



UNIVERSIDAD DE CHILE -FACULTAD DE CIENCIAS -ESCUELA DE PREGRADO

“Proceso rápido de plasticidad sináptica homeostática
en rebanadas de hipocampo de rata en una solución
de registro alta en divalentes”

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

por

Felipe Elías Arancibia Toro

Director del Seminario de Título: Dra. María Magdalena Sanhueza Tohá

Co- director Dr. Daniel Karmelić

Diciembre 2018

Santiago – Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TITULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el Sr. Felipe Elías Arancibia Toro.

**“Proceso rápido de plasticidad sináptica homeostática
en rebanadas de hipocampo de rata en una solución
de registro alta en divalentes”**

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Director Seminario de Título: _____

Comisión Revisora y Evaluadora

Presidente Comisión: _____

Evaluador: _____

Santiago de Chile,

Dedicatoria

A mis padres, quienes siempre me han apoyado en todo, quienes siempre han creído en mí cuando incluso yo mismo he sido incapaz de hacerlo, y que han sido mi gran soporte en todo este tiempo.

Agradecimientos

Agradezco a absolutamente todos los miembros del laboratorio de fisiología, todos aportaron con su simpatía, conocimientos, recomendaciones, consejos y alientos a sacar adelante mis proyectos. Gracias a quienes me guiaron en mis primeros pasos en la electrofisiología: Daniela Astudillo por enseñarme todo lo básico durante mi unidad de investigación; a Pablo Vergara-senpai por su ayuda a la distancia con los análisis de minis; a Daniel Karmelić por ser mi co-tutor durante todo este proceso, ayudándome en todo lo práctico y teórico, enseñándome el arte del *patch-clamp*, así como ayudarme con la redacción de este trabajo; a Jorge Vera por la paciencia con éste alumno neófito haha; a la profesora Magdalena Sanhueza, por ser mi tutora y haber estado siempre preocupada de que avanzara, siempre disponible para resolver dudas y corregir este escrito. Gracias al profesor Ricardo Delgado, quien siempre me apoyó con toda su sabiduría, así como ánimos para seguir adelante, y gracias a la profe Cecilia Vergara, Juan Bacigalupo y Julio Alcayaga, que siempre estuvieron dispuestos a conversar cualquier duda que tuviera. Gracias Don Danny y Jeanette por su trabajo y buena onda siempre. Gracias Kris Blanchard por la ayuda con el Igor, el café, la buena onda y las conversas. Mención especial a todos mis familiares que siempre me han apoyado, gracias tío Mario y tía Patty por recibirme en su casa durante mis primeros años en Santiago, gracias prima María Olga por recibirme en tu depa este último año, y gracias a toda mi familia y amigos por su cariño y apoyo.

1. Índice

1.1 Índice de contenidos

1. Índice	iv
1.1 Índice de contenidos	iv
1.2 Índice de figuras	v
1.3 Lista de abreviaturas	vi
2. Resumen	1
3. Abstract	2
4. Introducción	3
4.1 Hipótesis:	11
4.2 Objetivos:	11
5. Materiales y Métodos	11
5.1 Cuidado animal	11
5.2 Preparación de rebanadas agudas de hipocampo	12
5.3 Condiciones de incubación de las rebanadas	12
5.4 Registros electrofisiológicos	14
5.5. Preparativos para el registro de mEPSCs	16
5.5.1. Prueba del efecto de TTX	16
5.5.2. Prueba del efecto del PTX	17
5.6 Cuantificación de los mEPSCs	18
5.7 Análisis estadísticos y tratamiento de datos	21
6. Resultados	26
6.1. Registro de mEPSC en solución alta en divalentes.	26
6.2 Evaluación del fenómeno de PSH en solución alta en divalentes.	27
6.2.1 Comparación de la frecuencia de mEPSCs en los períodos temprano y tardío ...	27
6.2.2. Comparación de las amplitudes de mEPSCs tempranas y tardías	31
7. Discusión y Proyecciones	34
8. Conclusiones	41
9. Bibliografía	41
Anexo	47

1.2 Índice de figuras

Figura 1. Las corrientes evocadas irregulares son eliminados por el uso de una alta concentración de divalentes en la solución de registro	10
Figura 2. Protocolo experimental	13
Figura 3. Esquema simplificado de la técnica de <i>whole-cell patch-clamp</i> en modalidad <i>voltage-clamp</i>	15
Figura 4. La aplicación de TTX al baño de registro elimina la aparición de potenciales de acción	17
Figura 5. La aplicación de PTX al baño de registro elimina las corrientes GABAérgicas	18
Figura 6. Representación esquemática del algoritmo de detección de mEPSCs en el registro obtenido por <i>voltage-clamp</i>	21
Figura 7. Construcción de curvas de función de distribución de probabilidad acumulada a partir de los datos de amplitud de mEPSC de una célula.....	24
Figura 8. Cálculo de probabilidad de observar la distancia máxima D entre dos CPDF ...	25
Figura 9. Registro representativo de mEPSCs.....	27
Figura 10. Aumento de la frecuencia de mEPSCs en el tiempo	29
Figura 11. Distribuciones de probabilidad acumulada (CPDF) de intervalos entre eventos para cada período de registro	30
Figura 12. Aumento de la amplitud de mEPSCs en el tiempo	32
Figura 13. Distribuciones de probabilidad acumulada (CPDF) de amplitudes de mEPSCs para cada período de registro	33
Figura S1. Corrientes evocadas irregulares en presencia de PTX imposibilitan el análisis de pulsos pareados	47

1.3 Lista de abreviaturas

AMPA: α -amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol-propionato.

