expresión de los canales responsables de esta corriente o en la modulación de sus propiedades cinéticas o en su dependencia del voltaje, pueden tener consecuencias importantes en la integración dendrítica y en la actividad neuronal. Se ha descrito que la reducción de la corriente A se produce en varios desordenes neurológicos, tales como la epilepsia o malformaciones corticales (Bernard et al., 2004; Castro et al., 2001). En la presente tesis se ha demostrado que la densidad de corriente A se encuentra aumentada en las ratas hipotiroideas durante las primeras semanas postnatales, relacionada con un aumento en la expresión de sus canales (Sánchez-Alonso et al., 2012). Por lo tanto, se estaría produciendo una disminución de la excitabilidad neuronal en los animales hipotiroideos causada por un aumento de la corriente A, al contrario de lo que

ocurre en modelos de epilepsia donde la disminución de corriente A conlleva un aumento de la excitabilidad neuronal (Graef y Godwin, 2010).

### **4.3. Hipótesis sobre la regulación de estos canales a través de proteínas quinzasas y su posible alteración en el hipotiroidismo**

Se conoce que la excitabilidad neuronal se ve incrementada tanto por la activación de la proteína quinasa A (PKA) como por la proteína quinasa C (PKC) (Hu et al., 1987; Slack y Pockett, 1991; Hu y Gereau, 2003). Además, estas quinzasas se relacionan tanto con la corriente A, como con la T. La corriente A disminuye tras la activación de PKA o PKC (Hoffman y Johnston, 1998; Hu y Gereau, 2003), probablemente a través de una fosforilación en los canales de potasio: por ejemplo Kv4.2 presenta en su secuencia de aminoácidos posibles dianas de fosforilación para estas quinzasas (Baldwin et al., 1991; Anderson et al., 1997). La corriente T por el contrario se ve aumentada tras la activación de PKA o PKC (Park et al., 2006; Chemin et al., 2007; Costa et al., 2011). Por lo tanto, alteraciones en estas proteínas quinzasas en el hipotiroidismo podrían ser las causantes de parte de los efectos descritos en esta tesis, una disminución de PKA o PKC aumentaría la corriente A y disminuirá la T. En este sentido el trabajo de Zhang *et al.* (2011) demuestra que la isoforma PKC $\beta$  se encuentra disminuida, tanto la expresión de su mRNA como sus niveles de proteína, en neuronas de hipocampo con déficit de hormona tiroidea durante el desarrollo postnatal. Si tenemos en cuenta que la isoforma  $\beta$  de PKC se expresa predominantemente en la región CA1 del hipocampo (Sun y Alkon, 2009), se puede sugerir la disminución de estas proteínas quinzasas durante el desarrollo en los animales hipotiroideos como un posible mecanismo que explicaría el aumento de la corriente A y la disminución de la corriente T y en definitiva la disminución de la excitabilidad neuronal intrínseca.

## **5. Excitabilidad intrínseca**

La excitabilidad neuronal viene determinada por las propiedades y distribución de los canales iónicos de la membrana plasmática. Se puede definir como la capacidad de las

neuronas de generar, a partir de un cierto umbral, una señal de salida (el potencial de acción) frente a una señal de entrada (normalmente un potencial excitatorio postsináptico). En cuanto al mecanismo, el proceso requiere la apertura de canales iónicos dependientes de voltaje localizados en la membrana neuronal cuando una sinapsis excitatoria es activada. Aunque el concepto es sencillo, la relación entrada-salida de la neurona requiere operaciones complejas y una modificación de la señal de entrada a través de los canales iónicos localizados en las dendritas, el soma y el axón (revisado por Daoudal y Debanne, 2003). Funcionalmente estos canales de membrana juegan un papel crucial, pueden amplificar (como las corrientes de sodio voltaje dependiente o la corriente T de calcio) o atenuar (como la corriente A de potasio y la corriente H) la amplitud del potencial excitatorio postsináptico (Reyes, 2002). Por lo que cualquier modificación en las propiedades o densidad de estos canales afectará a la señal de salida y por lo tanto a la excitabilidad intrínseca. Se ha visto que la excitabilidad intrínseca varía en modelos animales de distintas patologías del sistema nervioso (epilepsia, Alzheimer, dolor neuropático, encefalomiелitis autoinmune, estrés), en la plasticidad sináptica y durante el desarrollo (Weiss et al, 2005; Beck y Yaari, 2008; O'Leary et al., 2010). Asimismo, aumentos en la excitabilidad de las neuronas hipocampales facilitan la plasticidad sináptica y el aprendizaje dependiente del hipocampo (Lopez de Armentia et al., 2007; Oh et al., 2009).

***Excitabilidad intrínseca en el desarrollo.*** La excitabilidad intrínseca de las neuronas piramidales del área CA1 de hipocampo aumenta progresivamente durante el desarrollo en las primeras semanas postnatales (Chen et al., 2005). En esta tesis se ha confirmado su aumento desde P9 hasta P19. Los potenciales de acción durante este periodo se vuelven más rápidos y con mayor amplitud (Tabla 15 y Figura 28), tal y como describen Spigelman *et al.* (1992). La neurona, a medida que avanza el desarrollo, es capaz de disparar potenciales de acción con menor latencia durante estímulos prolongados y con trenes de potenciales de acción de mayor frecuencia, aumentando su frecuencia de descarga máxima (Figura 25 y 27). La amplitud de la despolarización postpotencial también aumenta durante este periodo (Figura 32), contribuyendo a que las neuronas cambien su patrón de disparo, pasando de una mayoría de neuronas disparando con un patrón regular entre los días 9 y 12 postnatales, a que prácticamente todas las neuronas presenten un patrón en ráfaga entre los días 16 y 19. Estos resultados coinciden con el

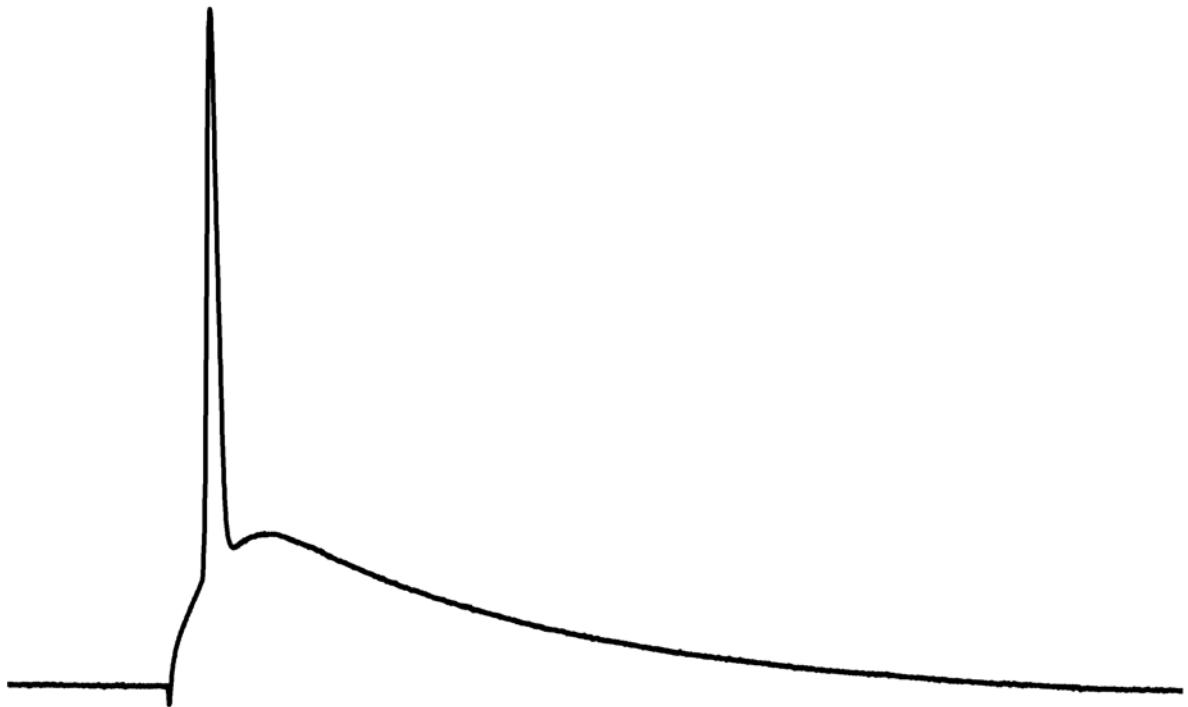
trabajo de Chen *et al.* (2005) realizado con neuronas de CA1 de hipocampo, en el cual se muestra que el patrón de disparo cambia de regular a ráfaga durante un periodo de edad similar, alcanzando el máximo porcentaje de disparo en ráfaga entre P18-19. Por otra parte, que el patrón de disparo en ráfaga aparezca durante las primeras semanas postnatales del desarrollo y luego desaparezca de nuevo en la edad adulta, coincidiendo dicho patrón con la intensa proliferación, crecimiento somático, ramificación del árbol dendrítico y formación de sinapsis (Pokorny y Yamamoto, 1981a,b), sugiere que la adquisición del patrón en ráfaga podría tener un papel importante sobre la correcta maduración del hipocampo durante este periodo tan crítico del desarrollo, de modo que su modificación provocaría alteraciones permanentes en el hipocampo de la rata adulta.

