



Cambios en las propiedades electrofisiológicas de las neuronas piramidales de la capa V de la corteza motora primaria durante el desarrollo postnatal

Universidad de Sevilla, Facultad de Farmacia

Patricia Pérez García



Trabajo Fin de Grado de carácter experimental

Grado en Farmacia

Cambios en las propiedades electrofisiológicas de las neuronas piramidales de la capa V de la corteza motora primaria durante el desarrollo postnatal

Autora: Patricia Pérez García

Tutores: Dra. Livia Carrascal Moreno, Dr. Pedro Núñez Abades

Universidad de Sevilla, Facultad de Farmacia

Departamento de Fisiología

Sevilla, junio 2020

RESUMEN

Las neuronas piramidales de la capa V de la corteza motora primaria son una población de interés por su implicación en enfermedades neurodegenerativas como la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), ya que se trata de una de las poblaciones más afectadas por el deterioro progresivo e irreparable que caracteriza a esta enfermedad. Mediante experimentos de patch clamp en configuración de célula entera (*whole-cell*) se estudiaron cómo cambian las propiedades electrofisiológicas de estas células durante el desarrollo postnatal normal, desde el nacimiento hasta el comienzo de la edad adulta, usando como modelo ratas Wistar de ambos sexos. Así, se encontraron cambios tanto en las propiedades pasivas de membrana como en las propiedades del potencial de acción y propiedades repetitivas de disparo, que caracterizan las propiedades activas de membrana. El potencial de membrana en reposo se hiperpolarizó durante el desarrollo postnatal; la resistencia disminuyó, principalmente en las etapas tempranas del desarrollo, y no fue hasta la edad adulta cuando se dio la aparición de *sag*; la disminución en la resistencia se acompañó del aumento de la reobase, mientras que el voltaje umbral permaneció constante durante el desarrollo, lo que resultó en una disminución de la excitabilidad celular; por otra parte, el voltaje de despolarización aumentó como consecuencia de la hiperpolarización celular con el desarrollo. La amplitud del potencial de acción aumentó, mientras que su duración disminuyó. Por último, mientras que la frecuencia máxima de disparo y rango de trabajo aumentaron, la ganancia disminuyó durante el desarrollo postnatal. Sin embargo, estos cambios ocurren de forma distinta en las distintas poblaciones neuronales, y tampoco se dan en la misma magnitud ni periodo de tiempo, lo que nos lleva a la conclusión de que los cambios electrofisiológicos que se dan durante el desarrollo postnatal son únicos para cada población.

Palabras clave: Desarrollo postnatal, neuronas piramidales, corteza motora primaria, patch clamp

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| Introducción | 3 |
| Materiales y métodos | 8 |
| Sujetos experimentales | 8 |
| Obtención de las rodajas cerebrales | 8 |
| Preparación de los microelectrodos de registro..... | 10 |
| Registros electrofisiológicos de patch clamp en configuración de célula entera o <i>whole-cell</i> | 11 |
| Análisis estadístico..... | 15 |
| Resultados | 15 |
| Propiedades pasivas de membrana..... | 15 |
| Propiedades activas de membrana..... | 17 |
| Propiedades del potencial de acción..... | 17 |
| Propiedades repetitivas de disparo | 18 |
| Discusión..... | 20 |
| Conclusiones | 25 |
| Bibliografía | 26 |

INTRODUCCIÓN

La corteza cerebral es una compleja estructura de unos 2-3 milímetros de grosor que cubre toda la superficie del cerebro de los vertebrados, resultando, pese a su pequeño grosor, en una estructura con un área de hasta varios cientos de centímetros cuadrados (Shipp, 2007). Pese a que el grosor de dicha estructura apenas varía entre las distintas especies, consigue aumentar de complejidad y tamaño relativo a medida que se asciende en la cadena evolutiva mediante el aumento de las circunvoluciones cerebrales, llegando a su máximo en los mamíferos y destacando, entre ellos, los primates superiores, especialmente el hombre (Kandel, 2013). La neocorteza, el área más evolucionada de la corteza cerebral, se organiza en capas que interactúan consigo mismas y con el resto del Sistema Nervioso Central (SNC), llevando a cabo las funciones ejecutivas y funciones mentales superiores y siendo también la responsable de la consciencia (Valverde, 2002).

Así, las células gliales, neuronas y fibras nerviosas que constituyen la neocorteza se disponen en seis capas que se diferencian tanto en las células que contienen como en la densidad de las mismas, siendo la capa I la más externa y la VI la más profunda y que constituye el límite entre la sustancia gris y la blanca (Brodmann, 2006). La capa I o molecular apenas contiene células, sino que la conforman las dendritas y axones de células de capas subyacentes que la atraviesan para llegar a otras áreas de la corteza, donde establecen conexiones. La capa II o capa granular externa, así como la capa III o capa piramidal externa, contienen mayormente los somas de neuronas piramidales de pequeño (capa II) y mediano tamaño (capa III), conteniendo además la capa II células estrelladas de pequeño tamaño. La capa IV contiene una gran densidad de células granulares, por lo que frecuentemente es denominada capa granular interna; esta capa, fácilmente identificable, recibe la mayoría de las aferencias procedentes del tálamo. La capa V o capa piramidal interna tiene células piramidales de gran tamaño, las cuales suponen el mayor número de eferencias que parten de la corteza. La capa más interna, la capa VI o polimórfica, supone el límite con la sustancia blanca y recibe este nombre por su gran diversidad celular. Brodmann, además de definir las capas que componen la neocorteza, observó cómo el espesor, densidad y composición de cada una de ellas variaban a lo largo de la extensión de la corteza y, en base a estas variaciones, dividió el cerebro en 47 regiones, conocidas hoy en día como áreas de Brodmann.

En cuanto a la organización funcional de la corteza, esta se puede dividir en áreas especializadas en diversas funciones. La planificación, control y ejecución de los movimientos voluntarios es llevada a cabo por la corteza motora, la cual implica a la corteza premotora, corteza motora primaria y área motora suplementaria. La corteza motora primaria, área M1 o área 4 de Brodmann, se sitúa en el lóbulo frontal, justo delante del surco central, entre la corteza premotora

(M2) y la corteza somatosensorial (S1) (Stanfield 2011). Se encarga principalmente del control de la ejecución de los movimientos voluntarios mediante una organización topográfica, al igual que ocurre con la corteza somatosensorial (Schellekens et al., 2018), lo que implica que regiones específicas de la corteza controlan la actividad de grupos específicos musculares (Figura 1.A).

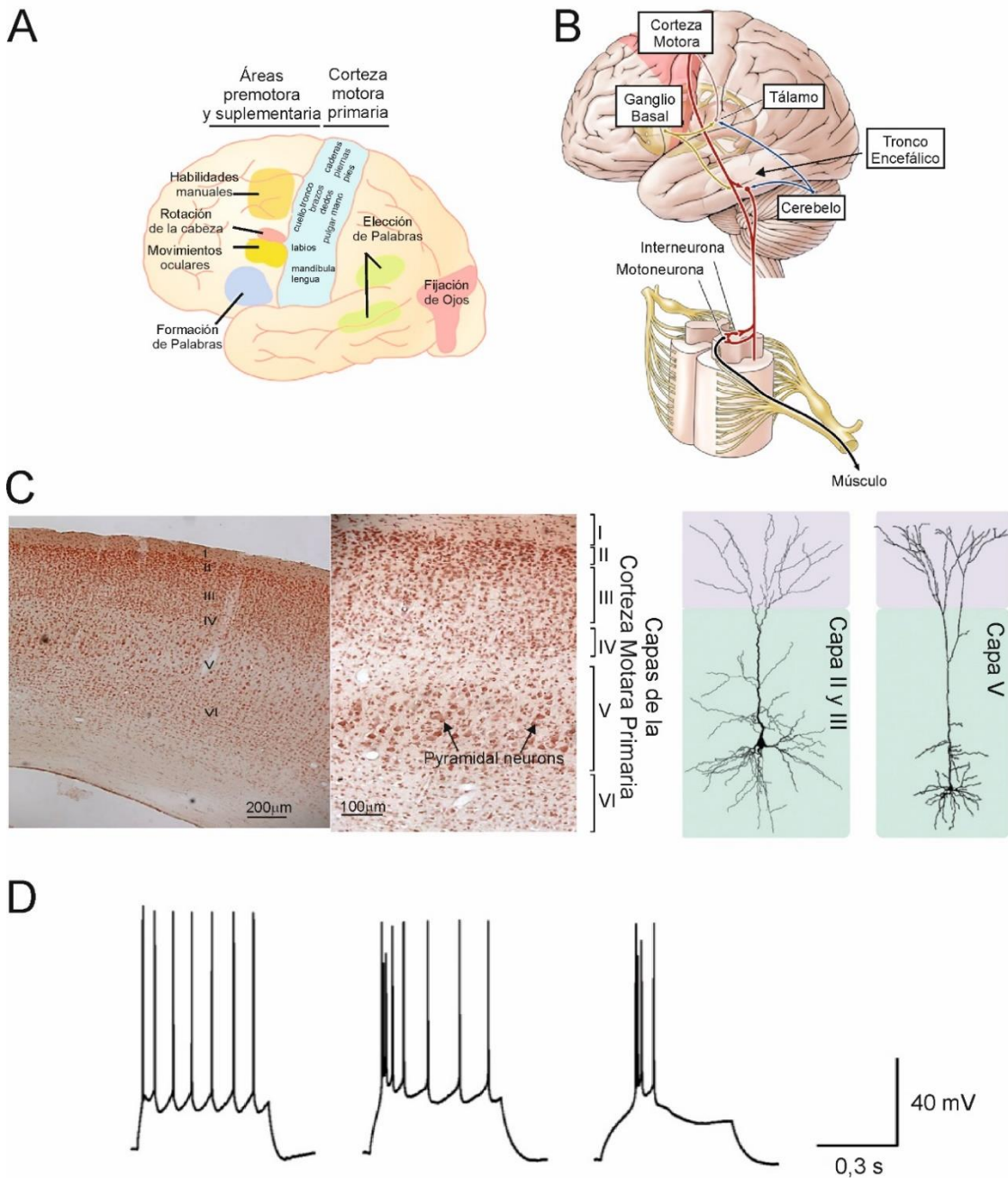


Figura 1. Corteza motora y neuronas piramidales. A. Áreas motoras corticales y representación de los distintos músculos del cuerpo en la corteza motora. Modificado de Hall, 2016. B. Vía motora corticoespinal. Modificado de Silverthorn et al., 2014. C. Capas de la corteza motora y morfología de las neuronas piramidales. Izquierda. Corte transversal de la corteza cerebral y tinción con rojo neutro mostrando las distintas capas de la corteza motora primaria a mayor y menor aumento. Derecha. Imagen mostrando la morfología típica de una neurona piramidal de la capa II/III y otra de la capa V. Tomada de Spruston et al., 2008 D. Patrones de disparo característicos de las neuronas piramidales. Tomado de Zaitsev et al., 2012.

La corteza motora primaria recibe aferencias sensoriales a través de centros corticales y subcorticales y envía eferencias excitadoras mediante los axones de las neuronas piramidales glutamatérgicas, siendo la principal eferencia la de la vía corticoespinal. En esta vía los axones neuronales atraviesan la sustancia blanca hasta la cápsula interna, descendiendo luego por el tronco encefálico hasta la médula espinal. El 90% de los axones de esta vía decusan en el bulbo raquídeo, en la llamada decusación piramidal (Kandel, 2013) (Figura 1.B).