AMPA: Receptor de glutamato tipo AMPA

CPDF: Función de distribución de probabilidad acumulada

K-S: Prueba estadística de Kolmogórov-Smirnov

EPSC: Corrientes post sinápticas excitatorias evocadas

PSH: Plasticidad sináptica homeostática

LCRa: Líquido céfalo raquídeo artificial

LCRa 4 mM de Ca^{2+} y Mg^{2+} : LCRa de concentración 4 mM de Ca^{2+} y Mg^{2+}

LTD: Depresión a largo plazo

LTP: Potenciación a largo plazo

mEPSC: Corrientes excitatorias en miniatura

mIPSC. Corrientes inhibitorias en miniatura

mPSC: Corrientes en miniatura

NMDA: N-metil-D-aspartato.

NMDAR: Receptor de glutamato tipo NMDA

PTX: Picrotoxina

TTX: Tetrodotoxina

2. Resumen

Los procesos de plasticidad sináptica homeostática (PSH) comprenden una serie de mecanismos compensatorios dependientes del grado de actividad de los circuitos neuronales, de manera que perturbaciones que aumenten o disminuyan crónicamente la actividad del circuito son compensadas mediante distintos mecanismos que causan una disminución, o aumento, respectivamente, de la actividad. Estos fenómenos podrían mantener la actividad del circuito dentro de un rango dinámico. Para detectar estos fenómenos de plasticidad, suele requerirse la incubación de las neuronas durante días en agentes farmacológicos que induzcan un aumento o disminución de la actividad, previo a realizar mediciones. No obstante, en nuestro laboratorio fue previamente descrito, en neuronas piramidales de hipocampo de rata, un fenómeno de PSH de rápido desarrollo (horas en lugar de días). Este fenómeno se caracteriza por un aumento en el tiempo de la frecuencia y amplitud de las corrientes excitatorias en miniatura, y se desarrolla espontáneamente durante las 8-12 horas de incubación, sin intervenciones farmacológicas. Para evaluar los mecanismos subyacentes a los cambios en la frecuencia y amplitud se deben realizar distintos experimentos de corrientes evocadas por estimulación presináptica. Sin embargo, los eventos evocados mediante protocolos de estimulación resultan de carácter polifásico e irregular (i.e. corrientes múltiples, seguidas una de otra, sin forma reproducible), lo cual no permite realizar los análisis. Otras evidencias previas indican que el componente regular y monofásico puede ser aislado al utilizar una solución de registro alta en cationes divalentes (Ca^{2+} y Mg^{2+}). Dado que el uso de dicha solución podría afectar la observación del fenómeno homeostático mismo, en este trabajo se estudiaron, mediante la técnica de *voltage-clamp*, los efectos que podría tener el uso de esta

solución sobre el aumento de la frecuencia y amplitud de los eventos en miniatura. Se determinó la existencia de un proceso homeostático en estas condiciones, observándose un aumento en el tiempo de la frecuencia de los eventos en miniatura, no pudiéndose determinar concluyentemente el aumento en la amplitud. Esta observación valida futuros estudios complementarios de corrientes evocadas en presencia de altos divalentes para investigar posibles mecanismos de expresión del fenómeno.

3. Abstract

Homeostatic synaptic plasticity processes comprise a series of compensatory mechanisms that depend on the activity levels of the neuronal circuits, so that perturbations that upregulate or downregulate chronically the activity of the circuit are counterbalanced by different mechanisms that downregulate or upregulate the activity of the circuit, respectively. These processes may allow keeping the activity of neuronal networks in a dynamic range. To detect these plasticity phenomena, it is usually necessary to incubate neurons for a few days in presence of pharmacological agents that either upregulate or downregulate their activity prior to measurements. However, our laboratory has described a homeostatic plasticity process of rapid development (hours instead of days, which is what is usually observed). This phenomenon is observed in pyramidal neurons of rat hippocampus slices incubated for 8-12 hours and is characterized by an increase in time of the frequency and amplitude of miniature excitatory synaptic currents. To evaluate the underlying mechanisms of the changes in frequency and amplitude it is necessary to carry out recordings of evoked currents. However, and in concordance with previous preliminary data from this laboratory, the evoked events in these cells and conditions displayed polyphasic and irregular

characteristics, which rendered the analysis unfeasible. However, other evidence suggests that the monophasic, more regular component of the evoked response can be isolated using a recording solution high in divalent cations (Ca^{2+} and Mg^{2+}). However, the use of this solution could have secondary side effects that alter the measurement of the plasticity phenomenon. Here, the *voltage-clamp* technique was used to examine whether the increase in frequency and amplitude of the miniature events can be observed in these conditions. The frequency change was observed, but the detection of the amplitude change was not conclusive. These observations validate future studies of evoked currents in high divalent cations to investigate possible mechanisms of expression of the homeostatic phenomenon.