***Excitabilidad intrínseca en el hipotiroidismo.*** Estudios previos indican que la hormona tiroidea puede regular la excitabilidad neuronal en el hipocampo (Cheng et al., 2010). Hoffmann y Dietzel (2004) demostraron que la hormona tiroidea regula la excitabilidad de las neuronas de la rata, puesto que el tratamiento con hormona tiroidea conlleva un aumento de las frecuencias de descarga. Asimismo, Potthoff y Dietzel (1997) mostraron como la hormona tiroidea provoca corrientes de sodio mayores en cultivos primarios de células piramidales de hipocampo. En esta tesis se ha demostrado que en los animales hipotiroideos disminuye la excitabilidad y la frecuencia de descarga máxima, así como aumenta el *broadening* y la densidad de corriente A, resultados relacionados con la mayor expresión de los canales de corriente A en estos animales (Sánchez-Alonso et al., 2012). Además, la disminución de la densidad de la corriente T en los animales hipotiroideos modifica el patrón de disparo, cuya alteración provoca distintos desordenes neurológicos (Beck y Yaari, 2008). Lo cual repercutiría en diversas alteraciones en los animales hipotiroideos, desde problemas en la eficacia sináptica (Brumberg et al., 2000) hasta problemas en el procesamiento y almacenamiento de la información neuronal (Magee y Carruth, 1999).

***Mecanismos homeostáticos del control de la excitabilidad.*** Existe un mecanismo homeostático que relaciona las propiedades intrínsecas de membrana y la densidad de los canales iónicos. Las neuronas expresan una gran variedad de canales iónicos, y por lo tanto, a partir de diferentes combinaciones de conductancias se pueden conseguir propiedades intrínsecas similares (Marder y Goaillard, 2006). De este modo, Swensen y

Bean (2005) pusieron de manifiesto que neuronas disociadas de Purkinje que presentan un potencial de membrana similar y un patrón de disparo idéntico, presentan unos ratios de corrientes de sodio y calcio muy diferentes. Lo que se plantea en este trabajo es un mecanismo similar para explicar lo que sucede en las neuronas en ausencia de la hormona tiroidea. Así, las neuronas hipotiroideas mantienen los mismos valores en la constante de tiempo que las controles, a pesar de su menor tamaño somático y del escaso desarrollo de la arborización dendrítica, lo que implica una disminución de la capacidad de membrana y un aumento de su resistencia. Por ello, el decremento en la capacidad de membrana se debe complementar con el aumento de la resistencia a fin de mantener similar el producto de las mismas en controles e hipotiroideas. Por otro lado, un aumento de la resistencia de membrana provoca que la neurona sea más excitable; sin embargo, se ha descrito que durante el desarrollo la excitabilidad intrínseca aumenta, mientras que la resistencia de membrana disminuye. En una situación control las neuronas inmaduras (de menor tamaño y de mayor resistencia de membrana) al desarrollarse aumentan su tamaño celular y disminuyen su resistencia de membrana. Sin embargo, el desarrollo también modifica la expresión y/o conductancia de sus canales, por lo que los potenciales de acción ganan velocidad y amplitud, su frecuencia de descarga máxima aumenta, el *broadening* disminuye permitiendo mayor frecuencia de disparo, etc... En definitiva: la excitabilidad intrínseca aumenta durante el desarrollo, a pesar de la disminución en la resistencia de membrana. En ausencia de hormona tiroidea las neuronas se encontrarían en un estadio más inmaduro que las controles. Por lo que ante un mismo estímulo, una neurona hipotiroidea responderá con menor frecuencia de descarga que una control debido a su menor excitabilidad intrínseca y a pesar de su mayor resistencia de membrana.

## 6. CONCLUSIONES



**La ausencia de hormona tiroidea** durante el desarrollo postnatal provoca las siguientes alteraciones sobre las neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo:

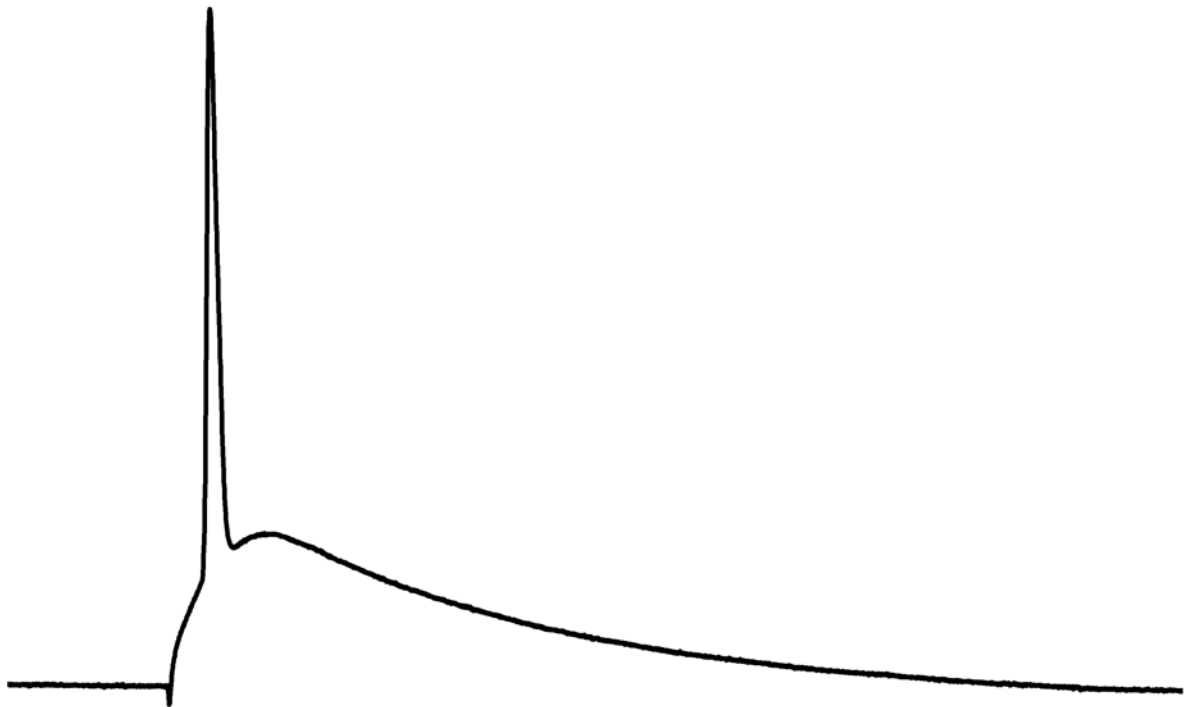
1. Cambia las propiedades electrofisiológicas básicas en reposo: despolariza el potencial de membrana, aumenta la resistencia de membrana y disminuye la capacidad de membrana.
2. Modifica la morfología de los potenciales de acción: disminuye su amplitud, despolariza el umbral, disminuye la velocidad de despolarización, aumenta la velocidad de repolarización y disminuye la duración.
3. Modifica la morfología de la despolarización postpotencial: disminuye la duración sin modificar su amplitud.
4. Altera la excitabilidad intrínseca: despolariza el umbral de disparo, disminuye la excitabilidad debido a sus propiedades activas y la aumenta por las pasivas, retrasa la aparición del patrón de disparo en ráfaga y disminuye el número de potenciales de acción por ráfaga.
5. Disminuye la densidad de corriente T de calcio con alteración de las cinéticas de activación e inactivación y revierte a valores controles cuando se administra un tratamiento sustitutivo de T3. La disminución de la corriente T se relaciona con: el retraso en la aparición del patrón de disparo en ráfaga, la disminución de la duración de la despolarización postpotencial y la disminución del número de potenciales de acción por ráfaga.
6. Disminuye la densidad de corriente D-like de potasio.
7. Aumenta la densidad de corriente A de potasio sin alterar sus cinéticas de activación e inactivación y revierte hacia valores controles cuando se administra un tratamiento sustitutivo de T3. El aumento de la corriente A se relaciona con: el aumento de la velocidad de repolarización y la disminución de la duración del potencial de acción, la disminución de la excitabilidad, la disminución de la

frecuencia de descarga máxima y el aumento del ensanchamiento del potencial de acción durante el disparo repetitivo.

**El desarrollo** provoca las siguientes alteraciones sobre las neuronas piramidales hipotiroideas y controles del área CA1 del hipocampo:

1. Cambia las propiedades electrofisiológicas básicas en reposo: disminuye la resistencia de membrana, aumenta la capacidad de membrana y disminuye la constante de tiempo de membrana.
2. Modifica la morfología de los potenciales de acción: aumenta su amplitud, hiperpolariza el umbral, aumenta la velocidad de despolarización y cambia la velocidad de repolarización y la duración.
3. Modifica la morfología de la despolarización postpotencial: aumenta la amplitud sin modificar su duración.
4. Altera la excitabilidad intrínseca: aumenta la excitabilidad debido a sus propiedades activas y la disminuye por las pasivas, hiperpolariza el umbral de disparo y modifica el patrón de disparo de regular a en ráfaga.
5. Aumenta la densidad de corriente T en ambos grupos, pero sólo el grupo hipotiroideo presenta alteración de las cinéticas de activación e inactivación.
6. Aumenta la densidad de corriente D-like de potasio y su cinética de inactivación en el grupo hipotiroideo.
7. Las constantes de tiempo de inactivación de la corriente A aumentan en ambos grupos.

## **7. BIBLIOGRAFÍA**



Abraham W.C., Gustafsson B. y Wigström H. (1986). Single high strength afferent volleys can produce long-term potentiation in the hippocampus in vitro. *Neurosci. Lett.* 70:217-222.

Adams J.P., Anderson A.E., Johnston D., Pfaffinger P.J. y Sweatt J.D. (1997). Kv4.2: a novel substrate for MAP kinase phosphorylation. *Soc. Neurosci. Abstr.* 23:1176.