De las seis capas que componen la corteza cerebral (Figura 1.C. izquierda), en la corteza motora predominan las capas I, III y V. Las capas III y V están conformadas por los cuerpos celulares de las neuronas piramidales, las cuales suponen del 70 al 85% del total de la población neuronal de la corteza. Estas neuronas se caracterizan por presentar un soma triangular del que parte una dendrita apical que proyecta hacia la superficie cortical y que presenta ramificaciones que forman un penacho en la terminación de la misma, así como dendritas basales de menor longitud; sin embargo, la morfología de dichas neuronas puede variar dependiendo de la capa en la que se encuentren (Spruston, 2008). Así, las neuronas piramidales de la capa V, en las que nos centramos en este estudio, presentan dendritas apicales más largas y con menos bifurcaciones que, por ejemplo, las neuronas piramidales de las capas II y III, así como un soma de mayor tamaño (Figura 1.C. derecha).

Sin embargo, distintos estudios demuestran que no todas las células piramidales dentro de una misma capa cumplen las mismas características, encontrándose tanto diferencias morfológicas como electrofisiológicas (Figura 1.D). En estos estudios se describen principalmente dos grandes grupos de neuronas piramidales: un primer grupo que muestra un patrón de disparo en brote, constituido por neuronas piramidales con una dendrita gruesa y con un gran penacho apical que proyecta hacia estructuras subcorticales, y un segundo grupo de neuronas que muestran un patrón de disparo regular, con dendritas menos gruesas y sin penacho apical, así como un soma más redondeado, que proyectan a estructuras corticales, mostrando además una resistencia y una constante de tiempo mayores que aquellas que disparan en brote (Kasper et al., 1994). Ambos grupos cumplirían además distintas funciones: mientras que las neuronas piramidales que muestran patrones de disparo en brote se encargarían de la amplificación y sincronización de las aferencias, aquellas que disparan regularmente estarían implicadas en procesos de retroalimentación excitadora que implican a las neuronas de todas las capas neocorticales, mientras que recibirían aferencias inhibitorias ortodrómicas más efectivas que las neuronas que disparan en brote (Chagnac-amitai et al., 1990). En estudios más recientes (Dégenétais et al., 2002; Zaitsev et al., 2012) se distinguen hasta tres grupos. Sin embargo, en nuestro estudio no se distinguieron entre subpoblaciones neuronales, ya que no se encontraron grandes diferencias en las propiedades repetitivas de las neuronas estudiadas.

Desde que Luigi Galvani descubrió en el siglo XVIII que tanto el músculo como las células nerviosas producían electricidad, el esfuerzo e interés de muchos científicos se centró en cómo las células producían y utilizaban dicha electricidad, comenzando así la investigación fisiológica del sistema nervioso, aunque no fue hasta el siglo XIX cuando comenzó el desarrollo de la electrofisiología moderna (Kandel, 2013), la cual nos ha permitido conocer en profundidad los mecanismos de generación, transmisión y procesamiento de señales eléctricas. Con estos avances, ha surgido también la duda de cómo dichas características se modifican a lo largo del desarrollo postnatal y de si estas modificaciones ocurren de manera similar en todas las poblaciones neuronales. Diversos estudios se centran en los cambios de distintas poblaciones de motoneuronas, como son las neuronas del nervio hipogloso (Berger et al., 1995; Viana et al., 1994), geniogloso (Nunez-Abades et al., 1993) y oculomotor (Carrascal et al., 2005). En concreto, en este estudio intenta dilucidar los cambios que ocurren de forma normal durante el desarrollo postnatal en las células piramidales de la capa V de la corteza motora primaria, las cuales sufren un deterioro progresivo e irreparable, al igual que otras motoneuronas superiores e inferiores, en enfermedades como la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), viéndose afectadas, al igual que otros parámetros, sus propiedades eléctricas de membrana (Fogarty et al., 2015; Quinlan et al., 2011).

La Esclerosis Lateral Amiotrófica es una enfermedad neurodegenerativa que, aunque con una prevalencia no demasiado alta (2-11 casos/100.000 habitantes), causa un gran impacto en pacientes y familiares, ya que provoca una debilidad y atrofia progresiva en los músculos de las extremidades, tórax, abdomen y músculos bulbares, que suele llevar a la muerte por insuficiencia respiratoria. Presenta una prevalencia algo mayor en hombres que en mujeres y la edad de aparición va desde los 47 a los 63 años. La enfermedad fue descrita por Jean Martin Charcot, quien también le puso nombre en 1874; sin embargo, a día de hoy sigue sin esclarecerse la etiopatogenia de la enfermedad (Zapata-Zapata et al., 2016), siendo muchas las evidencias que apuntan a que la ELA es, más que una enfermedad, un síndrome clínico provocado por trastornos en el procesamiento génico, metabolismo, estrés oxidativo, transporte axonal y microambiente de las motoneuronas superiores e inferiores (Riancho et al., 2019).

Para llevar a cabo los registros de las propiedades fisiológicas en el estudio se utilizó la técnica de patch clamp en la configuración de célula entera (*whole-cell*). La técnica de patch clamp fue desarrollada por Erwin Neher y Bert Sakmann en 1976, revolucionando el campo de la electrofisiología ya que permitió no solo mejorar los registros de las propiedades eléctricas de las células, realizados hasta el momento mediante el uso de pipetas intracelulares, sino que la precisión de dicha técnica permitió por primera vez el estudio de la actividad de canales iónicos aislados, valiéndoles el Premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1991 (Polder et al., 2005).

La técnica de patch clamp se vale de una micropipeta de vidrio con una punta de estrecha abertura que se rellena con una solución de electrolitos cuya composición varía dependiendo de la modalidad de patch y del estudio a realizar. Dentro de esta pipeta se inserta un electrodo que, junto con un electrodo de referencia que se sitúa en contacto con la solución extracelular, conduce los cambios eléctricos hacia un amplificador de voltaje. Para llevar a cabo los registros, el microelectrodo debe alcanzar la célula diana, despejando el tejido a su paso mediante la aplicación de una ligera presión positiva. Cuando el electrodo se aproxima a la célula, se ejerce presión negativa para formar un sello de gran resistencia con la membrana plasmática (giga-sello) (Nowotny and Marra, 2013). Así, *patch* (parche) hace referencia al sello que forma la membrana con la pipeta, mientras que *clamp* (fijar) tiene una connotación eléctrica y se refiere a la imposición de un voltaje (*voltage-clamp*) para registrar los cambios en corriente o bien a la imposición de una corriente (*current-clamp*) para registrar los cambios en voltaje (Ypey and DeFelice, 2000).

Partiendo de la formación del giga-sello se pueden obtener distintas configuraciones, con distinto interés según el tipo de estudio. Las configuraciones principales de patch clamp son: célula adherida (*cell-attached patch*), célula entera (*whole-cell patch*), perforado en célula entera (*perforated whole-cell patch*), interior-dentro (*inside-out patch*), fuera hacia dentro (*outside-out patch*) (Cahalan and Neher, 1992; JoVE Science Education Database. Neuroscience., 2020; Sakmann and Neher, 1984).

- **Configuración de célula-adherida (*cell-attached patch*).** Es la configuración más sencilla y de la que parten las demás configuraciones, puesto que consiste simplemente en la formación del giga-sello. Como ventaja, en esta configuración se pueden registrar los cambios en corriente sin que el entorno fisiológico de la célula se vea modificado; sin embargo, cabe destacar que en esta configuración el potencial de membrana real de la célula no puede conocerse.
- **Configuración de célula entera (*whole-cell patch*).** Esta configuración se obtiene aplicando presión negativa una vez que el giga-sello se ha formado. Así, la membrana celular se rompe y el citoplasma queda en contacto con la solución que rellena el electrodo, quedando un único compartimento que permite registrar las propiedades eléctricas de la célula completa. Esta técnica presenta el inconveniente de que diluye el medio intracelular, aunque se puede paliar relleno la pipeta con una solución de fuerza iónica similar al interior celular que contenga también los mediadores celulares que mantienen la función de los canales iónicos. Una variante de este método es el **parche perforado en célula entera (*perforated whole-cell patch*)**, que se obtiene añadiendo a la micropipeta antibióticos como nistatina, gramicidina o anfotericina B, que perforan la membrana celular una vez que el

giga-sello se ha formado, lo que permite el acceso de la solución de la pipeta al interior celular, pero minimizando la dilución de este medio.

- **Configuración interior-dentro (*inside-out patch*).** En este modo se expone la cara interna de la membrana hacia la solución del baño, lo que permite el estudio de canales iónicos controlados por receptores externos y de cómo estos responden ante distintos compuestos añadidos a la solución extracelular. Para conseguir esta configuración, una vez que se ha formado el giga-sello la micropipeta es retirada rápidamente, quedando adherida solo la parte de la membrana que ha formado el sello.
- **Configuración de fuera hacia dentro (*outside-out patch*).** Esta configuración es similar a la anterior, pero permite el estudio de los canales aislados exponiendo hacia el baño su cara externa. En este caso se parte igualmente de la configuración de célula adherida o *cell-attached*, pero en lugar de retirar el microelectrodo rápidamente se hace lentamente, formándose una ampolla que se separa de la célula y deja la parte externa de los canales expuesta a la solución extracelular.

Este trabajo tiene como finalidad el estudio de los cambios electrofisiológicos que se producen en las neuronas piramidales de la capa V durante el desarrollo postnatal normal, como primer paso en la comparación con los cambios que se producen en estas neuronas cuando se ven afectadas por patologías neurodegenerativas de gran impacto, como es la Esclerosis Lateral Amiotrófica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sujetos experimentales

Para llevar a cabo los experimentos, se utilizaron e incluyeron en este estudio ratas Wistar (Figura 2.A), tanto hembras como machos, de diferentes edades comprendidas entre el día 2 postnatal y el día 40 postnatal. Todos los experimentos fueron realizados de acuerdo con las recomendaciones de la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Directiva 63/2010/UE de la Comunidad Europea y del Real Decreto Español 53/2013, así como de acuerdo con las regulaciones de la Universidad de Sevilla para el cuidado y uso de animales de laboratorio.

Obtención de las rodajas cerebrales

Para la obtención de las rodajas cerebrales que contienen la zona de estudio (Figura 2.B), es decir, la corteza motora primaria, en cuya capa V se encuentran las neuronas piramidales, se procedió como a continuación se describe, siguiendo los procedimientos utilizados con anterioridad en este grupo de estudio (Pardillo-Díaz et al., 2017).