4. Introducción

El cerebro es capaz de almacenar y procesar la información proveniente de los órganos sensoriales generando respuestas que permitan la adaptación y supervivencia de los animales (Squire y col., 2008). Sin embargo, el cerebro no es una estructura estática, sino que presenta plasticidad: existe un remodelamiento continuo tanto a nivel de circuito, neuronas individuales e incluso sinapsis específicas (Citri y Malenka, 2008; Squire y col., 2008; Turrigiano, 2011; Stuchlik, 2014). Entre los mecanismos de plasticidad son bien conocidos los procesos de potenciación o depresión a largo plazo (LTP: *long term potentiation* y LTD: *long term depression*, respectivamente), en donde sinapsis específicas aumentan o disminuyen su eficiencia (i.e. la amplitud de la respuesta postsináptica ante un mismo estímulo) en función de su “historia” de actividad, respectivamente. La LTP y LTD son comúnmente denominados como formas de “plasticidad Hebbiana” o “plasticidad dependiente de la coincidencia temporal de disparo” y dependen de la coincidencia temporal entre la descarga presináptica y la

postsináptica. La repetida ocurrencia de la descarga postsináptica dentro de una ventana de ~20 ms después de la descarga presináptica lleva a una potenciación de la sinapsis (LTP), mientras que una ocurrencia de la descarga postsináptica dentro de una ventana de ~20 ms antes de la descarga presináptica lleva a una depresión de la sinapsis (LTD) (Bliss y Collingridge, 1993; Bi y Poo, 1998). Si bien fenómenos como la LTP pueden ser generados segundos después del protocolo de inducción, éstos perduran por horas o hasta días luego de ser inducidos (Bliss y Lømo, 1973; Davis y col., 1997).

Tanto la LTP como la LTD han sido y siguen siendo ampliamente estudiados, principalmente en sinapsis glutamatérgicas, descubriéndose distintos mecanismos y receptores de neurotransmisores involucrados. Estos procesos se postulan actualmente como una de las bases celulares y moleculares de la memoria y el aprendizaje, pues suponen una manera rápida de modificar sinapsis de forma duradera y dependiente de la actividad (Bliss y Collingridge, 1993; Lynch, 2004; Whitlock y col., 2006). Sin embargo, ya que este tipo de mecanismos permite que se generen instancias de *feedback* positivo, en que una sinapsis potenciada tiene mayor probabilidad de despolarizar suficientemente la neurona postsináptica y por tanto facilitar aun más la ocurrencia de futuras potenciaciones de esta misma y otras sinapsis, lo cual se repetiría hasta que toda sinapsis sería capaz de evocar potenciales de acción, llevando a una saturación de la actividad. Por el contrario, una sinapsis deprimida tendría una menor probabilidad de despolarizar la neurona postsináptica, de manera que se propicia la futura depresión de esta, llevando al “apagamiento” o silenciamiento de ésta. Dado que estos escenarios no ocurren, se piensa que existen mecanismos compensatorios que los evitan (Zenke y Gerstner, 2017).

Por otra parte, existe otro tipo de plasticidad sináptica, que ha sido llamado plasticidad sináptica homeostática (PSH), en que las neuronas regulan la eficiencia sináptica manteniéndola dentro de un rango dinámico. Es decir, según la actividad del circuito neuronal, aumenta o disminuye la eficiencia de transmisión de las sinapsis, manteniendo un cierto nivel de actividad estable (Turrigiano y col., 1998; Turrigiano, 2011). En Turrigiano y col. (1998), se observó que al inhibir la actividad de neuronas de corteza visual de rata mediante la incubación durante 48 horas con tetrodotoxina (TTX, un inhibidor de canales de sodio activados por voltaje), este período de inactividad generaba un aumento de la amplitud de corrientes excitatorias en miniatura (mEPSC, *miniature excitatory post synaptic current*), que son las corrientes postsinápticas debidas a la liberación espontánea de neurotransmisores desde los terminales presinápticos. Lo contrario fue observado cuando se incubaban las neuronas en presencia de bicuculina (toxina que bloquea receptores GABA-érgicos). Lo anterior indica que los cambios en las sinapsis tienden a mantener una homeostasis del nivel de actividad de las neuronas (i.e. el disparo de potenciales de acción basal en el tiempo). Además, se observó que estos cambios en la amplitud de las corrientes en miniatura a través de receptores de glutamato de tipo α -amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol-propionato (AMPA), obedecen una regla de escalamiento sináptico multiplicativo, es decir, el peso de cada sinapsis es escalado por un factor (e.g. cada sinapsis aumenta su transmisión al doble, o triple, etc.). Esto tendría por consecuencia que el peso relativo entre las distintas sinapsis de la neurona es mantenido, lo que conserva la información codificada en los distintos pesos relativos de las sinapsis (Turrigiano y col., 1998; Pozo y Goda, 2010; Kim y col., 2012).

Dadas estas propiedades que permitirían la mantención de una homeostásis de la actividad mediante una regulación global de todas las sinapsis, manteniéndose el peso relativo entre éstas, se ha postulado a los fenómenos de PSH como los posibles reguladores de los procesos Hebbianos, que impedirían la saturación o silenciamiento de sinapsis (Turrigiano, 2011; Keck y col., 2017) mencionado en párrafos anteriores. Sin embargo, la manera en que se relacionan estos procesos de PSH con los procesos Hebbianos no se comprende del todo y dado que las escalas temporales de ambos tipos de plasticidad son muy diferentes (procesos Hebbianos inducidos en segundos en comparación a procesos homeostáticos que se desarrollan en días) este tema sigue siendo intensamente estudiado (Fox y Stryker, 2017).