Akaike M., Kato N., Ohno H. y Kobayashi T. (1991). Hyperactivity and spatial maze learning impairment of adult rats with temporary neonatal hypothyroidism. *Neurotoxicol. Teratol.* 13:317-322.

Akemann W. y Knöpfel T. (2006). Interaction of Kv3 potassium channels and resurgent sodium current influences the rate of spontaneous firing of Purkinje neurons. *J. Neurosci.* 26:4602-4612.

Aldrich R.W. (1981). Inactivation of voltage-gated delayed potassium current in molluscan neurons: a kinetic model. *Biophys. J.* 36:519-532.

Aldrich R.W., Getting P.A. y Thompson S.H. (1979). Mechanism of frequency-dependent broadening of molluscan neurone soma spikes. *J. Physiol.* 291:531-544.

Alvarez-Dolado M., Gonzalez-Sancho J.M., Bernal J. y Munoz A. (1998). Developmental expression of the tenascin-C is altered by hypothyroidism in the rat brain. *Neurosci.* 84:309-322.

Alzoubi K.H., Bedawi A.S., Aleisa A.M. y Alkadhi K.A. (2004). Hypothyroidism impairs long-term potentiation in sympathetic ganglia: electrophysiologic and molecular studies. *J. Neurosci. Res.* 78:393-402.

An W.F., Bowlby M.R., Betty M., Cao J., Ling H.P., Mendoza G., Hinson J.W., Mattsson K.I., Strassle B.W., Trimmer J.S. y Rhodes K.J. (2000). Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors. *Nature.* 403:553-56.

- Andersen P., Eccles J.C. y Loynig Y. (1964). Location of postsynaptic inhibitory synapses on hippocampal pyramids. *J. Neurophysiol.* 27:592-607.
- Anderson A.E., Adams J.P., Swann J.W., Johnston D., Pfaffinger P.J. y Sweatt J.D. (1997). Kv4.2. a fast transient A-type potassium channel is a substrate for PKA and PKC. *Soc. Neurosci. Abstr.* 23:1394.
- Andreasen M. y Lambert J.D. (1995). Regenerative properties of pyramidal cell dendrites in area CA1 of the rat hippocampus. *J. Physiol.* 483:421-441.
- Aniello F., Couchie D., Bridoux A.M., Gripois D. y Nuñez J. (1991). Splicing of juvenile and adult tau mRNA variants is regulated by thyroid hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:4035-4039.
- Azouz R., Jensen M.S. y Yaari Y. (1996). Ionic basis of spike after-depolarization and burst generation in adult rat hippocampal CA1 pyramidal cells. *J. Physiol. (Lond.)* 492:211-223.
- Balázs R., Brooksbank B.W., Davidson A.N., Eayrs J.T. y Wilson D.A. (1969). The effect of neonatal thyroidectomy on myelination in the rat brain. *Brain Res.* 15:219-232.
- Baldwin T.J., Tsaor M-L., Lopez G.A., Jan Y.N. y Jan L.Y. (1991). Characterization of a mammalian cDNA for an inactivating voltage-sensitive K<sup>+</sup> channel. *Neuron.* 7:471-483.
- Bear M.F., Huber K.M. y Warren S.T. (2004). The mGluR theory of fragile X mental retardation. *Trends. Neurosci.* 27:370-377.
- Beck H. y Yaari Y. (2008). Plasticity of intrinsic neuronal properties in CNS disorders. *Nature Rev. Neurosci.* 9:357-369.
- Bekkers J.M. y Delaney A.J. (2001). Modulation of excitability by  $\alpha$ -dendrotoxin-sensitive potassium channels in neocortical pyramidal neurons. *J. Neurosci.* 21:6553-6560.

Bernal J. (2005). Thyroid hormona receptors in brain development. *Vitam. Horm.* 71:95-122.

Bernal J. y Pekonen F. (1984). Ontogenesis of the nuclear 3,5,3'triiodothyronine receptor in human fetal brain. *Endocrinol.* 114:677-679.

Bernard C., Anderson A., Becker A., Poolos N.P., Beck H. y Johnston D. (2004). Acquired dendritic channelopathy in temporal lobe epilepsy. *Science.* 305:532-535.

Berridge M.J. (1998). Neuronal calcium signalling. *Neuron.* 21:13-26.

Bezánilla F. y Perozo E. (2003). The voltage sensor and the gate in ion channels. *Adv. Protein Chem.* 63:211-41.

Blanton M.G., Loturco J. y Kriegstein A. (1989). Whole cell recordings from neurons in slices of reptilian and mammalian cerebral cortex. *J. Neurosci. Methods.* 30:203-210.

Boland L.M., Drzewiecki M.M., Timoney G. y Casey E. (2009). Inhibitory effects of polyunsaturated fatty acids on Kv4/KChIP potassium channels. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 296:1003-1014.

Brown J.T. y Randall A.D. (2009). Activity-dependent depression of the spike after-depolarization generates long-lasting intrinsic plasticity in hippocampal CA3 pyramidal neurons. *J. Physiol.* 587:1265-1281.

Brumberg J.C., Nowak L.G. y McCormick D.A. (2000). Ionic mechanisms underlying repetitive high-frequency burst firing in supragranular cortical neurons. *J. Neurosci.* 20:4829-4843.

Buzsáki G. (1989). Two-stage model of memory trace formation: a role for "noisy" brain states. *Neurosci.* 31: 551-570.

Cai X., Liang C.W., Muralidharan S., Kao J.P., Tang C.M. y Thompson S.M. (2004). Unique roles of SK and Kv4.2 potassium channels in dendritic integration. *Neuron*. 44:351-364.

Caporale N. y Dan Y. (2008). Spike timing-dependent plasticity: a Hebbian learning rule. *Annu. Rev. Neurosci.* 31:25-46.

Caria M.A., Dratman M.B., Kow L.M., Mameli O. y Pavlides C. (2009). Thyroid hormona action: nongenomic modulation of neuronal excitability in the hippocampus. *J. Neuroendocrinol.* 21:98-107.

Carter B.C. y Bean B.P. (2009). Sodium entry during action potentials of mammalian neurons: incomplete inactivation and reduced metabolic efficiency in fast-spiking neurons. *Neuron*. 64:898-909.

Castro P.A., Cooper E.C., Lowenstein D.H. y Baraban S.C. (2001). Hippocampal heterotopia lack functional Kv4.2 potassium channels in the methylazoxymethanol model of cortical malformations and epilepsy. *J. Neurosci.* 21:6626-6634.

Cattaneo A., Maffei L. y Morrone C. (1981). Two firing patterns in the discharge of complex cells encoding different attributes of the visual stimulus. *Exp. Brain Res.* 43:115-118.

Catterall W.A. (2000). Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16:521-555.

Catterall W.A., Pérez-Reyes E., Snutch T.P. y Striessnig J. (2005). International union of pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structurefunction relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol. Rev.* 57:411-425.

Chan S. y Kilby M.D. (2000). Thyroid hormone and central nervous system development. *J. Endocrinol.* 165:1-8.

Chemin J., Nargeot J. y Lory P. (2002). Neuronal T-type alpha 1H calcium channels induce neuritogenesis and expression of high-voltage-activated calcium channels in the NG108-15 cell line. *J. Neurosci.* 22: 6856-6862.

Chemin J., Mezghrani A., Bidaud I., Dupasquier S., Marger F., Barrère C., Nargeot J. y Lory P. (2007). Temperature-dependent modulation of Cav3 T-type calcium channels by protein kinases C and A in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 282:32710-32718.

Chen S., Yue C. y Yaari Y. (2005). A transitional period of Ca<sup>2+</sup>-dependent spike afterdepolarization and bursting in developing rat CA1 pyramidal cells. *J. Physiol.* 567:79-93.

Chen S., Yue C. y Yaari Y. (2008). Spike Ca<sup>2+</sup> influx upmodulates the spike afterdepolarization and bursting via intracellular inhibition of KV7/M channels. *J. Physiol.* 586:1351-1363.

Cheng S., Leonard J.L. y Davis P.J. (2010). Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocr. Rev.* 31:139-170.

Cheong E., Lee S., Choi B.J., Sun M., Lee C.J. y Shin H.S. (2008). Tuning thalamic firing modes via simultaneous modulation of T- and L-type Ca<sup>2+</sup> channels controls pain sensory gating in the thalamus. *J. Neurosci.* 28:13331-13340.

Chevalier M., Lory P., Mironneau C., Macrez N. y Quignard J. (2006). T-type Cav3.3 calcium channels produce spontaneous low-threshold action potentials and intracellular calcium oscillations. *Eur. J. Neurosci.* 23:2321-2329.

Clos J., Crépel F., Legrand C., Legrand J., Rabié A y Vigouroux E. (1974). Thyroid physiology during the postnatal period in the rat: a study of the development of thyroid function and of the morphogenetic effects of thyroxine with special reference to cerebellar maturation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 23:178-192.

Cocks J.A., Balazs R., Johnson A.L. y Eayrs J.T. (1970). Effect of thyroid hormone on the biochemical maturation of the rat brain: conversion of glucose-carbon into amino acids. *J. Neurochem.* 17:1275-1285.

Coetzee W.A., Amarillo Y., Chiu J., Chow A., Lau D., McCormack T., Moreno H., Nadal M.S., Ozaita A., Pountney D., Saganich M., Vega-Saenz de Miera E. y Rudy B. (1999). Molecular diversity of K<sup>+</sup> channels. *Ann. NY Acad. Sci.* 868:233-285.

Coleman P.A. y Miller R.F. (1989). Measurement of passive membrane properties with whole-cell recordings from neurons in the intact amphibian retina. *J. Neurophysiol.* 61:218-230.