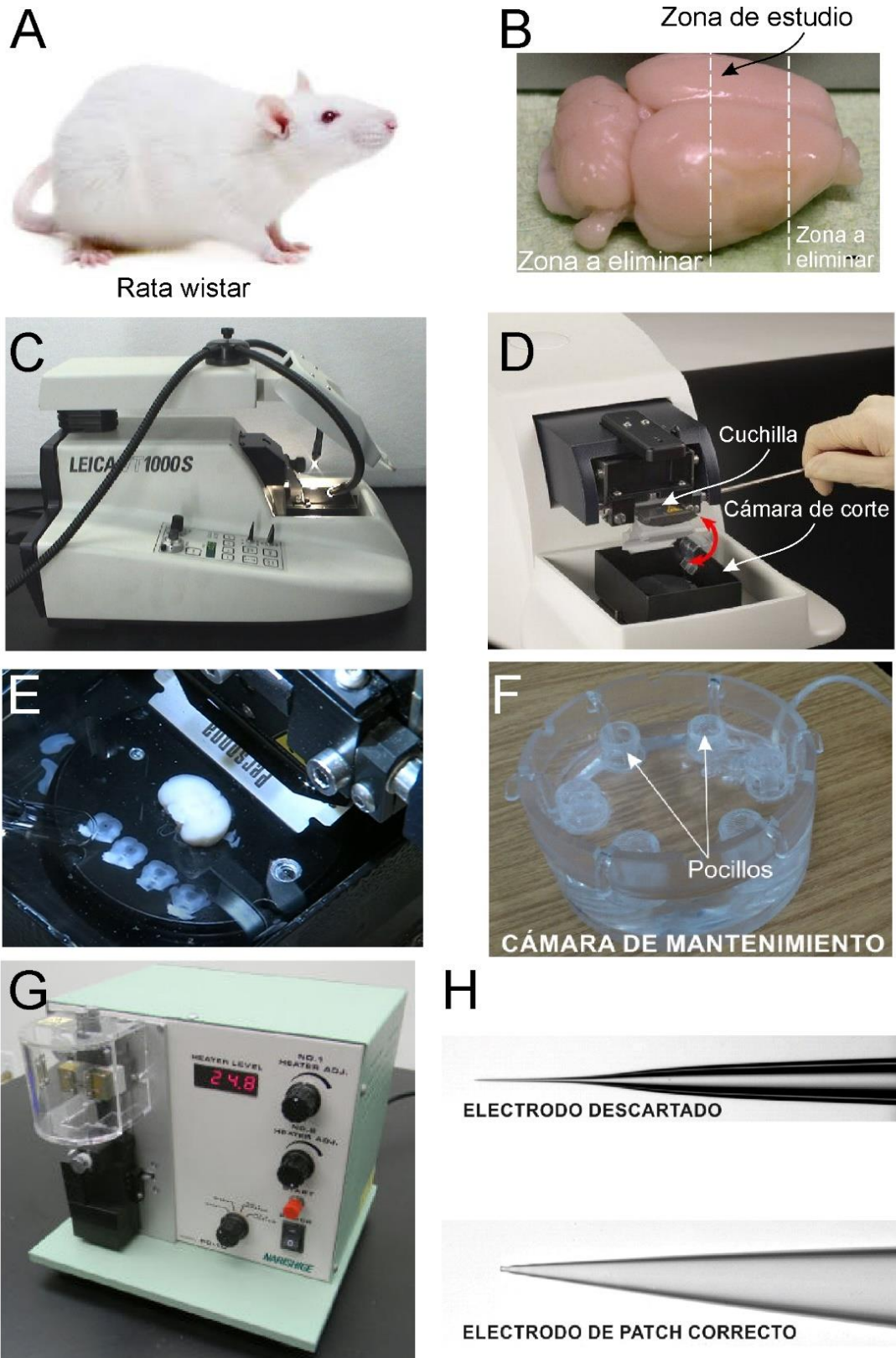


Figura 2. Modelo animal, obtención, preparación y mantenimiento de rodajas cerebrales y elaboración de microelectrodos. **A.** Modelo de estudio. **B.** Imagen mostrando la parte del cerebro de la rata que seleccionamos para el estudio. **C-E** Técnica de corte y obtención de rodajas de cerebro, mostrando el vibratomo utilizado (C), la cámara de corte (D), así como el lugar donde se coloca el cerebro y un ejemplo de obtención de rodajas (E). **F.** Fotografía mostrando la cámara de mantenimiento o incubación. **G.** Estirador de pipetas vertical. **H.** Electrodo. En la parte superior se muestra un electrodo que sería descartado en nuestro estudio por tener la punta demasiado fina, y en la parte inferior se muestra un electrodo de patch de características idóneas para realizar este proyecto.

Las ratas mayores de 10 días se anestesiaron con pentobarbital sódico (50mg/kg), asegurando que tanto el reflejo de retracción de la extremidad como el de parpadeo desaparecían; tras esto, fueron perfundidas transcardíacamente con líquido cefalorraquídeo (LCR) artificial bajo en calcio a 4°C, con el objetivo de eliminar la sangre contenida en el cerebro, mejorando la visualización de las neuronas, así como de ralentizar el metabolismo durante el proceso de obtención de las rodajas, lo que aumenta la supervivencia neuronal. Una vez perfundidos, los animales fueron decapitados y el cerebro se extrajo rápidamente, depositándose en una placa Petri que contenía la misma solución de LCR usada para la perfusión. En el caso de las ratas menores de 10 días, estas fueron decapitadas directamente; igualmente, el cerebro se extrajo rápidamente y se transfirió a una placa Petri con LCR artificial bajo en calcio a 4°C.

Una vez en la placa Petri y con la ayuda de un bisturí, se eliminó el cerebelo y la parte más rostral del telencéfalo. La porción restante que contenía la zona de estudio se cortó en rodajas transversales de 300-400 µm de grosor con ayuda de un vibrátomo (Leica VT1000 S, Leica Biosystems, UK) (Figura 2.C-E).

Aquellas rodajas que contenían corteza motora primaria fueron transferidas a los pocillos de una cámara de incubación o mantenimiento que contenía LCR artificial burbujeadado con una mezcla de gases al 95% de O₂ y 5% de CO₂, y mantenida a 37°C (Figura 2.F). Tras 30 minutos, la temperatura se disminuyó a 21°C, siendo la supervivencia de las células en estas condiciones de hasta 6 horas.

El LCR usado para el mantenimiento de las neuronas en los pocillos de la cámara, así como para la cámara de registro (Ver apartado “Registros electrofisiológicos de patch clamp en configuración de célula entera o *whole-cell*”) presentó la siguiente composición (datos en mM): 126 NaCl, 2 KCl, 1,25 Na₂HPO₄, 26 NaHCO₃, 10 C₆H₁₂O₆, 2 MgCl₂ y 2 CaCl₂. El LCR usado para la perfusión, extracción y corte del cerebro contenía una menor concentración de calcio y una mayor concentración de magnesio (datos en mM): 4 MgCl₂, 0.1 CaCl₂.

Preparación de los microelectrodos de registro

Los microelectrodos necesarios para el desarrollo de la técnica de patch clamp se encuentran unidos a un micromanipulador monitorizado (Sutter MP-225, Sutter Instrument, One Digital Drive, Novato, CA, EEUU) y están formados por un hilo conductor de plata, una micropipeta y una solución que varía según el experimento. En nuestro caso, se usó una solución de gluconato potásico, cuya composición se muestra más adelante.

Las micropipetas se prepararon a partir de capilares de borosilicato de 0.6 mm de diámetro interno y 1 mm de diámetro externo (Narishige GD-1). Para ello, se usó un estirador de pipetas vertical (PC-10, Narishige) (Figura 2.G), cuya temperatura se fue regulando hasta obtener micropipetas

con las propiedades adecuadas para el buen desarrollo de la técnica. Así, las pipetas adecuadas debían tener bordes romos no cortantes, punta firme y una resistencia comprendida entre 3 M Ω y 6 M Ω ; aquellas micropipetas con una resistencia menor (mayor apertura en la punta) dificultaban la formación del sello y hacían que, si este se formaba, fuera menos estable en el tiempo, mientras que aquellas micropipetas con una resistencia mayor (menor apertura en la punta), aunque facilitaban la formación del sello, dificultaban la rotura de la membrana para llegar a la configuración de *whole-cell* (célula entera) y facilitaban que se atascase. En la figura 2.H se muestra un ejemplo de patch descartado por ser demasiado fino (arriba) y otro con las características adecuadas para su empleo (abajo).

Las micropipetas fueron rellenas, cuidando de no dejar burbujas de aire que distorsionen las medidas, con la solución de gluconato potásico, cuya composición es la que sigue (datos en mM): 120 K-gluconato, 10 KCl, 10 fosfocreatina, 2 MgATP, 0,3 NaGTP, 0,1 EGTA, 10 ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-piperazin-1-il]etanosulfónico (HEPES); el pH se ajustó a 7,3 con KOH y la osmolaridad se ajustó a 285-290 mosmol/kg con sacarosa.

Registros electrofisiológicos de patch clamp en configuración de célula entera o *whole-cell*

Para llevar a cabo el estudio las rodajas se fueron transfiriendo de una en una desde la cámara de mantenimiento (Figura 2.F) a una cámara de registro, perfundida con LCR artificial a pH 7.4 y burbujado con una mezcla de gases 95% O₂ y 5% CO₂ mediante una bomba peristáltica (Harvard Apparatus MPII, Holliston, MA, EEUU) a una tasa de 1 mL/min. Como se muestra en la figura 3.A, dicha cámara se encuentra alojada en un microscopio Nikon Eclipse FN1 con una óptica de contraste interferencial diferencial para visualizar infrarrojo (IR-DIC) y una cámara WAT-902H2 Ultimate, situados en una mesa antivibratoria (TMC, Micro-g, Prabody, MA, EEUU) y en una jaula de Faraday que permite eliminar gran parte de las interferencias electromagnéticas del exterior.

Los registros electrofisiológicos se realizaron con un amplificador MultiClamp 700B (MultiClamp 700B, Axon Instruments, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EEUU). Todos los registros fueron depurados con un filtro Bessel de baja frecuencia a 10 kHz y los datos así obtenidos se digitalizaron con un convertidor analógico digital (Digidata 1550, Axon Instruments, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EEUU) a 20 kHz. Tanto el amplificador como el convertidor analógico digital se muestran en la figura 3.F. Los datos obtenidos se visualizaron con el programa pCLAMP 10 (Molecular Devices), se almacenaron en un ordenador (TTL computer Intel Inside Core i3) (Figura 3.G) y se analizaron mediante el software Clampfit 10.4 (Molecular Devices).

Para la localización de las células se utilizó un objetivo de aire 4x, que permitió la visualización de la zona de registro (Figura 3.D) y, una vez acotada dicha zona, se pasó a un objetivo de

inmersión en líquido 40x para localizar las células. Ambos objetivos se muestran sobre la cámara de registro en la figura 3.B. Las células fueron identificadas por su morfología característica, destacando un soma de gran tamaño y forma triangular y una gran dendrita apical que se extiende verticalmente hacia la superficie pial.