La PSH ha sido sujeto de mucha investigación, observándose diferentes mecanismos que involucran tanto cambios presinápticos como los son cambios en el número y tasa de recambio de las vesículas presinápticas (Thiagarajan y col., 2005) así como la cantidad de neurotransmisores contenidas en las mismas (De Gois, 2005), cambios en el flujo de calcio hacia el interior de los terminales presinápticos que alteran la probabilidad de liberación (Zhao y col., 2011), entre otras (Fernandes y Carvalho, 2016) y postsinápticos como lo son cambios en el número y composición de subunidades de receptores AMPA (Pozo y Goda, 2010; Fernandes y Carvalho, 2016), así como el agrupamiento de éstos receptores en nanodominios en la densidad postsináptica y el número de estos dominios (Scheefhals y Macgillavry, 2018).

Para estudiar estos fenómenos de plasticidad homeostática se han utilizado preparaciones tanto in vitro como in vivo, tras la incubación prolongada en compuestos que inhiben o aumentan la actividad neuronal (Pozo y Goda, 2010), ya sea de cultivos de neuronas disociadas (Turrigiano y col., 1998; Desai y col., 1999; Kilman y col., 2002;

Sutton y col., 2006; Ibata y col., 2008), así como de rebanadas en cultivo (rebanadas organotípicas) (van Welie y col., 2004); y mediante el registro de actividad neuronal tras la privación o estimulación prolongadas de vías sensoriales en animales vivos (Hengen y col., 2013, 2016).

La gran mayoría de los estudios han sido realizados en cultivos de neuronas disociadas, lo cual, si bien permite conocer detalles de los mecanismos involucrados en los procesos de plasticidad homeostáticos, presentan el inconveniente de que no permiten conocer la relevancia fisiológica de dichos procesos. En cambio, el uso de rebanadas permite deducir posibles implicancias fisiológicas, debido a que en éstas se mantiene más intacto el circuito neuronal de interés (Pozo y Goda, 2010).

Recientemente, en un trabajo realizado en nuestro laboratorio (Vergara, 2016), se observó un fenómeno de PSH de rápido desarrollo (i.e. sólo horas en vez de días) y que no requiere de ningún tratamiento farmacológico para ser inducido (fenómeno no reportado en otros laboratorios hasta la fecha). Este fenómeno se observó en rebanadas agudas de hipocampo de rata, viéndose que la frecuencia y amplitud promedio de las mEPSCs registradas en neuronas de la región CA1 registradas 9 a 12 horas después de haber sido preparadas (período que denominaremos como “tardío”), son mayores que las frecuencias y amplitudes promedio de neuronas de rebanadas registradas entre 5 a 8 horas post preparación (período “temprano”). Además, se determinó que el aumento en la amplitud de las mEPSC sigue una regla de escalamiento sináptico multiplicativo (Vergara, 2016). Este proceso homeostático se debería a la disminución de la actividad de las neuronas, generado por la preparación de las rebanadas, y su relevancia se basa en que se trata de un modelo de cambios homeostáticos rápidos generados por desaferenciación, lo que podría contribuir al

estudio de lo que ocurre en las primeras horas después de algunas formas de daños neurológicos.

Para investigar los posibles mecanismos subyacentes a este fenómeno de PSH mediante aproximaciones electrofisiológicas, es posible realizar experimentos de corrientes post sinápticas excitatorias evocadas (EPSCs), que consisten en el registro de la respuesta de corriente de una neurona a la estimulación de vías aferentes. Para estudiar el fenómeno de aumento de amplitud, pueden realizarse mediciones de la razón entre las corrientes debidas a activación de receptores de N-metil-D-aspartato (NMDAR) y las corrientes de AMPARs, y así evaluar posibles cambios en la razón de NMDARs y AMPARs en las sinapsis. También pueden evaluarse cambios en la constante de decaimiento de corrientes de NMDAR para estudiar posibles modificaciones en la composición de subunidades de los NMDARs. Otra aproximación es evaluar cambios en la rectificación de corrientes debidas a AMPAR, para estudiar la posibilidad de cambios en la composición de subunidades de AMPARs. En relación al aumento de la frecuencia, pueden realizarse experimentos de facilitación de las corrientes evocadas por estimulación presináptica mediante pulsos pareados. Estos cambios sugerirían modificaciones en la probabilidad de liberación de neurotransmisores desde los terminales presinápticos, si bien estos experimentos deben complementarse con otros que evalúen posibles cambios en el número de sinapsis silentes, puesto que el cambio de sinapsis silentes en funcionales también puede manifestarse en un experimento de pulsos pareados, así como también el análisis de fallos frente a estimulación mínima para estudiar cambios a nivel de sinapsis individuales como el aumento del número de nanodominios de receptores (ver discusión), y análisis de fluctuaciones del promedio, varianza y coeficiente de variación

de la amplitud de corrientes postsinápticas, que permiten realizar una estimación de parámetros que determinan la conducción sináptica, como el tamaño cuántico y número de sitios de liberación de neurotransmisores (Scheuss y Neher, 2001).