Connor J.A. y Stevens C.F. (1971a). Voltage clamp studies of a transient outward membrane current in gastropod neural somata. *J. Physiol.* 213:21-30.

Connor J.A. y Stevens C.F. (1971b). Prediction of repetitive firing behaviour from voltage clamp data on an isolated neurone soma. *J. Physiol.* 213: 31-53.

Correia N., Mullally S., Cooke G., Tun T.K., Phelan N., Feeney J., Fitzgibbon M., Boran G., O'Mara S. y Gibney J. (2009). Evidence for a specific defect in hippocampal memory in overt and subclinical hypothyroidism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94:3789-3797.

Costa P.F., Ribeiro M.A. y Santos A.I. (1991). Afterpotential characteristics and firing patterns in maturing rat hippocampal CA1 neurones in in vitro slices. *Brain. Res. Dev. Brain. Res.* 62:263-272.

Costa R.R., Inácio dos Reis R., Aguiara J.F. y Varanda W.A. (2011). Luteinizing hormone (LH) acts through PKA and PKC to modulate T-type calcium currents and intracellular calcium transients in mice Leydig cells. *Cell Calcium.* 49:191-199.

Coulter D.A., Huguenard J.R. y Prince D.A. (1989). Characterization of ethosuximide reduction of low-threshold calcium current in thalamic neurons. *Ann. Neurol.* 25:582-593.

Craig P.J., Beattie R.E., Folly E.A., Banerjee M.D., Reeves M.B., Priestley J.V., Carney S.L., Sher E., Pérez-Reyes E. y Volsen S.G. (1999). Distribution of the voltage-dependent calcium channel  $\alpha_1G$  subunit mRNA and protein throughout the mature rat brain. *Eur. J. Neurosci.* 11:2949-2964.

Crill W.E. (1996). Persistent sodium current in mammalian central neurons. *Annu. Rev. Physiol.* 58: 349-362.

Cudmore R.H., Fronzaroli-Molinieres L., Giraud P. y Debanne D. (2010). Spike-time precision and network synchrony are controlled by the homeostatic regulation of the D-Type potassium current. *J. Neurosci.* 30:12885-12895.

Daoudal G. y Debanne D. (2003). Long-term plasticity of intrinsic excitability: learning rules and mechanisms. *Learn. Mem.* 10:456-465.

Davis P.J., Leonard J.L. y Davis F.B. (2008). Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone. *Front. Neuroendocrinol.* 29:211-218.

Desai N.S., Rutherford L.C. y Turrigiano G.G. (1999). Plasticity in the intrinsic excitability of cortical pyramidal neurons. *Nature Neurosci.* 2:515-520.

Deschênes M., Roy J.P. y Steriade M. (1982). Thalamic bursting mechanism: an inward slow current revealed by membrane hyperpolarization. *Brain Res.* 239:289-293.

Dussault J.H. y Ruel J. (1987). Thyroid hormones and brain development. *Annu. Rev. Physiol.* 49:321-334.

Eayrs J.T. (1960). Influence of the thyroid on the central nervous system. *Brit. Med. Bull.* 16:122-127.

Ertel E.A., Campbell K.P., Harpold M.M., Hofmann F. y Mori Y. (2000). Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron.* 28:365-368.

Evans R.M. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*. 240:889-95.

Fan Y., Fricker D., Brager D.H., Chen X., Lu H.C., Chitwood R.A. y Johnston D. (2005). Activity-dependent decrease of excitability in rat hippocampal neurons through increases in I(h). *Nature Neurosci.* 8:1542-1551.

Felix R., Sandoval A., Sanchez D., Gomora J.C., De La Vega-Beltran J.L., Trevino C.L. y Darszon A. (2003). ZD7288 inhibits low-threshold Ca<sup>2+</sup> channel activity and regulates sperm function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 311:187-192.

Fernández-Lamo I., Montero-Pedrazuela A., Delgado-García J.M., Guadaño-Ferraz A. y Gruart A. (2009). Effects of thyroid hormone replacement on associative learning and hippocampal synaptic plasticity in adult hypothyroid rats. *Eur. J. Neurosci.* 30:679-692.

Fraser D.D. y MacVicar B.A. (1991). Low-threshold transient calcium current in rat hippocampal lacunosum-moleculare interneurons: kinetics and modulation by neurotransmitters. *J. Neurosci.* 11:2812-2820.

Frick A., Magee J. y Johnston D. (2004). LTP is accompanied by an enhanced local excitability of pyramidal neuron dendrites. *Nature Neurosci.* 7:126-135.

Fricker D., Verheugen J.A. y Miles R. (1999). Cell-attached measurements of the firing threshold of rat hippocampal neurones. *J. Physiol.* 517:791-804.

Friedman A. y Gutnik M.J. (1987). Low-threshold calcium electrogenesis in neocortical neurons. *Neurosci. Lett.* 81:117-22.

Froemke R.C. y Dan Y. (2002). Spike-timing-dependent synaptic modification induced by natural spike trains. *Nature.* 416:433-438.

Froemke R.C., Tsay I.A., Raad M., Long J.D. y Dan Y. (2006). Contribution of individual spikes in burst-induced long-term synaptic modification. *J. Neurophysiol.* 95:1620-1629.

Froemke R.C., Merzenich M.M. y Schreiner C.E. (2007). A synaptic memory trace for cortical receptive field plasticity. *Nature*. 450:425-429.

Gainer H., Wolfe S.A.J., Obaid A.L. y Salzberg B.M. (1986). Action potentials and frequencydependent secretion in the mouse neurohypophysis. *Neuroendocrinol.* 43:557-563.

Gerber U., Greene R.W. y McCarley R.W. (1989). Repetitive firing properties of medial pontine reticular formation neurones of the rat recorded in vitro. *J. Physiol.* 410:533-560.

Gerges N.Z. y Alkadhi K.A. (2004). Hypothyroidism impairs late LTP in CA1 region but not in dentate gyrus of the intact rat hippocampus: MAPK involvement. *Hippocampus*. 14:40-45.

Giffin K., Solomon J.S., Burkhalter A. y Nerbonne J.M. (1991). Differential expression of voltage-gated calcium channels in identified visual cortical neurons. *Neuron*. 6:321-322.

Giné E., Morales-Garcia J.A., Perez-Castillo A. y Santos A. (2010). Developmental hypothyroidism increases the expression of kainate receptors in the hippocampus and the sensitivity to kainic acid-induced seizures in the rat. *Endocrinol.* 151:3267-3276.

Glynn I.M. (1956). Sodium and potassium movements in human red cells. *J. Physiol. London*. 134:278-310.

Glynn I.M. (1957). The action of cardiac glycosides on sodium and potassium movements in human red cells. *J. Physiol. London*. 136:148-173.

Glynn I.M. (2002). A hundred years of sodium pumping. *Annu. Rev. Physiol.* 64:1-18.

Goldin A.L. (2001). Resurgence of sodium channel research. *Annu. Rev. Physiol.* 63:871-894.

Graef J.D. y Godwin D.W. (2011). Intrinsic plasticity in acquired epilepsy: too much of a good thing?. *Neuroscientist*. 16:487-95.

Graef J.D., Nordskog B.K., Wiggins W.F. y Godwin D.W. (2009). An acquired channelopathy involving thalamic T-type Ca<sup>2+</sup> channels after status epilepticus. *J. Neurosci*. 29:4430-4441.

Gu N., Vervaeke K. y Storm J.F. (2007). BK potassium channels facilitate high-frequency firing and cause early spike frequency adaptation in rat CA1 hippocampal pyramidal cells. *J. Physiol*. 580:859-882.

Guadaño-Ferraz A., Obregón M.J., St. Germain D.L. y Bernal J. (1997). The type 2 iodothyronine deiodinase is expressed primarily in glial cells in the neonatal rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94:10391-10396.

Haghdoust H., Janahmadi M. y Behzadi G. (2007). Physiological role of dendrotoxin-sensitive K<sup>+</sup> channels in the rat cerebellar purkinje neurons. *Physiol. Res*. 56:807-813.

Halliwel J.V. y Adams P.R. (1982). Voltage-clamp analysis of muscarinic excitation in hippocampal neurons. *Brain. Res*. 250: 71-92.

Hamill O.P., Huguenard J.R. y Prince D.A. (1991). Patch-clamp studies of voltage-gated currents in identified neurons of the rat cerebral cortex. *Cereb. Cortex*. 1:48-61.

Harris K.D., Hirase H., Leinekugel X., Henze D.A. y Buzsáki G. (2001) Temporal interaction between single spikes and complex spike bursts in hippocampal pyramidal cells. *Neuron*. 32:141-149.

Hashimoto K., Curty F.H., Borges P.P., Lee C.E., Abel E.D., Elmquist J.K., Cohen R.N. y Wondisford F.E. (2001). An unliganded thyroid hormone receptor causes severe neurological dysfunction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 98:3998-4003.

Häusser M., Spruston N. y Stuart G.J. (2000). Diversity and dynamics of dendritic signalling. *Science*. 290:739-797.

Hernandez-Cruz A. y Pape H.C. (1989). Identification of two calcium currents in acutely dissociated neurons from the rat lateral geniculate nucleus. *J. Neurophysiol.* 61:1270-1283.

Herrington J. y Lingle C.J. (1992). Kinetic and pharmacological properties of low voltage-activated Ca<sup>2+</sup> current in rat clonal (GH3) pituitary cells. *J. Neurophysiol.* 68:213-32.

Hille B. (2001). Ion channels of excitable membranes. Ed 2. Sunderland, MA: Sinauer.