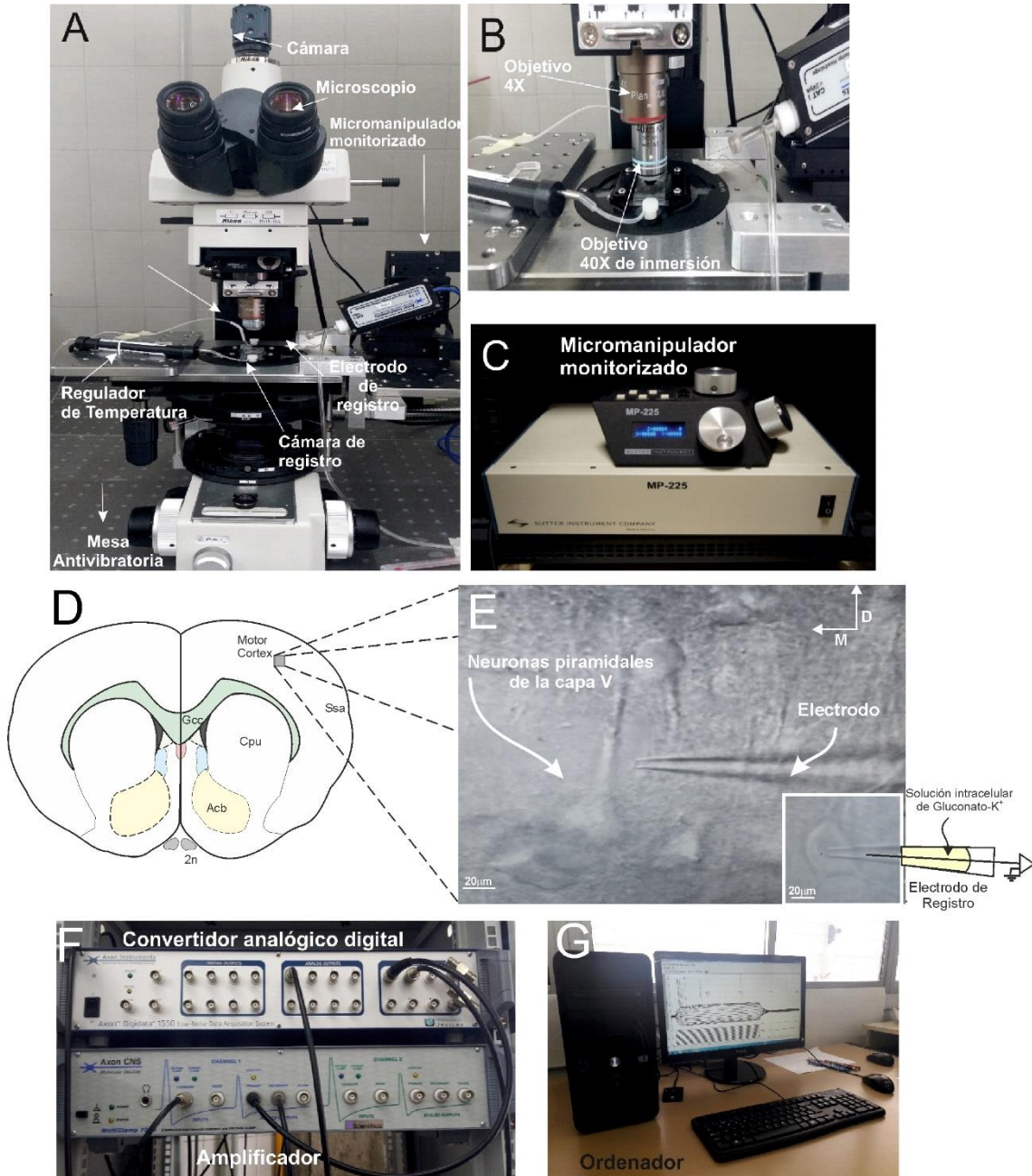


Figura 3. Sistemas de visualización, registro y almacenamiento de la señal electrofisiológica. **A.** Fotografía ilustrando los equipos necesarios para la visualización de las células y los accesorios de registro para patch clamp. **B.** Objetivos utilizados para el estudio y cámara de registro. **C.** Micromanipulador monitorizado. **D.** Esquema de la rodaja de cerebro mostrando la localizando de la corteza motora. **E.** Fotografía mostrando la aproximación del electrodo a la superficie del soma de las neuronas seleccionadas y ampliación de la neurona seleccionada, donde se puede observar el posicionamiento del electrodo sobre su superficie. En la foto D = dorsal, y M = medial. **F-G.** Fotografías ilustrando los equipos utilizados para el registro y almacenamiento de la señal electrofisiológica. Modificado de Pardillo-Diaz et al., 2017.

El microelectrodo, colocado en el correspondiente micromanipulador automático (Figura 3.C), se introdujo en la cámara de registro y se comprobó que sus características fueran las adecuadas mediante análisis visual y medida de la resistencia. Se le aplicó una ligera presión positiva para impedir que entrara en él suciedad o solución extracelular, lo que podría obturarlo, y se fue acercando lentamente hacia la célula elegida, cuidando de enfocar siempre el microscopio antes de bajar el electrodo para no romper la célula. En este punto, la corriente se ajustó para ser considerada como 0 pA y se aplicó un test consistente en pulsos cuadrados de 10 mV a 100 Hz (*Seal test*), que permitió la visualización de la formación y apertura del sello mediante cambios en la corriente. En la figura 3.E se muestran neuronas piramidales típicas de la capa V así como un microelectrodo de patch aproximándose a una de ellas; en dicha figura aparece un recuadro en el que se muestra un microelectrodo haciendo contacto con la célula.

Cuando se observó un halo blanco sobre el soma celular, producido por la aproximación de la pipeta (Figura 3.E, esquina inferior derecha), se eliminó la presión positiva, y el sello se formó automáticamente o bien mediante la aplicación de una leve presión negativa. En esta configuración, correspondiente a la de célula adherida (*cell-attached*), la línea de corriente se hace casi plana, debido a que la resistencia es de 1-100 G Ω (por ello, este sello es denominado giga-sello). En este momento el voltaje se fijó a -70 mV, potencial de membrana esperado para una célula en reposo.

Los registros se llevaron a cabo, sin embargo, en configuración *whole-cell* o célula entera, en la cual el sello formado por la membrana y la punta de la micropipeta se rompe mediante la aplicación de una presión negativa fuerte y rápida. De esta forma, el interior de la célula queda en contacto directo con el interior de la micropipeta, lo que permite la medida de los cambios eléctricos en el interior celular. Los registros en los que la resistencia de acceso fue mayor de 20-25 M Ω fueron descartados.

En este punto se fijó la corriente (*current-clamp*) y se llevaron a cabo los registros de cambios en voltaje en el interior celular. Para que fueran aceptadas en el análisis, las neuronas debían tener un potencial de membrana en reposo estable, no dar lugar a potenciales de acción espontáneos y mostrar propiedades repetitivas de disparo en respuesta a un pulso despolarizante de 1 segundo de duración. En la figura 4 se muestra esquemáticamente el montaje experimental para la visualización de las neuronas, registro y almacenamiento de los datos tal y como se ha descrito en el texto.

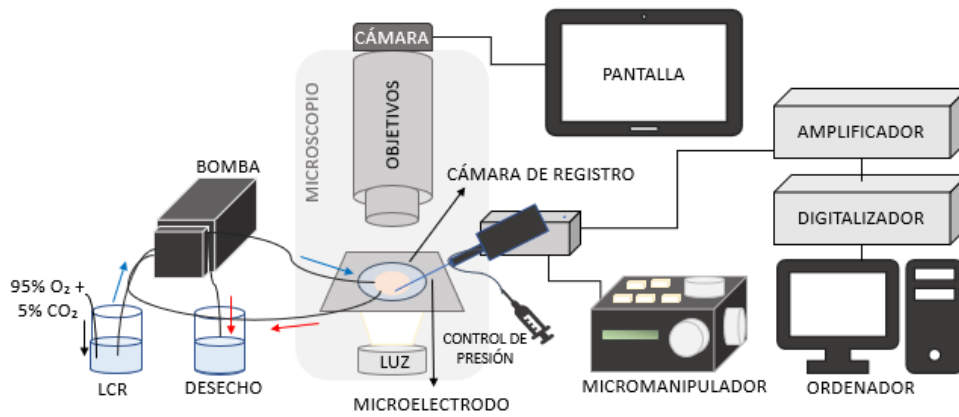


Figura 4. Esquema del montaje experimental para la identificación de las neuronas piramidales de la capa V, realización de la técnica de patch clamp, registro de las propiedades electrofisiológicas, almacenamiento y procesamiento de los datos.

Se registraron tanto propiedades pasivas (propiedades intrínsecas de membrana) como propiedades activas (propiedades del potencial de acción y propiedades repetitivas de disparo) en neuronas piramidales de la capa V de la corteza motora primaria. Para ello, se analizaron los siguientes parámetros: potencial de membrana en reposo, resistencia, reobase, voltaje umbral, voltaje de despolarización, amplitud y duración del potencial de acción, frecuencia máxima de disparo, ganancia de la frecuencia y corriente de cancelación.

El potencial de membrana en reposo se calculó como la diferencia entre los potenciales intracelulares y extracelulares tras la extracción del electrodo de registro de la célula. La resistencia de membrana o resistencia de entrada se midió mediante la inyección de pulsos cuadrados de corriente positivos y negativos (500 ms, 1 Hz, en incrementos de 10 pA) y se calculó como la pendiente de la relación corriente-voltaje, de acuerdo con la Ley de Ohm; cuando hubo evidencias de rectificación de voltaje o *sag*, para el cálculo se tomó el valor pico de voltaje. La reobase se definió como la corriente mínima que se debe aplicar para que se produzca un potencial de acción, y se midió mediante la aplicación de pulsos cuadrados de 100 ms, 1 Hz, en incrementos de 5-20 pA.

El voltaje umbral es aquel voltaje al cual se produce un potencial de acción, siendo el voltaje de despolarización el incremento de potencial necesario para alcanzar el potencial umbral; por tanto, este se pudo calcular como la diferencia entre el voltaje umbral y el potencial de membrana en reposo. La amplitud del potencial de acción se determinó como la diferencia entre el voltaje en el pico del potencial y el voltaje umbral, mientras que la duración se calculó como la anchura que presenta el potencial de acción a la mitad de la amplitud.

Las propiedades repetitivas de disparo se midieron aplicando pulsos cuadrados de corriente (1s, 0.5 Hz, en incrementos de 10-50 pA, aproximadamente 40 barridos). La frecuencia máxima de disparo se midió como el número máximo de potenciales que la célula disparó en un pulso

completo, independientemente de la intensidad de corriente. La ganancia se definió como la pendiente de la relación entre la frecuencia de disparo y la corriente aplicada. La corriente de cancelación fue aquella corriente a la cual la célula dejó de disparar potenciales de acción a lo largo de un pulso completo de 1s.

Análisis estadístico

Los animales de experimentación fueron divididos en tres grupos según su edad: neonatos (P2-7), infantiles (P11-15) y jóvenes adultos (P20-40). Los resultados fueron expresados como la media \pm el error estándar de la media, siendo n el número de células utilizadas.

Para el análisis estadístico se usó el software GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software Inc, La Jolla, EEUU). Se aplicó un test de normalidad (Shapiro-Wilk Test) para ver la distribución de los datos y se llevó a cabo un análisis de la varianza (ANOVA) de medidas repetidas para comparar las diferencias entre grupos de los distintos parámetros electrofisiológicos. Cuando se encontraron diferencias significativas, se aplicó el test de Bonferroni para realizar comparaciones pareadas entre grupos.

En todos los casos se aplicó un intervalo de confianza del 95%, por lo que dos grupos fueron considerados significativamente diferentes si $P \leq 0,05$. La correlación entre variables se midió mediante el coeficiente de correlación de Pearson (r). En las figuras y tablas, los asteriscos muestran significación estadística entre grupos de edad consecutivos, mientras que las cruces muestran significación estadística cuando se compara el primer grupo con el último.

RESULTADOS

Las neuronas registradas fueron identificadas como neuronas piramidales de la capa V en base a sus características morfológicas, como son el gran soma de forma triangular y la dendrita apical orientada dorsalmente, y se aseguró que todas ellas presentaran un potencial de membrana en reposo estable y no dieran lugar a potenciales de acción espontáneos.

Las neuronas que cumplieron estas características fueron registradas y divididas según grupos de edad en neonatos (de 2 a 7 días) e infantiles (de 11 a 15 días); 15 neuronas fueron incluidas en cada grupo. Además, se tomaron los datos de estudios previos llevados a cabo en el laboratorio sobre el mismo tipo de neuronas en ratas jóvenes adultas de 20-40 días (Pardillo-Díaz et al., 2015) (ver Tabla 1), con el objetivo de tener una visión más amplia de los cambios que ocurren en distintas propiedades de membrana durante el desarrollo postnatal.