Sin embargo, evidencia previa de nuestro laboratorio indica que, en esta preparación, dichos experimentos deberán ser realizados en condiciones de registro distintas a las usadas en la descripción del fenómeno homeostático de aumento de la amplitud y frecuencia de los mEPSC. En las condiciones normales de registro, las corrientes evocadas pueden presentar un carácter irregular (**Figura 1**), probablemente debido a eventos polisinápticos que aparecen cuando se bloquean las sinapsis inhibitorias con un bloqueador de receptores GABA-A (Crépel y col., 1997), condición necesaria para aislar corrientes evocadas glutamatérgicas. Este hecho hace imposible el análisis de corrientes evocadas.

Estos eventos polisinápticos han sido descritos en neuronas piramidales de la región CA1 y se ha propuesto que pueden eliminarse mediante el uso de una solución de registro de alta concentración de divalentes: 4 mM de Ca^{2+} y 4 mM de Mg^{2+} lo que corresponde al doble y cuádruple, respectivamente, de la concentración de cada divalente utilizada originalmente (Liao y Walters, 2002; Sivaramakrishnan *et al.*, 2013). Efectivamente, evidencia del laboratorio ha mostrado que, en estas condiciones, las corrientes sinápticas se vuelven regulares (**Figura 1**), lo que permitiría realizar los experimentos de corrientes evocadas descritos. Sin embargo, cabe preguntar si acaso la manifestación del fenómeno homeostático en sí no se vería afectada por las nuevas condiciones de registro, dado que el Mg^{2+} es un ion que es capaz de bloquear los NMDAR y que, al ser aumentada su concentración en la solución de registro, podría disminuir la amplitud de corrientes mediadas por dichos receptores (Slutsky y col.,

2010). Además, es bien conocido el efecto antagónico del Mg^{2+} con el Ca^{2+} en la frecuencia de potenciales de placa neuromuscular, en donde el aumento del Ca^{2+} extracelular produce un aumento de la frecuencia de estos eventos, mientras que el Mg^{2+} la disminuye (J.I.Hubbard, 1961; Südhof, 2012). Por otra parte, en cultivos de neuronas de neocorteza de ratón, ha sido descrito que la frecuencia de mEPSCs depende de la concentración de Ca^{2+} y Mg^{2+} en el medio extracelular. Esto se debe principalmente a la interacción de dichos iones con los receptores de Ca^{2+} tipo CasR, viéndose un aumento en la frecuencia cuando se aumentan las concentraciones de cualquiera de estos iones (Vyleta y Smith, 2011).

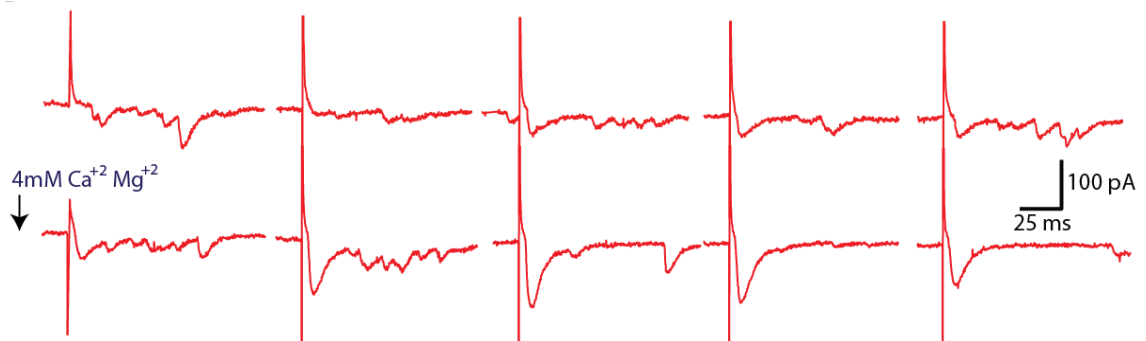


Figura 1. Las corrientes evocadas irregulares son eliminadas por el uso de una alta concentración de divalentes en la solución de registro. Se muestran 10 registros de corrientes evocadas glutamatérgicas (en presencia de PTX) en neuronas de CA1, cada registro está separado por 25 segundos, la flecha indica el momento en que se agregó Ca^{2+} y Mg^{2+} a la solución de registro hasta una concentración de 4mM de cada uno. Se observa que la elevación de éstos divalentes permite obtener un registro monofásico y regular. Imagen obtenida de Vergara (2017).

Dada la conocida influencia de las concentraciones de los iones Ca^{2+} y Mg^{2+} sobre la frecuencia, y posibles efectos sobre la amplitud de los eventos en miniatura, en este trabajo se propone investigar si en condiciones de registro con alta concentración de divalentes, se mantiene la detección del fenómeno homeostático de aumento de la frecuencia y la amplitud descrito previamente (Vergara, 2016). De este modo, se

determinará la pertinencia del uso de altos divalentes en la solución de registro para estudiar mediante experimentos de corrientes evocadas los posibles mecanismos involucrados en el proceso de PSH rápido.

4.1 Hipótesis:

En alta concentración de divalentes en la solución de registro, también se observa el fenómeno homeostático de aumento de la frecuencia y amplitud de los mEPSC en el tiempo.