Hodgkin A.L. y Huxley A.F. (1952a). Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of Loligo. *J. Physiol. London.* 116:449-472.

Hodgkin A.L. y Huxley A.F. (1952b). The components of membrane conductance in the giant axon of Loligo. *J. Physiol. London.* 116:473-496.

Hodgkin A.L. y Huxley A.F. (1952c). The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of Loligo. *J. Physiol. London.* 116:497-506.

Hodgkin A.L. y Huxley A.F. (1952d). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol. London.* 117:500-544.

Hoffman D.A. y Johnston D. (1998). Downregulation of Transient K<sup>+</sup> channels in dendrites of hippocampal CA1 pyramidal neurons by activation of PKA and PKC. *J. Neurosci.* 18:3521-3528.

Hoffman D.A. y Johnston D. (1999). Neuromodulation of dendritic action potentials. *J. Neurophysiol.* 81:408-411.

Hoffman D.A., Magee J.C., Colbert C.M. y Johnston D. (1997). K<sup>+</sup> channel regulation of signal propagation in dendrites of hippocampal pyramidal neurons. *Nature.* 387:869-875.

Hoffmann G. y Dietzel I.D. (2004). Thyroid hormone regulates excitability in central neurons from postnatal rats. *Neurosci.* 125:369-379.

Hu G.Y., Hvalby O., Walaas S.I., Albert K.A., Skjeflo P., Andersen P. y Greengard P. (1987). Protein kinase C injection into hippocampal pyramidal cells elicits features of long term potentiation. *Nature.* 328:426-429

Hu H., Vervaeke K. y Storm J.F. (2002). Two forms of electrical resonance at theta frequencies, generated by M-current, h-current and persistent Na<sup>+</sup> current in rat hippocampal pyramidal cells. *J. Physiol.* 545:783-805.

Hu H., Vervaeke K., Graham L.J. y Storm J.F. (2009). Complementary theta resonance filtering by two spatially segregated mechanisms in CA1 hippocampal pyramidal neurons. *J. Neurosci.* 29:14472-14483.

Hu H.J. y Gereau R.W. 4th. (2003). ERK integrates PKA and PKC signaling in superficial dorsal horn neurons. II. Modulation of neuronal excitability. *J. Neurophysiol.* 90:1680-1688.

Huguenard J.R. (1996). Low-threshold calcium currents in central nervous system neurons. *Annu. Rev. Physiol.* 58:329-48.

Iftinca M.C. y Zamponi G.W. (2009). Regulation of neuronal T-type calcium channels. *Trends. Pharmacol. Sci.* 30:32-40.

Izhikevich E.M., Desai N.S., Walcott E.C. y Hoppensteadt F.C. (2003). Burst as unit of neural information: selective communication via resonance. Review. *Trends. Neurosci.* 26:161-167.

Jackson M.B., Konnerth A y Augustine G.J. (1991). Action potential broadening and frequency dependent facilitation of calcium signals in pituitary nerve terminals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:380-384.

Jahnsen H. y Llinás R. (1984). Voltage-dependent burst-to-tonic switching of thalamic cell activity: an in vitro study. *Arch. Ital. Biol.* 122:73-82.

Jarsky T., Mady R., Kennedy B. y Spruston N. (2008). Distribution of bursting neurons in the CA1 region and the subiculum of the rat hippocampus. *J. Comp. Neurol.* 506:535-547.

Jensen M.S., Azouz R. y Yaari Y. (1994). Variant firing pattern in rat hippocampal pyramidal cells modulated by extracellular potassium. *J. Neurophysiol.* 71:831-839.

Jensen M.S., Azouz R. y Yaari Y. (1996). Spike after-depolarization and burst generation in adult rat hippocampal CA1 pyramidal cells. *J. Physiol.* 492:199-210.

Jerng H.H., Pfaffinger P.J. y Covarrubias M. (2004). Molecular physiology and modulation of somatodendritic A-type potassium channels. *Mol. Cell. Neurosci.* 27:343-369.

Johnston D., Hoffman D.A., Magee J.C., Poolos N.P., Watanabe S., Colbert C.M. y Migliore M. (2000). Dendritic potassium channels in hippocampal pyramidal neurons. *J. Physiol.* 525:75-81.

Johnston D., Christie B.R., Frick A., Gray R. y Hoffman D.A. (2003). Active dendrites, potassium channels and synaptic plasticity. *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B.* 358:667-74.

Johnston J., Forsythe I.D. y Kopp-Scheinflug C. (2010). Going native: voltage-gated potassium channels controlling neuronal excitability. *J. Physiol.* 588:3187-200.

Joksovic P.M., Choe W.J., Nelson M.T., Orestes P., Brimelow B.C. y Todorovic S.M. (2010). Mechanisms of inhibition of T-type calcium current in the reticular thalamic neurons by 1-octanol: implication of the protein kinase C pathway. *Mol. Pharmacol.* 77:87-94.

Kampa B.M., Letzkus J.J. y Stuart G.J. (2006). Requirement of dendritic calcium spikes for induction of spike-timing-dependent synaptic plasticity. *J. Physiol.* 574:283-290.

Kaneda M., Wakamori M., Ito C. y Akaike N. (1990). Low-threshold calcium current in isolated Purkinje cell bodies of rat cerebellum. *J. Neurophysiol.* 63:1046-1051.

Karolyi I.J., Dootz G.A., Halsey K., Beyer L., Probst F.J., Johnson K.R., Parlow A.F., Raphael Y., Dolan D.F. y Camper S.A. (2007). Dietary thyroid hormone replacement ameliorates hearing deficits in hypothyroid mice. *Mamm. Genome.* 18:596-608.

Kay A.R. y Wong R.K.S. (1986). Isolation of neurons suitable for patch-clamping from adult mammalian central nervous systems. *J. Neurosci. Methods.* 16:227-238.

Kepecs A., Wang X. y Lisman J. (2002). Bursting neurons signal input slope. *J. Neurosci.* 22:9053-9062.

Kessels H.W. y Malinow R. (2009). Synaptic AMPA receptor plasticity and behavior. *Neuron.* 61:340-50.

Kim J., Wei D.S. y Hoffman D.A. (2005). Kv4 potassium channel subunits control action potential repolarization and frequency-dependent broadening in rat hippocampal CA1 pyramidal neurones. *J Physiol.* 569:41-57

Kim J., Jung S., Clemens A.M., Petralia R.S. y Hoffman D.A. (2007). Regulation of dendritic excitability by activity-dependent trafficking of the A-type K<sup>+</sup> channel subunit Kv4.2 in hippocampal neurons. *Neuron.* 54: 933-947.

Kim J., Nadal M.S., Clemens A.M., Baron M., Jung S., Misumi Y., Rudy B. y Hoffman D.A. (2008). Kv4 accessory protein DPPX (DPP6) is a critical regulator of membrane excitability in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J. Neurophysiol.* 100:1835-1847.

Klee R., Ficker E. y Heinemann U. (1995). Comparison of voltage-dependent potassium currents in rat pyramidal neurons acutely isolated from hippocampal regions CA1 and CA3. *J. Neurophysiol.* 74:1982-1955.

Koibuchi N. e Iwasaki T. (2006). Regulation of brain development by thyroid hormone and its modulation by environmental chemicals. *Endocr. J.* 53:295-303.

- Koibuchi N., Jingu H., Iwasaki T. y Chin W.W. (2003). Current perspectives on the role of thyroid hormone in growth and development of cerebellum. *Cerebellum*. 2:279-289.
- Kole M.H.P., Letzkus J.J. y Stuart G.J. (2007). Axon initial segment Kv1 channels control axonal action potential waveform and synaptic efficacy. *Neuron*. 55:633-647.
- Kortekaas P. y Wadman W.J. (1997). Development of HVA and LVA calcium currents in pyramidal CA1 neurons in the hippocampus of the rat. *Dev. Brain. Res.* 101:139-147.
- Lamas J.A., Reboreda A. y Codesido V. (2002). Ionic basis of the resting membrane potential in cultured rat sympathetic neurons. *NeuroReport*. 13:1-7.
- Lancaster B. y Adams P.R. (1986). Calcium-dependent current generating the afterhyperpolarization of hippocampal neurons. *J. Neurophysiol.* 55:1268-82.
- Lancaster B. y Nicoll R.A. (1987). Properties of two calcium-activated hyperpolarizations in rat hippocampal neurons. *J. Physiol.* 389:187-203.
- Lazar M.A., Berrodin T.J. y Harding H.P. (1991). Differential DNA binding by monomeric, homodimeric, and potentially heteromeric forms of the thyroid hormone receptor. *Mol. Cell Biol.* 11:5005-5015.
- Lee J.H., Gomora J.C., Cribbs L.L. y Pérez-Reyes E. (1999). Nickel block of three cloned T-type calcium channels: low concentrations selectively block  $\alpha 1H$ . *Biophys. J.* 77:3034-3042.
- Leonard J.L. (2008). Non-genomic actions of thyroid hormone in brain development. *Steroids*. 73:1008-1012.
- Lesage F. (2003). Pharmacology of neuronal background potassium channels. *Neuropharmacol.* 44:1-7.
- Leung L.W. y Yim C.Y. (1991). Intrinsic membrane potential oscillations in hippocampal neurons in vitro. *Brain. Res.* 553:261-274.