Propiedades pasivas de membrana

Las neuronas piramidales de la corteza motora mostraron un potencial de membrana estable en todos los grupos de edad estudiados, si bien se observaron cambios en su valor medio durante el

desarrollo postnatal. En la figura 5.A se pueden observar los potenciales de membrana en reposo de tres células representativas de la población estudiada: -62 mV en la neonatal, -65 mV en la infantil y -72 mV en la joven adulta. El potencial de membrana de reposo medio (Figura 5.E) fue de -64.1 ± 1.7 mV en neonatos, -64.5 ± 1.6 mV en infantil y -70.7 ± 1.3 mV en jóvenes adultos (Tabla 1), mostrándose una hiperpolarización significativa cuando se compararon los grupos neonatal e infantil frente al de jóvenes adultos. No se encontraron diferencias significativas entre neonatos e infantiles.

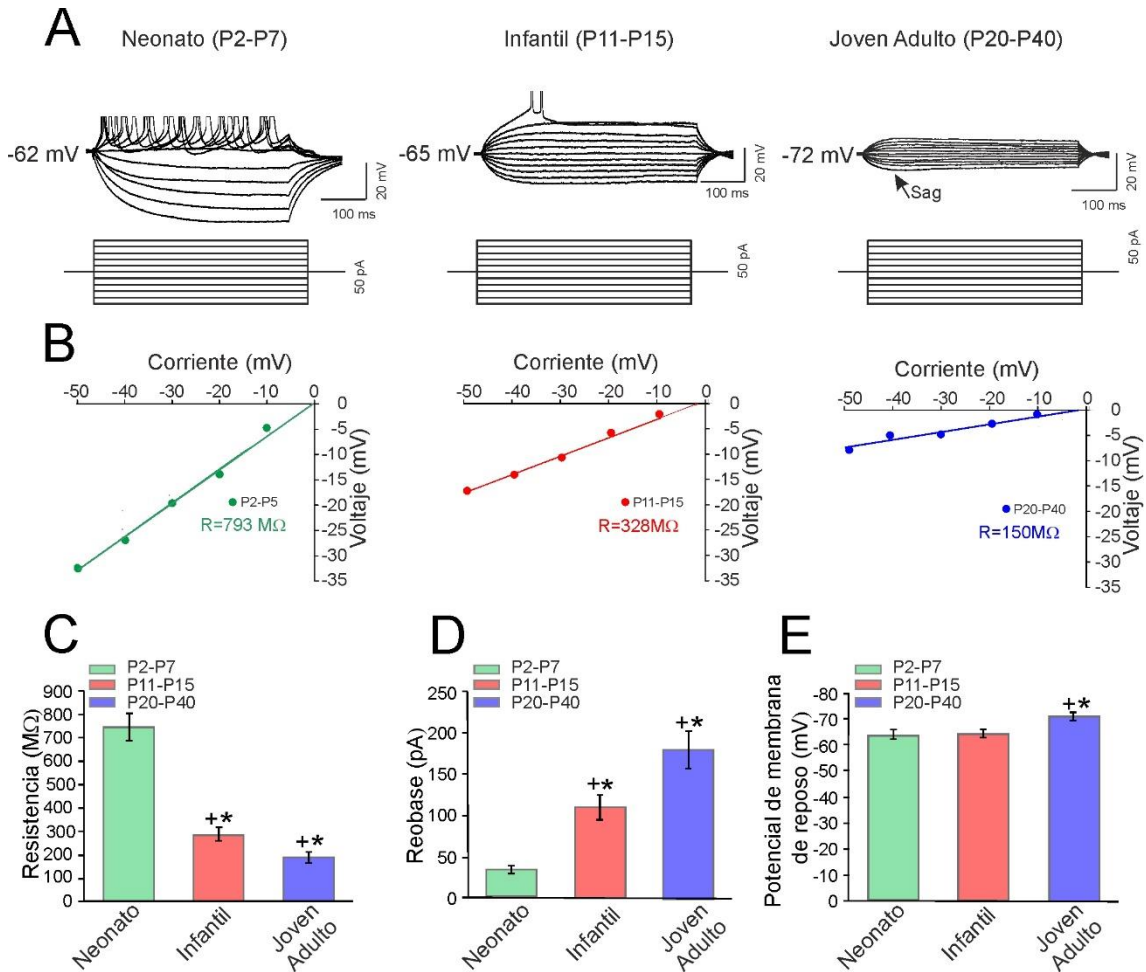


Figura 5. Cambios en las propiedades pasivas de membrana durante el desarrollo postnatal. A. Respuestas en voltaje de la membrana de neonato (P2-7), infantil (P11-15) y joven adulto (P20-40) a pulsos de corriente despolarizantes e hiperpolarizantes en incrementos de 10 pA, hasta ± 50 pA, con una duración de 500 ms. En la figura de joven adulto se puede observar la presencia de *sag*, indicado con una flecha. **B.** Relación entre la respuesta en voltaje de la membrana y la corriente aplicada en las mismas células representadas en A, siendo la pendiente de dicha relación igual a la resistencia de membrana. **C-E.** Histogramas donde se muestran los valores medios de la resistencia de membrana (C), reobase (D) y potencial de membrana de reposo (E) en neonatos (n=15), infantil (n=15) y jóvenes adultos (n=30).

Para estudiar los cambios en la resistencia de membrana durante el desarrollo postnatal se aplicaron pulsos cuadrados de corriente de 500 ms de duración, en incrementos de 10 pA, desde -50 pA hasta +50 pA. En la figura 5.A se muestra las respuestas en voltaje de tres neuronas representativas, cada una correspondiente a un grupo de edad, a pulsos de corriente despolarizantes e hiperpolarizantes. Como se puede apreciar, la respuesta en voltaje a dichos

pulsos, iguales en todos los casos, fue mucho mayor en el grupo de neonatos y fue disminuyendo a medida que las células fueron más maduras, observándose además en el último grupo la presencia de una rectificación del potencial de membrana (*sag*) al comienzo del pulso hiperpolarizante. La rectificación del voltaje o *sag* se observó en neuronas adultas de nuestro estudio, pero no en infantiles ni neonatales. Al representar gráficamente la relación entre intensidad y respuesta en voltaje para cada uno de los ejemplos representados en A (Figura 5.B), observamos que existe una relación lineal entre ambos parámetros, dando lugar a una recta cuya pendiente es igual al valor de la resistencia de la célula, la cual fue de 793 M Ω en la neurona más joven, 328 M Ω en la infantil y 150 M Ω en la joven adulta. Así, se observa que, consecuentemente a la disminución de la respuesta en voltaje durante el desarrollo, se produjo también una disminución la resistencia, lo que se mostró además en la tendencia general de la población, como se puede observar en la figura 5.C; donde se refleja que la resistencia de entrada decreció de forma significativa durante el desarrollo, pasando de 744.6 \pm 65.1 M Ω en neonatos a 285.4 \pm 30.8 M Ω en infantil y a 188.4 \pm 19.0 M Ω en jóvenes adultos (Tabla 1). Esta disminución fue además mayor cuando se comparó el segundo grupo de edad con el primero que cuando se comparó el tercero con el segundo, aunque dicho decremento también fue estadísticamente significativo.

De manera inversa a lo que ocurrió con la resistencia de entrada, la reobase (Figura 5.D) mostró un aumento significativo desde las ratas neonatas a las jóvenes adultas, y también cuando se compararon neonatales con infantiles e infantiles con jóvenes adultas, siendo los datos medios de 34.7 \pm 4.2 pA en P2-7, 110.0 \pm 14.7 pA en P11-15 y 176.5 \pm 22.4 pA en P20-40 (Tabla 1).

Propiedades activas de membrana

Propiedades del potencial de acción

No se encontraron cambios significativos en el voltaje umbral, aquel en el cual se produce un potencial de acción, cuyos valores fueron de -43.5 \pm 2.3 mV, -42.0 \pm 3.2 mV y -39.4 \pm 1.6 mV para el grupo de neonato, infantil y joven adulto, respectivamente, durante el desarrollo postnatal (Tabla 1); por otra parte, en el voltaje de despolarización -que se define como el incremento de voltaje necesario para alcanzar el potencial umbral- solo se encontraron cambios significativos cuando se comparó el primer grupo (P2-7, 21.7 \pm 2.0 mV) y el segundo (P11-15, 23.9 \pm 1.4 mV) con el último, (P20-40, 31.3 \pm 1.2 mV) (Tabla 1), pero no cuando se compararon el primer y el segundo grupo entre sí.

Tanto la amplitud del potencial de acción como su duración mostraron un cambio significativo y continuo durante el desarrollo postnatal. Así, mientras la amplitud aumentó desde 92.4 \pm 2.4 mV en neonatos a 104.1 \pm 2.3 mV en infantiles y a 118.0 \pm 0.5 mV en jóvenes adultos, la duración del mismo mostró una disminución progresiva que fue desde 2.98 \pm 0.13 ms en el primer grupo

(P2-7) a 1.96 ± 0.12 ms en el segundo (P11-15) y a 1.44 ± 0.02 ms en el último (P20-40), siendo estos resultados significativos tanto al compararlos entre grupos adyacentes como al comparar el grupo neonatal con el de jóvenes adultos (Tabla 1), lo que demuestra que dicho cambio fue progresivo durante el desarrollo neuronal.

Propiedades repetitivas de disparo

Para el estudio de las propiedades repetitivas de disparo se analizaron tres parámetros: ganancia, frecuencia máxima de disparo y corriente de cancelación.