4.2 Objetivos:

-General:

Determinar si en presencia de una solución de registro de alta concentración de divalentes se observa un aumento de la frecuencia y/o de la amplitud de los mEPSC en el tiempo.

-Específico:

Realizar los registros de mEPSC en dos períodos distintos de tiempo post rebanado, en condiciones de alta concentración de divalentes, y evaluar cambios en la amplitud y frecuencia de los eventos.

5. Materiales y Métodos

5.1 Cuidado animal

Las ratas utilizadas para los experimentos fueron mantenidas en condiciones acordes a las normas de bioética establecidas por la Universidad de Chile. Para anestesarlas, fueron puestas en una caja plástica cerrada que contenía una bola de algodón a la que se le puso previamente 1,5 mL de isofluorano. La anestesia se corroboró mediante la

aplicación de presión en la cola de la rata y la observación de ausencia de reflejo ante este estímulo.

5.2 Preparación de rebanadas agudas de hipocampo

Ratas de entre 18 a 22 días postnatales fueron anestesiadas como se describió anteriormente y decapitadas para la extracción del cerebro. El cerebro extraído fue sumergido inmediatamente en solución de disección fría ($\sim -1^{\circ}\text{C}$) consistente en los siguientes compuestos (concentraciones en mM): NaCl (124), KCl (2,8), NaH_2PO_4 (1,25), NaHCO_3 (26), glucosa (10), ácido ascórbico (0,4), CaCl_2 (0,5) y MgSO_4 (10), disueltos en agua bidestilada. Ésta se encontraba siendo burbujeada con gas consistente en 95% O_2 y 5% CO_2 .

Posteriormente, se cortaron ambos hemisferios del cerebro y se procedió a preparar las rebanadas coronales de hipocampo de 350 micrones de espesor usando un vibrátomo (1000 plus, Vibratome®) y finalmente se cortó la zona correspondiente a la región de CA3 del hipocampo con una navaja. Todos los procedimientos anteriormente descritos se realizaron con el tejido cerebral mantenido en la solución de disección fría.

5.3 Condiciones de incubación de las rebanadas

Inmediatamente después de preparadas, las rebanadas fueron puestas de a 2 ó 3 en cámaras de interfaz (con poros de 8 μm de diámetro) que se encontraban en una atmósfera saturada con 95% O_2 y 5% CO_2 y a 30°C , e inmediatamente se procedió a reemplazar con una micropipeta la gota de solución de disección en la que se hallaban las rebanadas por una gota de 200 μL de solución de líquido cefalorraquídeo artificial (LCRa) consistente en (concentraciones en mM): NaCl (124) KCl (2,8) NaH_2PO_4 (1,25) NaHCO_3 (26) glucosa (10), ácido ascórbico (0,4), CaCl_2 (2) y MgSO_4 (2), disueltos en

agua bidestilada. Luego de 1hr desde dicho cambio de solución, se procedió a realizar un recambio con 200 μ L de solución de LCRa fresca.

Desde este punto las rebanadas fueron mantenidas entre 4 a 12 horas para ser registradas (**Figura 2**).