- Lesage F. y Lazdunski M. (2000). Molecular and functional properties of two pore-domain potassium channels. *Am. J. Physiol.* 279:793-801.
- Lisman J. E. (1997). Bursts as a unit of neural information: making unreliable synapses reliable. *Trends. Neurosci.* 20: 38-43.
- Llinás R.R. (1988). The intrinsic electrophysiological properties of mammalian neurons: insights into central nervous system function. *Science.* 232:405-419.
- Llinás R. y Yarom Y. (1981). Properties and distribution of ionic conductances generating electroresponsiveness of mammalian inferior olivary neurones in vitro. *J. Physiol.* 315:569-584.
- Llinás R. y Jahnsen H. (1982). Electrophysiology of mammalian thalamic neurones in vitro. *Nature.* 297: 406-408.
- Locke R.E. y Nerbonne J.M. (1997). Three kinetically distinct Ca<sup>2+</sup>-independent depolarization-activated K<sup>+</sup> currents in callosal-projecting rat visual cortical neurons. *J. Neurophysiol.* 78:2309-2320.
- Lopez de Armentia M., Jancic D., Olivares R., Alarcon J.M., Kandel E.R. y Barco A. (2007). cAMP response element-binding protein-mediated gene expression increases the intrinsic excitability of CA1 pyramidal neurons. *J. Neurosci.* 27:13909-13918.
- Lorente de Nó R. (1934). Studies on the structure of the cerebral cortex II. Continuation of the study of the Ammonic system. *J. Psychol. Neurol.* 46:113-117.
- Lory P., Bidaud I. y Chemin J. (2006). T-type calcium channels in differentiation and proliferation. *Cell Calcium.* 40:135-146.
- Losonczy A. y Magee J.C. (2006). Integrative properties of radial oblique dendrites in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Neuron.* 50:291-307.

Lotshaw D.P. (2007). Biophysical, pharmacological, and functional characteristics of cloned and native mammalian two-pore domain K<sup>+</sup> channels. *Cell Biochem. Biophys.* 47:209-256.

Ma M. y Koester J. (1996). The role of K<sup>+</sup> currents in frequency dependent spike broadening in aplysia R20 neurons: a dynamic clamp analysis. *J. Neurosci.* 16:4089-4101.

Madeira M.D. y Paula-Barbosa M.M. (1993). Reorganization of mossy fiber synapses in male and female hypothyroid rats: a stereological study. *J. Comp. Neurol.* 337:334-352.

Madeira M.D., Cadete-Leite A., Andrade J.P. y Paula-Barbosa M.M. (1991). Effects of hypothyroidism upon the granular layer of the dentate gyrus in male and female adult rats: a morphometric study. *J. Comp. Neurol.* 314:171-186.

Madeira M.D., Sousa N., Lima-Andrade M.T., Calheiros F., Cadete-Leite A. y Paula-Barbosa M.M. (1992). Selective vulnerability of the hippocampal pyramidal neurons to hypothyroidism in male and female rats. *J. Comp. Neurol.* 322:501-518.

Maffie J. y Rudy B. (2008). Weighing the evidence for a ternary protein complex mediating A-type K<sup>+</sup> currents in neurons. *J. Physiol.* 586:5609-5623.

Magee J.C. y Carruth M. (1999). Dendritic voltage-gated ion channels regulate the action potential firing mode of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J. Neurophysiol.* 82:1895-1901.

Malenka R. C. y Bear M. F. (2004). LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron.* 44:5-21.

Malinow R. y Malenka R. C. (2002). AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.* 25:103-126.

Marder E. y Goaillard J.M. (2006). Variability, compensation and homeostasis in neuron and network function. *Nature Rev. Neurosci.* 7:563-574.

Martina M., Schultz J.H., Ehmke H., Monyer H. y Jonas P. (1998). Functional and molecular differences between voltage-gated K<sup>+</sup> channels of fast-spiking interneurons and pyramidal neurons of rat hippocampus. *J. Neurosci.* 18:8111-8125.

Matthews G.G. (1989). "Fisiología celular del nervio y el músculo". Ed. Interamericana-McGraw-Hill.

McKay B.E., McRory J.E., Molineux M.L., Hamid J., Snutch T.P., Zamponi G.W. y Turner R.W. (2006). CaV3 T-type calcium channel isoforms differentially distribute to somatic and dendritic compartments in rat central neurons. *Eur. J. Neurosci.* 24:2581-2594.

Metz A.E., Jarsky T., Martina M. y Spruston N. (2005). R-type calcium channels contribute to afterdepolarization and bursting in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J. Neurosci.* 25:5763-5773.

Metz A.E., Spruston N. y Martina M. (2007). Dendritic D-type potassium currents inhibit the spike afterdepolarization in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J. Physiol.* 581:175-187.

Milinar B. y Enyeart J.J. (1993). Block of current through T-type calcium channels by trivalent metal cations and nickel in neural rat and human cells. *J. Physiol.* 469:639-652.

Millar J.A., Barrat L., Southan A.P., Page K.M., Fyffe R.E.W., Robertson B. y Mathie A. (2000). A functional role for the two-pore domain potassium channel TASK-1 in cerebellar granule neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:3614-3618.

Mitterdorfer J. y Bean B.P. (2002). Potassium currents during the action potential of hippocampal CA3 neurons. *J. Neurosci.* 22:10106-10115.

Moody W. J. (1998). The development of voltage-gated ion channels and its relation to activity-dependent development events. *Curr. Top. Dev. Biol.* 39:159-185.

- Morin F., Beaulieu C. y Lacaille J.C. (1998). Cell-specific alterations in synaptic properties of hippocampal CA1 interneurons after kainate treatment. *J. Neurophysiol.* 80:2836-2847.
- Morreale de Escobar G., Obregon M.J., Ruiz de Oña C. y Escobar del Rey F. (1988). Transfer of thyroxine from the mother to the rat fetus near term: effects on brain 3,5,3'-triiodothyronine deficiency. *Endocrinol.* 122:1521-1531.
- Morris R.G.M. y Frey U. (1997). Hippocampal synaptic plasticity: role in spatial learning or the automatic recording of attended experience?. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 352:1489-1503.
- Morris R.G.M., Garrud P., Rawlins J.N.P. y O'Keefe J. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature.* 297:681-683.
- Moyer J.R., Deyo R.A. y Disterhoft J.F. (1990). Hippocampectomy disrupts trace eyeblink conditioning in rabbits. *Behav. Neurosci.* 104:243-252.
- Moyer J.R., Thompson L.T. y Disterhoft J.F. (1996). Trace eyeblink conditioning increases CA1 excitability in a transient and learning-specific manner. *J. Neurosci.* 16:5536-5546.
- Mulle C., Madariaga A. y Deschênes M. (1986). Morphology and electrophysiological properties of reticularis thalami neurons in cat: in vivo study of a thalamic pacemaker. *J. Neurosci.* 6:2134-2152.
- Muller R.U., Kubie J.L. y Ranck J.B.J. (1987). Spatial firing patterns of hippocampal complex-spike cells in a fixed environment. *J. Neurosci.* 7:1935-1950.
- Nadal M.S., Ozaita A., Amarillo Y., de Miera E.V., Ma Y., Mo W., Goldberg E.M., Misumi Y., Ikehara Y., Neubert T.A. y Rudy B. (2003). The CD26-related dipeptidyl aminopeptidase-like protein DPPX is a critical component of neuronal A-type K<sup>+</sup> channels. *Neuron.* 37:449-61.

Narahashi T., Tsunoo A. y Yoshii M. (1987). Characterization of two types of calcium channels in mouse neuroblastoma cells. *J. Physiol.* 383:231-249.

Narayanan R., Dougherty K.J. y Johnston D. (2010). Calcium store depletion induces persistent perisomatic increases in the functional density of h channels in hippocampal pyramidal neurons. *Neuron.* 68:921-935.

Neher E. y Sakaba T. (2008). Multiple roles of calcium ions in the regulation of neurotransmitter release. *Neuron.* 59:861-872.

Nelson S.B. y Turrigiano G.G. (2008). Strength through diversity. *Neuron.* 60: 477-482.

Nicholson J.L. y Altman J. (1972). The effects of early hypo- and hyperthyroidism on the development of the rat cerebellar cortex. I. Cell proliferation and differentiation. *Brain Research.* 44:13-23.

Numann R.E., Wadman W.J. y Wong R.K. (1987). Outward currents of single hippocampal cells obtained from the adult guinea-pig. *J. Physiol.* 393:331-353.

Núñez J., Couchie D., Aniello F. y Bridoux A.M. (1991). Regulation by thyroid hormone of microtubule assembly and neuronal differentiation. *Neurochem. Res.* 16:975-982.

Núñez J., Couchie D., Aniello F. y Bridoux A.M. (1992). Thyroid hormone effects on neuronal differentiation during brain development. *Acta Med. Austriaca.* 19:36-39.

Obregon M.J., Mallol J., Pastro R., Morreale de Escobar G. y Escobar del Ray F. (1984). L-thyroxine and 3,5,3'-triiodo-L-thyronine in rat embryos before onset of fetal thyroid function. *Endocrinol.* 114:305-307.

Oh M.M., Kuo A.G., Wu W.W., Sametsky E.A. y Disterhoft J.F. (2003). Watermaze learning enhances excitability of CA1 pyramidal neurons. *J. Neurophysiol.* 90:2171-2179.

Oh M.M., McKay B.M., Power J.M. y Disterhoft J.F. (2009). Learning-related postburst afterhyperpolarization reduction in CA1 pyramidal neurons is mediated by protein kinase A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 106:1620-1625.

Oh-Nishi A., Saji M., Furudate S.I. y Suzuki N. (2005). Dopamine D(2)-like receptor function is converted from excitatory to inhibitory by thyroxine in the developmental hippocampus. *J. Neuroendocrinol.* 17:836-845.