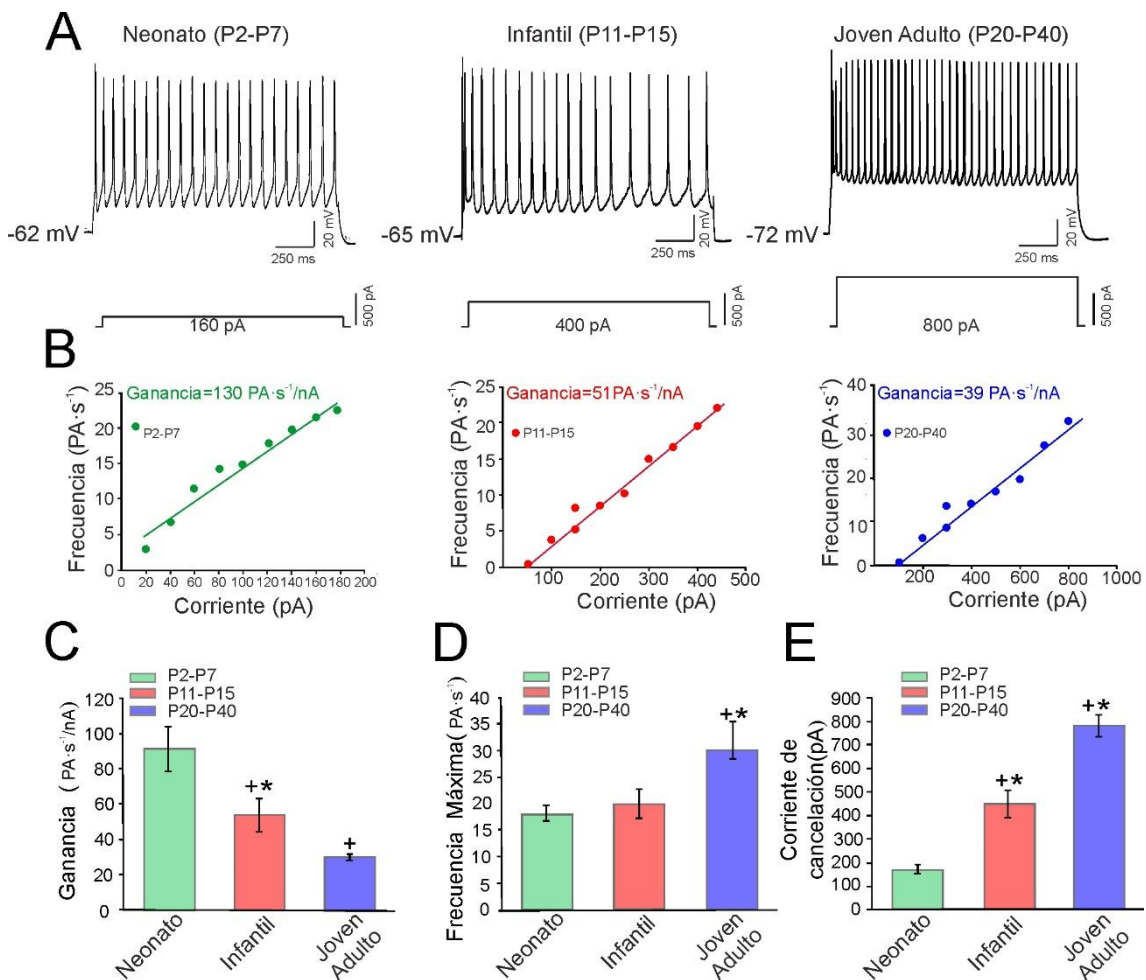


Figura 6. Cambios en las propiedades repetitivas de disparo durante el desarrollo postnatal. A. Respuestas del potencial de membrana a pulsos de corriente despolarizantes de 1000 ms en células de neonato (P2-7), infantil (P11-15) y joven adulto (P20-40). **B.** Relación entre la frecuencia de disparo de potenciales de acción y la corriente aplicada en las células mostradas en A, siendo la pendiente de la recta dada igual a la ganancia. **C-E.** Histogramas donde se muestran los valores medios de ganancia (C), frecuencia máxima de disparo (D) y corriente de cancelación (E) en neonatos (n=15), infantil (n=15) y jóvenes adultos (n=17).

En la figura 6.A se muestran las propiedades repetitivas de disparo de tres células representativas del total de la población: la primera empezando desde la izquierda correspondiente a una célula neonatal (P2-7), la segunda correspondiente una infantil (P11-15) y la última correspondiente a una joven adulta (P20-40). En dicha figura se puede observar las frecuencias de disparo máximas de las tres células, así como los pulsos de corriente a las que estas se produjeron. Siguiendo el

patrón poblacional, dichas frecuencias no variaron de forma significativa entre el grupo neonatal e infantil, pero fue mucho mayor en el grupo joven-adulto, mostrándose cambios estadísticamente significativos tanto cuando se compararon los datos de este grupo con el grupo infantil como cuando se compararon con el neonatal, como se recoge en la tabla 1: $18.1 \pm 1.6 \text{ PA s}^{-1}$ en neonatos, $20.5 \pm 2.7 \text{ PA s}^{-1}$ en infantiles y $29.3 \pm 3.5 \text{ PA s}^{-1}$ en jóvenes-adultos y en la figura 6.C; igualmente, se puede observar que las ratas más jóvenes (Figura 6.A izquierda) alcanzaron su frecuencia máxima de disparo a corrientes mucho más bajas que las infantiles (Figura 6.A centro) y estas a su vez lo hicieron a corrientes más bajas que las jóvenes adultas (Figura 6.A derecha), lo que se recoge en las corrientes de cancelación medias de la población (Figura 6.E), las cuales fueron de $174.0 \pm 17.0 \text{ pA}$ para el primer grupo, $437.0 \pm 58.0 \text{ pA}$ para el segundo y $782.7 \pm 52.8 \text{ pA}$ para el tercero (Tabla 1). Así, ambos parámetros aumentaron de forma significativa y gradual durante el desarrollo postnatal.

La ganancia de las células mostradas en la figura 6.A se calculó como la pendiente de la relación entre la intensidad de corriente del pulso aplicado y frecuencia de disparo de la célula en cada caso (figura 6.B), siendo de $130 \text{ PA}\cdot\text{s}^{-1}/\text{nA}$ para la célula neonata, $51 \text{ PA}\cdot\text{s}^{-1}/\text{nA}$ para la célula infantil y $39 \text{ PA}\cdot\text{s}^{-1}/\text{nA}$ para la célula joven adulta. La disminución de este parámetro se observó también para la media poblacional (Figura 6.C), siendo de $91.9 \pm 12.3 \text{ PA}\cdot\text{s}^{-1}/\text{nA}$ en neonatos, $53.8 \pm 9.7 \text{ PA}\cdot\text{s}^{-1}/\text{nA}$ en infantiles y $44.1 \pm 5.9 \text{ PA}\cdot\text{s}^{-1}/\text{nA}$ en adultos (Tabla 1), mostrándose los cambios estadísticamente significativos tanto al comparar el grupo neonatal con el infantil y con el de joven adulto como al comparar infantil y joven adulto.

En la siguiente tabla se resumen todos los resultados encontrados en este estudio:

Tabla 1. Propiedades de membrana de neuronas piramidales de la corteza motora durante el desarrollo postnatal.

| | Grupos de edad (P) | | |
|---|--------------------|---------------------|---------------------|
| | 2-7 | 11-15 | 20-40 |
| Potencial de membrana (mV) | -64.1 ± 1.7 | -64.5 ± 1.6 | -70.7 ± 1.3 *+ |
| Resistencia de entrada (MΩ) | 744.6 ± 65.1 | 285.4 ± 30.8 *+ | 188.4 ± 19.0 *+ |
| Reobase (pA) | 34.7 ± 4.2 | 110.0 ± 14.7 *+ | 176.5 ± 22.4 *+ |
| Voltaje umbral (mV) | -43.5 ± 2.3 | -42.0 ± 3.2 | -39.4 ± 1.6 |
| Voltaje de despolarización (mV) | 21.7 ± 2.0 | 23.9 ± 1.4 | 31.3 ± 1.2 *+ |
| Amplitud del potencial de acción (mV) | 92.4 ± 2.4 | 104.1 ± 2.3 *+ | 118.0 ± 0.5 *+ |
| Duración del potencial de acción (ms) | 2.98 ± 0.13 | 1.96 ± 0.12 *+ | 1.44 ± 0.02 *+ |
| Frecuencia máxima de disparo (PA s⁻¹) | 18.1 ± 1.6 | 20.5 ± 2.7 | 29.3 ± 3.5 *+ |
| Ganancia (PA s⁻¹ nA⁻¹) | 91.9 ± 12.3 | 53.8 ± 9.7 *+ | 44.1 ± 5.9 + |
| Corriente de cancelación (pA) | 174.0 ± 17.0 | 437.0 ± 58.0 *+ | 782.7 ± 52.8 *+ |

Una cruz (+) indica diferencia significativa comparado con el primer grupo (2-7); un asterisco (*) indica diferencia entre grupos adyacentes. El nivel de significancia se estableció como $P \leq 0.05$. Todos los datos se presentan como la media \pm error estándar de la media. P2-7 n=15, P11-15 n=15, P20-40 n=30 excepto para frecuencia máxima de disparo, ganancia y corriente de cancelación, donde n=17. PA = Potencial de Acción. Datos de jóvenes adultos de Pardillo et. al., 2015.

DISCUSIÓN

En el desarrollo de este trabajo se estudió la secuencia temporal de los cambios de las propiedades electrofisiológicas de las neuronas piramidales de la capa V de la corteza motora primaria, desde el nacimiento (día 2 postnatal) hasta el comienzo de la edad adulta (día 40 postnatal). Durante este periodo, se encontraron cambios significativos tanto en parámetros que caracterizan las propiedades pasivas de membrana como en las propiedades activas de membrana, aunque estos cambios no se dieron en el mismo periodo de tiempo para todas las variables estudiadas.

Sin embargo, antes de comenzar a discutir cómo se producen dichos cambios, debemos tener presentes las ventajas y desventajas de la técnica. Así, la mayor ventaja es que permite comparar de forma directa los datos obtenidos con estudios previos llevados a cabo con la misma técnica y, aunque podrían existir diferencias con los resultados obtenidos con otras técnicas, se ha demostrado que los datos electrofisiológicos obtenidos mediante el uso de preparaciones *in vitro* son similares a los obtenidos en preparaciones *in vivo* (Carrascal et al., 2006). Por otra parte, no se puede dejar de ver que tanto la preparación de las rodajas, que provoca daños en axones y dendritas, como la formación y rotura del sello, que provocan daños en la membrana celular, son procedimientos invasivos que podrían dar lugar a la aparición de resultados sesgados por la técnica, pudiendo mostrar alterados parámetros como el potencial de membrana celular (Tyzio et al., 2003; Zhou and Hablitz, 1996). Para minimizar estos riesgos, en nuestro estudio solo se admitieron las células que visualmente se mantenían en condiciones óptimas y que mostraron propiedades estables durante todo su registro.

Durante el desarrollo postnatal de las neuronas piramidales de la capa V de la corteza motora primaria, el potencial de membrana en reposo se hiperpolarizó, principalmente del día 15 al 20 postnatal. Esta tendencia hacia potenciales más negativos ha sido observada también en otras áreas corticales (Yamada et al., 2004; Zhou and Hablitz, 1996); sin embargo, estos cambios aparecen antes en algunas de estas poblaciones, como en las neuronas piramidales de la capa III de la corteza prefrontal, donde la hiperpolarización se da principalmente durante la primera semana postnatal (Kroon et al., 2019). Otras poblaciones neuronales, como las del hipocampo (Spigelman et al., 1992) y las del núcleo estriado (Tepper et al., 1998) también muestran esta hiperpolarización significativa durante el desarrollo, aunque no se trata de un cambio global, ya que otras poblaciones mantienen un potencial de membrana en reposo estable desde el nacimiento hasta la edad adulta, como son las motoneuronas del núcleo motor ocular común (Carrascal et al., 2006), aquellas que inervan el músculo geniogloso, alojadas en el núcleo hipogloso (Nunez-Abades et al., 1993) o motoneuronas del nervio frénico (Cameron et al., 1991), aunque los datos aportados por Cameron et al. (1991) contrastan con estudios posteriores de motoneuronas frénicas, donde se observó también una hiperpolarización significativa con el desarrollo postnatal (Martin-Caraballo and Greer, 2000). El potencial de membrana es creado por la existencia de

diferentes concentraciones de iones impermeables a la membrana en el interior y en el exterior celular, que se mueven a través de esta por canales que permiten su entrada o salida gracias al gradiente electroquímico, mantenido por transportadores activos que expulsan o regresan dichos iones en contra de su gradiente. El cambio de este potencial hacia valores más negativos durante el desarrollo postnatal podría ser debido, principalmente, a cambios en la permeabilidad de los iones potasio (Pardillo-Díaz et al., 2017) por un aumento en las corrientes de fuga de este ion.