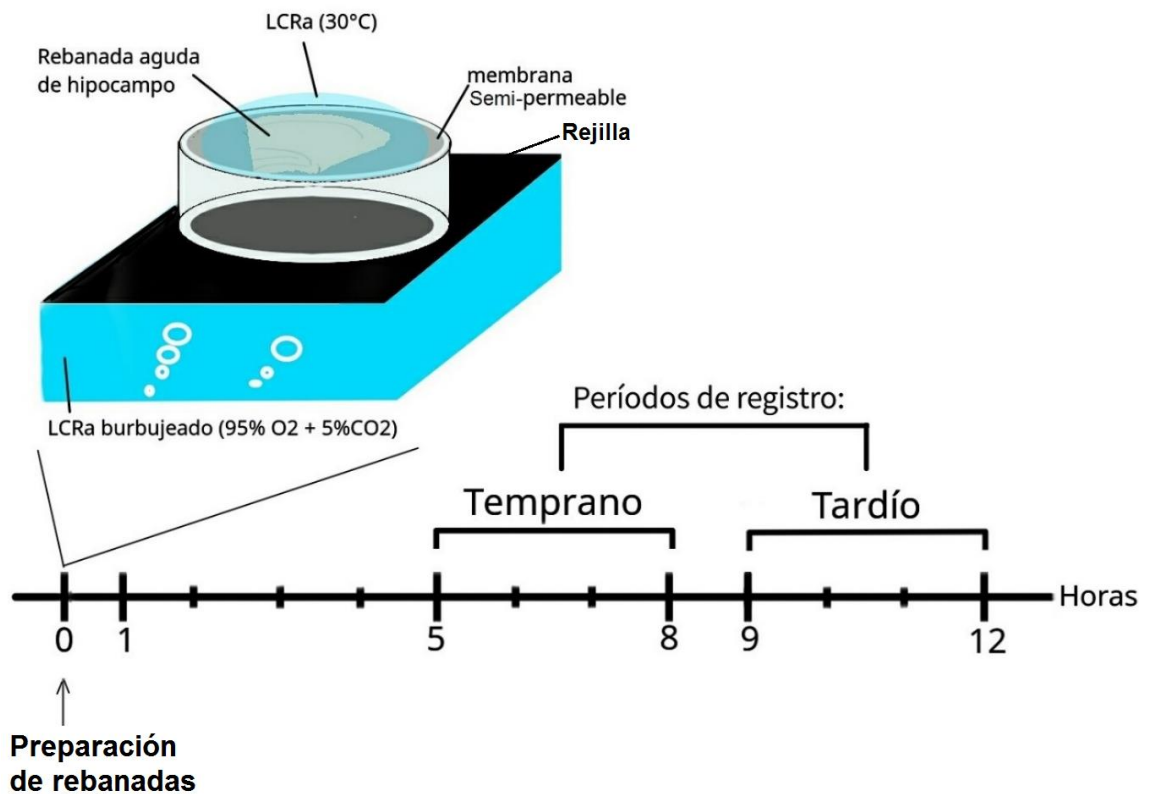


Figura 2. Protocolo experimental. Luego de ser preparadas, las rebanadas de hipocampo fueron mantenidas durante 1 hora en una gota de LCRa en la cámara de interfaz, a 30°C. Transcurrido este tiempo, la gota fue reemplazada con una gota fresca de LCRa. Luego, 4 horas más tarde, comenzaron los registros de mEPSC durante 3 horas (período “temprano”), se realizó una pausa durante 1 hora y finalmente se retomó el registro de mEPSC por 3 horas más (período “tardío”) con una rebanada distinta.

5.4 Registros electrofisiológicos

La técnica de *whole-cell patch-clamp*, en modalidad *voltage-clamp* fue empleada para medir mEPSC a un voltaje de mantención de -60 mV, durante ~6 minutos, en dos períodos de tiempo distintos: entre 5 a 8 horas post-rebanado (período denominado como “temprano”) y entre 9 a 12 horas post-rebanado (período denominado como “tardío”); para esto, las rebanadas fueron puestas en una cámara de inmersión situada bajo un microscopio (Nikon E600FN) equipado con microscopia de contraste por interferencia diferencial (DIC), en la cual recirculaba una preparación de LCRa 4 mM de Ca^{2+} y Mg^{2+} , constantemente burbujeadado con 95% O_2 y 5% CO_2 , a un flujo de 1-2 mL/min desde un volumen total de 100 mL.

Las drogas picrotoxina (PTX), bloqueador de corrientes GABA-A) y TTX fueron agregadas al recipiente de LCRa un mínimo de 5 minutos antes de iniciar los registros (concentraciones finales de 100 y 1 μMolar respectivamente).

Para los registros, se utilizaron electrodos de cloruro de plata en puntas hechas a partir de capilares de borosilicato (0,8 – 1,10 x 100 mm; Kimble Glass Inc.) estiradas en un puller horizontal (Flaming/Brown P- 97, Sutter Instrument Co.), rellenas con solución de composición (en mM): Cs-metanosulfonato (115), CsCl (20), EGTA (0,6), HEPES (10), $\text{Na}_2\text{-ATP}$ (4), Na-GTP (0,4), $\text{Na}_2\text{-fosfocreatina}$ (10), MgCl_2 (2,5), (290 mOsm, pH 7,25).

Los registros de mEPSC fueron obtenidos mediante un amplificador HEKA EPC-9 (Heka, Heidelberg, Germany), conectado a un computador, midiendo mEPSC a un potencial de -60 mV durante 400 segundos con una frecuencia de muestreo de 20 kHz y un filtro Bessel de 2,9 kHz (**Figura 3**). Los registros seleccionados fueron aquellos provenientes de células cuya corriente de mantención a -70 mV no fuera más negativa

que -130 pA, y cuya resistencia en serie fuera menor a 30 MOhm. Además, se corroboró que, en promedio, la razón entre la resistencia en serie y la resistencia de entrada, entre las células de un período de tiempo y el otro, no fuera significativamente distinto.

Además, se realizó el registro de EPSC. Para esto se utilizaron los mismos instrumentos y arreglos descritos anteriormente, con LCRa (normal). Para evocar las EPSC se usó un electrodo de estimulación ubicado en la zona de los colaterales de Schaffer, consistente en una pipeta theta de dos electrodos (positivo y negativo) rellena con LCRa. La estimulación se realizó mediante un estimulador Isostim™ A320.