Oklund S. y Timiras P.S. (1977). Influences of thyroid levels in brain ontogenesis *in vivo* and *in vitro*. In: Grave, G.D. (Ed.). Thyroid hormones and brain development. *New York. Raven press.* 33-47.

O'Leary T., van Rossum M.C. y Wyllie D.J. (2010). Homeostasis of intrinsic excitability in hippocampal neurones: dynamics and mechanism of the response to chronic depolarization. *J. Physiol.* 588:157-170.

Oliet S.H., Malenka R.C. y Nicoll R.A. (1997). Two distinct forms of long-term depression coexist in CA1 hippocampal pyramidal cells. *Neuron.* 18:969-982.

Oppenheimer J.H. y Schwartz H.L. (1997). Molecular basis of thyroid hormone-dependent brain development. *Endocr. Rev.* 18:462-475.

Pan E. y Colbert C.M. (2001). Subthreshold inactivation of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> channels supports activity-dependent enhancement of back-propagating action potentials in hippocampal CA1. *J. Neurophysiol.* 85:1013-1016.

Park J., Kang H., Moon H., Huh S., Jeong S., Soldatov N. y Lee J. (2006). Activation of protein kinase C augments T-type Ca<sup>2+</sup> channel activity without changing channel surface density. *J. Physiol.* 577:513-523.

Patel A.J. y Honoré E. (2001). Properties and modulation of mammalian 2P domain K<sup>+</sup> channels. *Trends Neurosci.* 24:339-346.

Pérez-Reyes E. (2003). Molecular physiology of low-voltage-activated T-type calcium channels. *Physiol. Rev.* 83:117-161.

Pike F.G., Meredith R.M., Olding A.W.A. y Paulsen O. (1999). Postsynaptic bursting is essential for 'Hebbian' induction of associative long-term potentiation at excitatory synapses in rat hippocampus. *J. Physiol.* 518:571-576.

Pipaon C., Santos A. y Pérez-Castillo A. (1992) Thyroid hormone up-regulates NGFI-A gene expression in rat brain during development. *J. Biol. Chem.* 267:21-23.

Pokorny J. y Yamamoto T. (1981a). Postnatal ontogenesis of hippocampal CA1 area in rats. I. Development of dendritic arborisation in pyramidal neurons. *Brain. Res. Bull.* 7:113-120.

Pokorny J. y Yamamoto T. (1981b). Postnatal ontogenesis of hippocampal CA1 area in rats. II. Development of ultrastructure in stratum lacunosum and moleculare. *Brain. Res. Bull.* 7:121-130.

Pongs O. y Schwarz J.R. (2010), Ancillary subunits associated with voltage-dependent K<sup>+</sup> channels. *Physiol. Rev.* 90:755-796.

Pongs O., Leicher T., Berger M., Roeper J., Bähring R., Wray D., Giese K.P., Silva A.J. y Storm J.F. (1999). Functional molecular aspects of voltage-gated K<sup>+</sup> channel beta subunits. *Ann. NY Acad. Sci.* 868:344-55.

Porterfield S.P. y C.E. Hendrich (1993). The role of thyroid hormones in prenatal and neonatal neurological development- current perspectives. *Endocr. Rev.* 14:94-106.

Potthoff O. y Dietzel I.D. (1997). Thyroid hormone regulates Na<sup>+</sup> currents in cultured hippocampal neurons from postnatal rats. *Proc. R. Soc. Lond.* 264:367-373.

Puia G. y Losi G. (2011). Thyroid hormones modulate GABA<sub>A</sub> receptor-mediated currents in hippocampal neurons. *Neuropharmacol.* 60:1254-1261.

Rami A., Rabié A. y Patel A.J. (1986a). Thyroid hormone and development of the rat hippocampus: cell acquisition in the dentate gyrus. *Neurosci.* 19:1207-1216.

- Rami A., Patel A.J. y Rabié A. (1986b). Thyroid hormone and development of the rat hippocampus: morphological alterations in granule and pyramidal cells. *Neurosci.* 19:1217-1226.
- Ramón y Cajal S. (1893). Estructura del asta de Ammon y fascia dentada. *Anal. Soc. Esp. Hist. Nat.* 22.
- Randall A.D. y Tsien R.W. (1997). Contrasting biophysical and pharmacological properties of T-type and R-type calcium channels. *Neuropharmacol.* 36:879-893.
- Reyes A. (2002). Influence of dendritic conductances on the input-output properties of neurons. *Annu. Rev. Neurosci.* 24: 653-675.
- Rhodes K.J., Carroll K.I., Sung M.A., Doliveira L.C., Monaghan M.M., Burke S.L., Strassle B.W., Buchwalder L., Menegola M., Cao J., An W.F. y Trimmer J.S. (2004). KChIPs and Kv4 $\alpha$  subunits as integral components of A-type potassium channels in mammalian brain. *J. Neurosci.* 24:7903-7915.
- Rogawski M.A. (1985). The A-current: How ubiquitous a feature of excitable cells is it?. *Trends. Neurosci.* 8:214-219.
- Rovet J.F., Ehrlich R.M. y Sorbara D.L. (1992). Neurodevelopment in infants and preschool children with congenital hypothyroidism: etiological and treatment factors affecting outcome. *J. Pediatr. Psychol.* 17:187-213.
- Safiulina V.F., Zacchi P., Tagliatela M., Yaari Y. y Cherubini E. (2008). Low expression of Kv7/M channels facilitates intrinsic and network bursting in the developing rat hippocampus. *J. Physiol.* 586:5437-5453.
- Sah P. (1996). Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> currents in neurones: types, physiological roles and modulation. *Trends. Neurosci.* 19:150-154.
- Sanabria E.R., Su H. y Yaari Y. (2001). Initiation of network bursts by Ca<sup>2+</sup>-dependent intrinsic bursting in the rat pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J. Physiol.* 532:205-216.

Sánchez-Alonso J.L., Halliwell J.V. y Colino A. (2008). ZD 7288 inhibits T-type calcium current in rat hippocampal pyramidal cells. *Neurosci. Lett.* 439:275-280.

Sánchez-Alonso J.L., Sánchez-Aguilera A., Vicente-Torres M.A. y Colino A. (2012). Intrinsic excitability is altered by hypothyroidism in the developing hippocampal CA1 pyramidal cells. *Neurosci.* 207:37-51.

Santisteban P. y Bernal J. (2005). Thyroid development and effect on the nervous system. *Rev. Endocr. Metabol. Disorders.* 6:217-228.

Santos A. y Pérez-Castillo A. (2000). Molecular mechanism of thyroid hormone action on brain development. *Recent Res. Devel. Endocrinol.* 1:59-84.

Schmitt C.A. y McDonough A.A. (1988). Thyroid hormone regulates alpha and alpha+ isoforms of Na, K-ATPase during development in neonatal rat brain. *J. Biol. Chem.* 263: 17643-17649.

Schorge S. y Walker M.C. (2009). A self-activating intrinsic brake on bursting in CA3 neurons. *J. Physiol.* 587:1143-1144.

Schwartzkroin P.A. (1975). Characteristics of CA1 neurons recorded intracellularly in the hippocampal in vitro slice preparation. *Brain. Res.* 85:423-436.

Schwartzkroin P.A. (1981). To slice or not to slice. In: Electrophysiology of isolated mammalian CNS preparation. Kerkut C.A. y Wheal H.V. (Eds.) *Academic Press. New York.* 15-50.

Selig D.K. y Malenka R.C. (1997). Extracellular field potential recording in brain slices. *Axobits.* 20:7-10.

Serodio P. y Rudy B. (1998). Differential expression of Kv4 K<sup>+</sup> channel subunits mediating subthreshold transient K<sup>+</sup> (A-type) currents in rat brain. *J. Neurophysiol.* 79:1081-1091.

Serodio P., Kentros C. y Rudy B. (1994). Identification of molecular components of A-type channels activating at subthreshold potentials. *J. Neurophysiol.* 72:1516-1529.

Serodio P., Vega-Saenz de Miera E. y Rudy B. (1996). Cloning of a novel component of A-type K<sup>+</sup> channels operating at subthreshold potentials with unique expression in heart and brain. *J. Neurophysiol.* 75:2174-2179.

Shao L.R., Halvorsrud R., Borg-Graham L. y Storm J.F. (1999). The role of BK-type Ca<sup>2+</sup>-dependent K channels in spike broadening during repetitive firing in rat hippocampal pyramidal cells. *J. Physiol.* 521:135-146.

Shibata R, Misonou H., Campomanes C.R., Anderson A.E., Schrader L.A., Doliveira L.C., Carroll K.I., Sweatt J.D., Rhodes K.J. y Trimmer J.S. (2003). A fundamental role for KChIPs in determining the molecular properties and trafficking of Kv4.2 potassium channels. *J. Biol. Chem.* 278:36445-54.

Shu Y., Yu Y., Yang J. y McCormick D.A. (2007). Selective control of cortical axonal spikes by a slowly inactivating K<sup>+</sup> current. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104:11453-11458.

Silva J.E. y Rudas P. (1990). Effects of congenital hypothyroidism on microtubule-associated protein-2 expression in the cerebellum of the rat. *Endocrinol.* 126:1276-1282.

Sinha A., Prabakaran D., Godbole M., Chattopadhyay N., Karmarkar M., Pickard M., Leonard A. y Ekins R. (1997). Thyroid hormone and brain maturation. C.E. Hendrich (Ed) *Recent. Res. Dev. Neuroendocrinol.* 1-14.