Por otro lado, la resistencia de entrada decreció hasta un 25% durante el desarrollo postnatal, siendo esta disminución mucho mayor en la segunda semana postnatal que en la tercera, aunque en esta semana también fue significativa. Este cambio ha sido observado también en motoneuronas como las del núcleo hipogloso, donde la resistencia disminuye hasta un 50% durante el desarrollo postnatal, y núcleo motor ocular común, donde lo hace en hasta un 25%. Sin embargo, aunque este decremento ocurrió en un periodo similar al de nuestro estudio para la primera población (durante los días 10 y 15), en la segunda el cambio fue observado mucho antes, durante los días 5 a 10 postnatales (Carrascal et al., 2015). Otras poblaciones neuronales muestran también resistencias de membrana menores en neuronas adultas que en neuronas jóvenes, como las neuronas talámicas auditivas, donde la resistencia disminuye entre los días 5 y 14 postnatales (Tennigkeit et al., 1998); neuronas principales de la amígdala basolateral, en las que disminuye hasta casi 10 veces entre los días 7 y 28 (hasta 6 veces entre los días 7 y 21) (Ehrlich et al., 2012); núcleo estriado, donde los cambios ocurren hasta la tercera semana postnatal (Tepper et al., 1998); núcleo vestibular medio (Murphy and Du Lac, 2001) y motoneuronas frénicas, donde el cambio sucede más tarde, entre la segunda y la quinta semana postnatal (Cameron et al., 1991); así como otras poblaciones corticales (Kroon et al., 2019; McCormick and Prince, 1987; Yamada et al., 2004; Zhou and Hablitz, 1996), donde los cambios también varían en magnitud y periodo, lo que sugiere que la disminución de la resistencia va asociada a la funcionalidad de cada tipo neuronal. Estos estudios coinciden en que la bajada en la resistencia va asociada al aumento de tamaño celular y a la disminución de la resistencia específica de membrana, aunque también puede deberse o también puede contribuir la proliferación y/o redistribución de los canales de potasio y el aumento de entradas sinápticas tónicas (Carrascal et al., 2006).

La rectificación del voltaje o *sag* como respuesta a la aplicación de pulsos de corriente hiperpolarizantes se observó en neuronas adultas de nuestro estudio, pero no en infantiles ni neonatales, hecho apreciado también en motoneuronas del núcleo motor ocular común y geniogloso (Carrascal et al., 2015) y motoneuronas del núcleo hipogloso (Berger et al., 1995); por otro lado, aunque la presencia de *sag* se observó a todas las edades en las neuronas principales de la amígdala basolateral, su frecuencia aumentó también con la edad (Ehrlich et al., 2012), pero se mantuvo constante a todas las edades en neuronas CA1 del hipocampo (Spigelman et al., 1992) y neuronas del tracto solitario (Vincent and Tell, 1997). Dicha rectificación, que tiende a

despolarizar el potencial de membrana hasta el potencial en reposo, se debe a las conocidas como corrientes I_h o corrientes rectificadoras internas, las cuales están producidas por canales catiónicos mixtos activados por hiperpolarización de la membrana (Robinson and Siegelbaum, 2003); así, el aumento o aparición de *sag* con el desarrollo postnatal podría atribuirse a un aumento en la densidad de este tipo de canales (Carrascal et al., 2015). Sin embargo, cabe destacar que otros estudios demostraron una disminución en la aparición de *sag* con el desarrollo postnatal (Kroon et al., 2019; Tennigkeit et al., 1998; Zhou and Hablitz, 1996). Tennigkeit et al. (1998), en un estudio sobre neuronas talámicas auditivas, mostró como el 84% de las neuronas más jóvenes de P13 presentaron un *sag* pronunciado, provocado por corrientes I_h , ante la aplicación de pulsos hiperpolarizantes, pero atribuyó la ausencia de *sag* en neuronas mayores de P16 a la participación de corrientes I_{KIR} , que harían que este *sag*, más rápido y que se da a hiperpolarizaciones menores, pasara desapercibido en neuronas jóvenes y adultas.

El aumento en la reobase durante del desarrollo postnatal, que acompaña a la disminución de la resistencia, también es una característica común de muchas poblaciones neuronales, como motoneuronas respiratorias del núcleo hipogloso (Nunez-Abades et al., 1993; Viana et al., 1994), frénico (Cameron et al. 1991) y tracto solitario (Vincent and Tell, 1997) u otras neuronas piramidales de distintas capas y áreas de la corteza prefrontal media (Kroon et al., 2019) aunque, por el contrario, también se han observado tendencias decrecientes en ciertas poblaciones neuronales, como las motoneuronas del núcleo motor ocular común, donde esta disminución ocurre de forma progresiva (Carrascal et al., 2006). Si bien son numerosos aquellos casos en los que la reobase muestra un aumento durante el desarrollo postnatal, -lo que bien podría deberse a que la membrana celular se comportara como una resistencia óhmica, lo que haría que la disminución en la resistencia se compensara con el aumento en la reobase, y esto mantendría constante el voltaje umbral durante el desarrollo postnatal (Nunez-Abades et al., 1993)-, estos cambios tampoco ocurren durante el mismo periodo de tiempo para todas las poblaciones, apreciándose mayormente durante la segunda semana postnatal (Kroon et al., 2019; Nunez-Abades et al., 1993), como ocurre también en las neuronas de este estudio, o bien siendo este cambio progresivo en el tiempo (Viana et al., 1994; Vincent and Tell, 1997).

Como ya se ha mencionado, el voltaje umbral permaneció constante durante todo el desarrollo postnatal, mientras que el voltaje de despolarización mostró un aumento progresivo desde el nacimiento hasta la edad adulta. La inalterabilidad del voltaje umbral concuerda con datos obtenidos en motoneuronas genioglosales (Nunez-Abades et al. 1993) pero es contrario a lo observado en otras poblaciones de neuronas piramidales corticales, cuyo voltaje umbral se hiperpolariza durante el desarrollo postnatal (Kroon et al., 2019); por otra parte, el voltaje de despolarización muestra tendencias diferentes en cada población: por ejemplo, mientras que las neuronas del núcleo motor ocular común presentan una disminución gradual en el voltaje de

despolarización, este permanece inalterado en las neuronas del núcleo geniogloso (Carrascal et al., 2005). La diversidad de patrones en los cambios de estos dos parámetros durante el desarrollo postnatal podría indicar que otros factores distintos a la maduración neuronal pueden influir en los cambios de dichas propiedades. En las neuronas de nuestro estudio, el aumento del voltaje de despolarización se asocia a la hiperpolarización del potencial de membrana en reposo de las células.

En cuanto a la amplitud y duración del potencial de acción, en las neuronas estudiadas se mostró un aumento significativo de la amplitud, que fue acompañado de una disminución en la duración del mismo. Estos resultados en la disminución de la duración del potencial fueron semejantes a los encontrados en otras poblaciones neuronales a lo largo de las distintas capas y áreas de la corteza motora (Kroon et al., 2019; McCormick and Prince, 1987; Zhou and Hablitz, 1996), así como en poblaciones no corticales como, por ejemplo, neuronas auditivas del tálamo (Tennigkeit et al., 1998), neuronas del núcleo hipogloso (Viana et al., 1994), tracto solitario (Vincent and Tell, 1997) y motoneuronas frénicas, en las que la duración del potencial de acción llega a reducirse hasta en un 50% durante el desarrollo postnatal (Martin-Caraballo and Greer, 2000), al igual que ocurre en las motoneuronas del núcleo motor ocular común (Carrascal et al., 2005). Mientras la duración del potencial de acción disminuyó con el desarrollo postnatal, la tendencia general de la amplitud del potencial es hacia el aumento, aunque esto no siempre ocurre así, sino que en algunos casos se mantiene constante durante el desarrollo postnatal, como ocurre en las motoneuronas del núcleo hipogloso (Viana et al., 1994) o en las neuronas del núcleo motor ocular común (Carrascal et al., 2006). El aumento en la amplitud está asociado a un aumento en la densidad en los canales de sodio voltaje-dependientes durante el desarrollo postnatal (Vincent and Tell, 1997), mientras que la disminución en la duración se asocia a que las fases de despolarización e hiperpolarización ocurren de forma más rápida en las neuronas adultas que en las recién nacidas, debido a que aumenta la densidad y/o la función de los canales de sodio y potasio dependientes de voltaje. Diversos estudios sugieren que el acortamiento es mayor en la fase de hiperpolarización que en la de despolarización (Viana et al., 1994; Vincent and Tell, 1997), aunque esto no ha sido estudiado en este trabajo. Por otro lado, en la disminución de la duración también podría contribuir una bajada en la conductancia de calcio activada por voltaje, que refuerce el potencial de acción tras la despolarización (Carrascal et al., 2006).

La frecuencia máxima de disparo aumentó durante el desarrollo postnatal en las neuronas piramidales de la capa V de la corteza motora primaria, al igual que ocurre en las motoneuronas genioglosales y del núcleo motor ocular común (Carrascal et al., 2015). Dicho cambio en la tendencia ocurre de forma similar en las poblaciones de las neuronas estudiadas y en las genioglosales, en las que el aumento de la frecuencia se da hasta la edad adulta y no llega al doble de la frecuencia mostrada en las neuronas neonatales; lo que difiere de los resultados obtenidos

en las motoneuronas del núcleo motor ocular común, donde este aumento ocurre principalmente entre los días 16 y 30 postnatal y llega a alcanzar el triple del valor inicial. Este aumento podría deberse a una activación más rápida del rectificador tardío o bien a una inactivación más corta de los canales de sodio dependientes de voltaje (Carrascal et al., 2015).

Por otro lado la ganancia, obtenida como la pendiente de la recta de la relación entre frecuencia de disparo y corriente inyectada (F/I), mostró una disminución durante el desarrollo postnatal, hecho que se opone a lo observado en las neuronas del núcleo motor ocular común y geniogloso (Carrascal et al., 2015) y neuronas talámicas auditivas (Tennigkeit et al., 1998), donde la ganancia aumentó con la edad; este parámetro parece disminuir en un estudio llevado a cabo sobre las neuronas del núcleo vestibular medio (Murphy and Du Lac, 2001), pero los resultados obtenidos variaron mucho dentro de todos los grupos de edades, no mostrando una buena correlación con la edad. Por último, la corriente de cancelación también aumentó durante el desarrollo postnatal en la población estudiada, aumentando así la corriente a la que las células podían disparar potenciales de acción a una frecuencia máxima; así, como resultado, aumenta el rango de trabajo (calculado como la diferencia entre la reobase y la corriente de cancelación) para estas motoneuronas, desde 139.3 pA en neonatos a 327.0 pA en ratas infantiles y a 606.2 pA en jóvenes adultos.

Así, podemos decir que en las neuronas piramidales de la capa V de la corteza motora primaria se observa un comportamiento dual ya que, a pesar de que la frecuencia máxima de disparo aumentó con la edad, la ganancia disminuyó, lo que implica que para la inyección de una misma magnitud de corriente, las neuronas más inmaduras dispararon un mayor número de potenciales de acción que las adultas, aunque si no se tiene en cuenta la corriente aplicada estas últimas son capaces de disparar con mayores frecuencias. Además, al aumentar el rango de trabajo en las motoneuronas adultas, estas pueden disparar a corrientes mayores, a pesar de que el aumento en la reobase y la disminución en la resistencia de entrada implican una disminución de la excitabilidad celular con el desarrollo postnatal. La disminución de la excitabilidad ha sido ya observada en neuronas del núcleo hipogloso (Viana et al., 1994) y en la subpoblación de este núcleo que inerva al músculo geniogloso, donde la disminución de la excitabilidad se asocia a un aumento de hasta el doble de la reobase que no se acompaña en cambios en el voltaje umbral, pues este se mantiene constante durante el desarrollo postnatal (Carrascal et al., 2015), así como en distintas poblaciones neuronales del hipocampo (Spigelman et al., 1992; Tyzio et al., 2003), donde una excitabilidad más alta en neuronas fue asociada a una gran despolarización del voltaje de membrana en reposo, que responde a la apertura de canales de calcio necesario para el crecimiento celular (Tyzio et al., 2003). Sin embargo, los datos encontrados en otros estudios neuronales contrastaron con los anteriores, puesto que la disminución de la reobase se acompañó de una disminución del voltaje de despolarización en neuronas del núcleo motor ocular común, lo que resultó en un aumento de la excitabilidad neuronal con el desarrollo postnatal (Carrascal

et al., 2015). Los cambios en la excitabilidad podrían deberse al desarrollo de corrientes despolarizantes, que madurarían de forma distinta durante el desarrollo postnatal (Carrascal et al., 2005).