Slack J.R. y Pockett S. (1991). Cyclic AMP induces long-term increase in synaptic efficacy in CA1 region of rat hippocampus. *Neurosci. Lett.* 130:69-72

Spigelman I., Zhang L. y Carlen P.L. (1992). Patch-clamp study of postnatal development of CA1 neurons in rat hippocampal slices: membrane excitability and K<sup>+</sup> currents. *J. Neurophysiol.* 68:55-69.

Spitzer N.C. (1994). Development of voltage-dependent and ligand-gated channels in excitable membranes. *Prog. Brain. Res.* 102:169-179.

Spitzer N.C., Olson E. y Gu X. (1995). Spontaneous calcium transients regulate neuronal plasticity in developing neurons. *J. Neurobiol.* 26:316-324.

Storm J.F. (1987). Action potential repolarization and a fast after-hyperpolarization in rat hippocampal pyramidal cells. *J. Physiol.* 385:733-759.

Storm J.F. (1988). Temporal integration by a slowly inactivating K<sup>+</sup> current in hippocampal neurons. *Nature.* 336:379-381.

Storm J.F. (1990). Potassium currents in hippocampal pyramidal cells. *Proc. Brain. Res.* 83: 161-187.

Storm J.F. (1993). Functional diversity of K<sup>+</sup> currents in hippocampal pyramidal neurons. *Semin. Neurosci.* 5:79-92.

Stuart G., Spruston N., Sakmann B. y Hausser M. (1997). Action potential initiation and backpropagation in neurons of the mammalian CNS. *Trends Neurosci.* 20:125-131.

Su H., Alroy G., Kirson E.D. y Yaari Y. (2001). Extracellular calcium modulates persistent sodium current-dependent burst-firing in hippocampal pyramidal neurons. *J. Neurosci.* 21:4173-4182.

Su H., Sochivko D., Becker A., Chen J., Jiang Y., Yaari Y. y Beck H. (2002). Upregulation of a T-type Ca<sup>2+</sup> channel causes a long-lasting modification of neuronal firing mode after status epilepticus. *J. Neurosci.* 22:3645-3655.

Sui L. y Gilbert M.E. (2003). Pre- and postnatal propylthiouracil-induced hypothyroidism impairs synaptic transmission and plasticity in area CA1 of the neonatal rat hippocampus. *Endocrinology.* 144:4195-4203.

Sun M.K. y Alkon D.L. (2009). Protein kinase C activators as synaptogenic and memory therapeutics. *Arch. Pharm.* 342:689-698.

Sun W., Maffie J.K., Lin L., Petralia R.S., Rudy B. y Hoffman D.A. (2011). DPP6 establishes the A-Type K<sup>+</sup> current gradient critical for the regulation of dendritic excitability in CA1 hippocampal neurons. *Neuron.* 71:1102-1115.

Swensen A.M. y Bean B.P. (2005). Robustness of burst firing in dissociated purkinje neurons with acute or long-term reductions in sodium conductance. *J. Neurosci.* 25:3509-3520.

Takahashi K., Ueno S. y Akaike N. (1991). Kinetic properties of T-type Ca<sup>2+</sup> currents in isolated rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J. Neurophysiol.* 65:148-154.

Talley E.M., Cribbs L.L. Lee J.H., Daud A., Pérez-Reyes E. y Bayliss D.A. (1999). Differential distribution of three members of a gene family encoding low voltaged-activated (T-type) calcium channels. *J. Neurosci.* 19:1895-1911.

Thompson C.C. (1996). Thyroid hormone-responsive genes in developing cerebellum include a novel synaptotagmin and a *hairless* homolog. *J. Neurosci.* 16:7832-7840.

Thompson S.M. y Wong R.K. (1991). Development of calcium current subtypes in isolated rat hippocampal pyramidal cells. *J. Physiol.* 439:671-689.

Trimmer J.S. y Rhodes K.J. (2004). Localization of voltage-gated ion channels in mammalian brain. *Annu. Rev. Physiol.* 66:477-519.

Turrigiano G.G., Abbott L. F. y Marder E. (1994). Activity-dependent changes in the intrinsic properties of cultured neurons. *Science.* 264:974-977.

Turrigiano G.G., LeMasson G. y Marder E. (1995). Selective regulation of current densities underlies spontaneous changes in the activity of cultured neurons. *J. Neurosci.* 15:3640-3652.

Van Elburg R.A. y van Ooyen A. (2010). Impact of dendritic size and dendritic topology on burst firing in pyramidal cells. *Plos Comput. Biol.* 6:1-19.

Vara H., Martinez B., Santos A. y Colino A. (2002). Thyroid hormone regulates neurotransmitter release in neonatal rat hippocampus. *Neurosci.* 110:19-28.

Vara H., Muñoz-Cuevas J. y Colino A. (2003). Age-dependent alterations of long-term synaptic plasticity in thyroid-deficient rats. *Hippocampus.* 13:816-825.

Villarroel A. (1993). Suppression of neuronal potassium A-current by arachidonic acid. *FEBS. Lett.* 335:184-188.

Wang H.X., Gerkin R.C., Nauen D.W. y Bi G.Q. (2005). Coactivation and timing-dependent integration of synaptic potentiation and depression. *Nat. Neurosci.* 8:187-193.

Wang Y., Hou Y., Dong J., Xu H., Gong J. y Chen J. (2010). Developmental Iodine deficiency and hypothyroidism reduce phosphorylation of calcium/calmodulin-dependent kinase II in the rat entorhinal cortex. *Biol. Trace. Elem. Res.* 137:353-363.

Watanabe S., Hoffman D.A., Migliore M. y Johnston D. (2002). Dendritic K<sup>+</sup> channels contribute to spike-timing dependent long-term potentiation in hippocampal pyramidal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99:8366-8371.

Weiss C., Sametsky E., Sasse A., Spiess J. y Disterhoft J.F. (2005). Acute stress facilitates trace eyeblink conditioning in C57BL/6 male mice and increases the excitability of their CA1 pyramidal neurons. *Learn. Mem.* 12:138-143.

Welsby P.J., Wang H., Wolfe J.T., Colbran R.J., Johnson M.L. y Barrett P.Q. (2003). A mechanism for the direct regulation of T-type calcium channels by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II. *J. Neurosci.* 23:10116-10121.

White G., Loveinger D.M. y Weight F.F. (1989). Transient low-threshold Ca<sup>2+</sup> current triggers burst firing through an afterdepolarizing potential in an adult mammalian neuron. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86:6802-6806.

Wilcox K.S., Gutnick M.J. y Christoph G.R. (1988). Electrophysiological properties of neurons in the lateral habenula nucleus: an in vitro study. *J. Neurophysiol.* 59:212-225.

Williams S.R. y Stuart G.J. (1999). Mechanisms and consequences of action potential burst firing in rat neocortical pyramidal neurons. *J. Physiol.* 521:467-482.

Wong R.K.S. y Prince D.A. (1981). Afterpotential generation in hippocampal pyramidal neurons. *J. Neurophysiol.* 45:86-97.

Wu R. y Barish M.E. (1992). Two pharmacologically and kinetically distinct transient potassium currents in cultured embryonic mouse hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 12:2235-2246.

Xu J., Kang N., Jiang L., Nedergaard M. y Kang J. (2005). Activity-dependent long-term potentiation of intrinsic excitability in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J. Neurosci.* 25:1750-1760.

Yaari Y., Hamon B. y Lux H.D. (1987). Development of two types of calcium channels in cultured mammalian hippocampal neurons. *Science*. 235:680-682.

Yue C. y Yaari Y. (2004). KCNQ/M channels control spike afterdepolarization and burst generation in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 24:4614-4624.

Yue C. y Yaari Y. (2006). Axo-somatic and apical dendritic Kv7/M channels differentially regulate the intrinsic excitability of adult rat CA1 pyramidal cells. *J. Neurophysiol.* 95:3480-3495.

Yue C., Remy S., Su H., Beck H. y Yaari Y. (2005). Proximal persistent Na<sup>+</sup> channels drive spike afterdepolarizations and associated bursting in adult CA1 pyramidal cells. *J. Neurosci.* 25:9704-9720.

Yunker A.M.R., Sharp A.H., Sundarraj S., Ranganathan V., Copeland T.D. y McEnery M.W. (2003). Immunological characterization of T-type voltage-dependent calcium channel cav3.1 (alpha1G) and cav3.3 (alpha1L) isoforms reveal differences in their localization, expression, and neural development. *Neurosci.* 117:321-335.

Zeng H., Chattarji S., Barbosie M., Rondi-Reig L., Philpot B.D., Miyakawa T., Bear M.F. y S. Tonegawa (2001). Forebrain-specific calcineurin knockout selectively impairs bidirectional synaptic plasticity and working/episodic-like memory. *Cell.* 107:617-629.

Zhang H., Lin N., Dong Y., Su Q. y Luo M. (2011). Effect of perinatal thyroid hormone deficiency on expression of rat hippocampal conventional protein kinase C isozymes. *Mol. Cell Biochem.* 353:65-71.

Zhang J. y Lazar M.A. (2000). The mechanism of action of thyroid hormones. *Annu. Rev. Physiol.* 62:439-466.

Zhang W. y Linden D.J. (2003). The other side of the engram: experience-driven changes in neuronal intrinsic excitability. *Nat. Rev. Neurosci.* 4:885-900.

Zoeller R.T., Dowling A.L.S., Herzig C.T.A., Iannacone E.A., Gauger K.J. y Bansal R. (2002). Thyroid hormone, brain development, and the environment. *Environ. Health. Perspect.* 110:355-361.

Zucker R.S. y Regehr W.G. (2002). Short-term synaptic plasticity. *Annu. Rev. Physiol.* 64:355-405.