CONCLUSIONES

Las neuronas piramidales de la capa V de la corteza motora primaria mostraron una hiperpolarización del potencial de membrana en reposo durante el desarrollo postnatal, la cual podría deberse, principalmente, a cambios en la conductancia de los iones potasio.

La resistencia de entrada disminuyó hasta un 25% durante el desarrollo postnatal, lo que se asoció a un aumento del tamaño celular y a una disminución de la resistencia específica de membrana, pudiendo también contribuir el aumento de la densidad y/o redistribución de canales de potasio, así como el aumento de entradas sinápticas tónicas.

Se observaron rectificaciones del voltaje (*sag*) ante la aplicación de pulsos de corriente hiperpolarizantes en las motoneuronas adultas de nuestro estudio, lo que podría deberse a la proliferación, con el desarrollo postnatal, de canales catiónicos mixtos activados por hiperpolarización, conocidos como corrientes I_h .

La reobase aumentó durante el desarrollo postnatal debido al aumento de la resistencia, ya que el voltaje umbral se mantuvo constante. El voltaje de despolarización aumentó debido a la hiperpolarización de la célula con el desarrollo.

Durante el desarrollo postnatal se produjo un aumento significativo en la amplitud del potencial de acción, asociado a un aumento en la densidad de canales de sodio voltaje-dependientes; así como una disminución de la duración del potencial de acción, probablemente producida por el acortamiento en las fases de subida y bajada del potencial, lo cual se asocia a la mejor función y/o mayor densidad de canales de sodio y potasio dependientes de voltaje.

Aunque la frecuencia máxima de disparo aumentó con la edad, fueron requeridas mayores corrientes para ser alcanzada. Por otra parte, mientras que el rango de trabajo también aumentó con el desarrollo postnatal, ya que la corriente de cancelación fue mayor para las neuronas adultas, la ganancia disminuyó.

De los cambios observados se deduce una disminución en la excitabilidad celular durante el desarrollo postnatal en las neuronas piramidales de la capa V de la corteza motora primaria.

Por último, la comparación con los datos obtenidos en estudios previos en otras poblaciones neuronales nos lleva a la conclusión de que los cambios electrofisiológicos son únicos para cada población.

BIBLIOGRAFÍA

Berger AJ, Bayliss DA, Bellingham MC, Umemiya M, Viana F. Postnatal development of hypoglossal motoneuron intrinsic properties. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1995;381(206):63–71.

Brodmann K, Gary LJ. Brodmann's localization in the cerebral cortex the principles of comparative localisation in the cerebral cortex based on cytoarchitectonics. New York, NY: Springer; 2006.

Cahalan M, Neher E. [1] Patch clamp techniques: An overview. *Methods Enzymol.* 1992;207:3–14.

Cameron WE, Jodkowski JS, Fang H, Guthrie RD. Electrophysiological properties of developing phrenic motoneurons in the cat. *J. Neurophysiol.* 1991;65(3):671–679.

Carrascal L, Nieto-Gonzalez JL, Núñez-Abades P, Torres B. Temporal sequence of changes in electrophysiological properties of oculomotor motoneurons during postnatal development. *Neuroscience.* 2006;140(4):1223–1237.

Carrascal L, Nieto-Gonzalez JL, Cameron WE, Torres B, Nunez-Abades PA. Changes during the postnatal development in physiological and anatomical characteristics of rat motoneurons studied in vitro. *Brain Res. Rev.* 2005;49(2):377–387.

Carrascal L, Nieto-González JL, Pardillo-Díaz R, Pásaro R, Barrionuevo G, Torres B, et al. Time windows for postnatal changes in morphology and membrane excitability of genioglossal and oculomotor motoneurons. *World J. Neurol.* 2015;5(4):113–131.

Chagnac-Amitai Y, Luhmann HJ, Prince DA. Burst Generating and Regular Spiking Layer 5 Pyramidal Neurons of Rat Neocortex Have Different Morphological Features. *J. Comp. Neurol.* 1990;296:598–613.

Dégenétais E, Thierry A, Glowinski J, Gioanni Y. Electrophysiological Properties of Pyramidal Neurons in the Rat Prefrontal Cortex: An In Vivo Intracellular Recording Study. *Cereb. Cortex.* 2002;12(1):1–16.

Ehrlich DE, Ryan SJ, Rainnie DG. Postnatal development of electrophysiological properties of principal neurons in the rat basolateral amygdala. *J. Physiol.* 2012;590(19):4819–4838.

Fogarty MJ, Noakes PG, Bellingham MC. Motor cortex layer V pyramidal neurons exhibit dendritic regression, spine loss, and increased synaptic excitation in the presymptomatic hSOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurosci.* 2015;35(2):643–647.

Hall JE. Guyton y Hall. Tratado de fisiología médica. 13a ed. Barcelona: Elsevier; 2016.

JoVE Science Education Database. Neuroscience. Patch Clamp Electrophysiology. *J. Vis. Exp.* 2020; Available from: <https://www.jove.com/science-education/5202/patch-clamp-electrophysiology>

Kandel ER. Principles of neural science. 5th ed. New York, NY: McGraw-Hill; 2013.

Kasper EM, Larkman A, Lubke J. Pyramidal Neurons in Layer 5 of the Rat Visual Cortex. I. Correlation Among Cell Morphology, Intrinsic Electrophysiological Properties, and Axon Targets. *J. Comp. Neurol.* 1994;339:459–474.

Kroon T, van Hugte E, van Linge L, Mansvelder HD, Meredith RM. Early postnatal development of pyramidal neurons across layers of the mouse medial prefrontal cortex. *Sci. Rep.* 2019;9(1):1–16.

Martin-Caraballo M, Greer JJ. Development of potassium conductances in perinatal rat phrenic motoneurons. *J. Neurophysiol.* 2000;83(6):3497–3508.

McCormick DA, Prince DA. Post-natal development of electrophysiological properties of rat cerebral cortical pyramidal neurones. *J. Physiol.* 1987;393(1):743–762.

Murphy GJ, Du Lac S. Postnatal development of spike generation in rat medial vestibular nucleus neurons. *J. Neurophysiol.* 2001;85(5):1899–1906.

Nowotny T, Marra V. Patch Clamp Technique. In: Jaeger D, Jung R, editors. *Encyclopedia of Computational Neuroscience*. New York, NY: Springer New York; 2014. p. 1–4.

Nunez-Abades PA, Spielmann JM, Barrionuevo G, Cameron WE. In vitro electrophysiology of developing genioglossal motoneurons in the rat. *J. Neurophysiol.* 1993;70(4):1401–1411.

Pardillo-Díaz R, Carrascal L, Ayala A, Nunez-Abades P. Oxidative stress induced by cumene hydroperoxide evokes changes in neuronal excitability of rat motor cortex neurons. *Neuroscience.* 2015;289:85–98.

Pardillo-Díaz R, Carrascal L, Barrionuevo G, Nunez-Abades P. Oxidative stress induced by cumene hydroperoxide produces synaptic depression and transient hyperexcitability in rat primary motor cortex neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* 2017;82:204–217.

- Polder HR, Weskamp M, Linz K, Meyer R. Voltage-Clamp and Patch-Clamp Techniques. In: Dhein S, Mohr FW, Delmar M, editors. *Practical Methods Cardiovascular Research*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2005. p. 272–323.
- Quinlan KA, Schuster JE, Fu R, Siddique T, Heckman CJ. Altered postnatal maturation of electrical properties in spinal motoneurons in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Physiol.* 2011;589(9):2245–2260.
- Riancho J, Gonzalo I, Ruiz-Soto M, Berciano J. Why do motor neurons degenerate? Actualization in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurología (English Edition)*; 2019;34(1):27–37.
- Robinson RB, Siegelbaum SA. Hyperpolarization-activated cation currents: From Molecules to Physiological Function. *Annu. Rev. Physiol.* 2003;65(1):453–480.
- Sakmann B, Neher E. Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes. *Annu. Rev. Physiol.* 1984;46(1):455–472.
- Schellekens W, Petridou N, Ramsey NF. Detailed somatotopy in primary motor and somatosensory cortex revealed by Gaussian population receptive fields. *Neuroimage.* 2018;179:337–347.
- Shipp S. Structure and function of the human cerebral cortex. *Curr. Biol.* 2007;17(12):443–449.
- Silverthorn DU. *Fisiología humana: un enfoque integrado*. 6a ed. México: Médica Panamericana; 2014.
- Spigelman I, Zhang L, Carlen PL. Patch-clamp study of postnatal development of CA1 neurons in rat hippocampal slices: Membrane excitability and K⁺ currents. *J. Neurophysiol.* 1992;68(1):55–69.
- Spruston N. Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration. *Nat. Rev. Neurosci.* 2008;9(3):206–221.
- Stanfield CL. *Principios de fisiología humana*. 4a ed. Madrid: Pearson Education; 2011.
- Tennigkeit F, Schwarz DW f., Puil E. Postnatal development of signal generation in auditory thalamic neurons. *Dev. Brain Res.* 1998;109(2):255–263.
- Tepper JM, Sharpe NA, Koós TZ, Trent F. Postnatal development of the rat neostriatum: Electrophysiological, light- and electron-microscopic studies. *Dev. Neurosci.* 1998;20:125–145.

- Tyzio R, Ivanov A, Bernard C, Holmes GL, Ben-ari Y, Khazipov R. Membrane Potential of CA3 Hippocampal Pyramidal Cells During Postnatal Development. *J. Neurophysiol.* 2003;90:2964–2972.
- Valverde F. Estructura de la corteza cerebral . Organización intrínseca y análisis comparativo del neocórtex. *Rev. Neurol.* 2002;34(8):758–780.
- Viana F, Bayliss DA, Berger AJ. Postnatal changes in rat hypoglossal motoneuron membrane properties. *Neuroscience.* 1994;59:131–148.
- Vincent A, Tell F. Postnatal changes in electrophysiological properties of rat nucleus tractus solitarii neurons. *Eur. J. Neurosci.* 1997;9(8):1612–1624.
- Yamada J, Okabe A, Toyoda H, Kilb W, Luhmann HJ, Fukuda A. Cl⁻ uptake promoting depolarizing GABA actions in immature rat neocortical neurones is mediated by NKCC1. *J. Physiol.* 2004;557(3):829–841.
- Ypey DL, DeFelice LJ. The patch-clamp technique explained and exercised with the use of simple electrical equivalent circuits. *Electrical Properties of Cells.* Boston, MA, USA: Springer; 2000. p. 7-62.
- Zaitsev A., Povysheva N., Gonzalez-Burgos G, Lewis DA. Electrophysiological classes of layer 2 / 3 pyramidal cells in monkey prefrontal cortex. *J. Neurophysiol.* 2012;108(2):595–609.
- Zapata-Zapata CH, Franco-Dáger E, Solano-Atehortúa JM, Ahunca-Velásquez LF. Esclerosis lateral amiotrófica: actualización. *IATREIA.* 2016;29(2):194–205.
- Zhou FM, Hablitz JJ. Postnatal development of membrane properties of layer I neurons in rat neocortex. *J. Neurosci.* 1996;16(3):1131–1139.