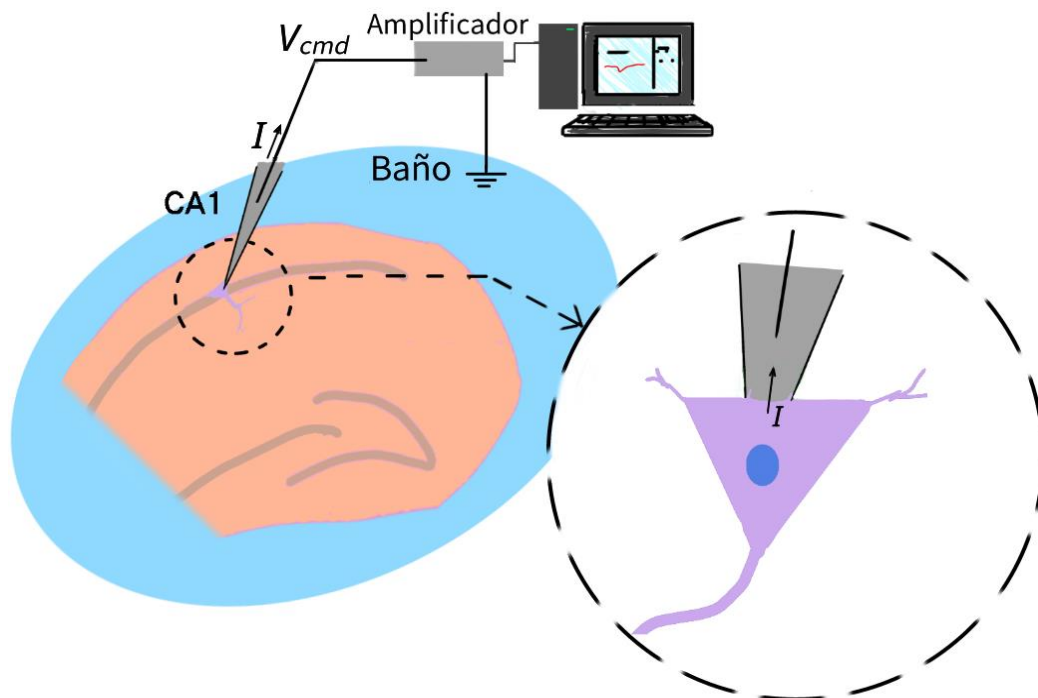


Figura 3. Esquema simplificado de la técnica de *whole-cell patch-clamp* en modalidad *voltage-clamp*. El electrodo de registro se ubica en contacto con la superficie celular, logrando por succión la continuidad eléctrica entre ambos compartimentos. Se mide la corriente necesaria (I), ya sea negativa como positiva, que debe inyectarse para mantener un voltaje de comando (V_{cmd}).

5.5. Preparativos para el registro de mEPSCs

Dado que se requiere de TTX para impedir el disparo de potenciales de acción durante el registro y PTX para aislar la respuesta de corrientes glutamatérgicas, se realizaron ensayos para verificar que las preparaciones de dichas drogas fueran efectivas, previo al registro de mEPSCs.

5.5.1. Prueba del efecto de TTX

El TTX es un inhibidor de los canales de sodio dependientes de voltaje y por tanto del potencial de acción (Hammond, 2008), para corroborar su efecto sobre la actividad de las neuronas, se registró, mediante *whole-cell patch-clamp* en modalidad *current-clamp*, la respuesta de voltaje de una neurona de CA1 en reposo (-70mV) ante la inyección de una rampa de corriente ascendente de hasta 250 pA, antes de la aplicación de TTX a la solución de registro y 5 minutos después de agregar dicha toxina. Se observó que el TTX eliminó por completo la aparición de potenciales de acción por el estímulo de corriente en el experimento de *current-clamp* (**Figura 4**), indicando que la TTX utilizada abolía la activación de los canales de sodio dependientes de voltaje.

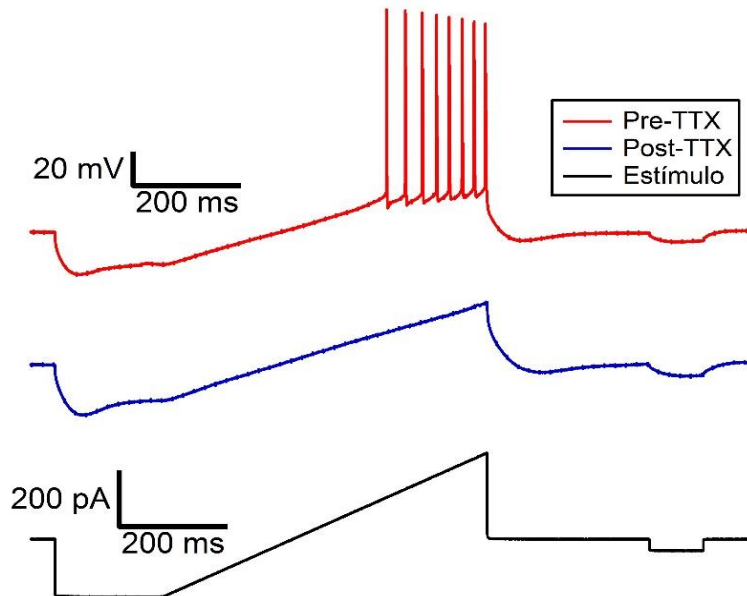


Figura 4. La aplicación de TTX al baño de registro elimina la aparición de potenciales de acción. Se muestran el registro de voltaje en *current clamp*, al aplicar una rampa de corriente despolarizante (trazo negro, en pA) a una neurona en reposo antes de agregar TTX (trazo rojo) y después de agregar TTX (concentración final de $1 \mu\text{M}$) al baño de registro (trazo azul). Sólo se observan potenciales de acción cuando no hay TTX.

5.5.2. Prueba del efecto del PTX

Para corroborar el efecto del PTX, se optó por registrar las mEPSC mediante *voltage-clamp*, antes y después de agregar PTX al baño de registro. Estos registros se realizaron a un voltaje de 0 mV puesto que las corrientes GABAérgicas poseen un potencial de reversión de ~ -60 mV (en las condiciones de registro) y por tanto se observarán como corrientes positivas a 0 mV. Por otro lado, las corrientes glutamatérgicas, que invierten ese potencial, no serán observables, aislando así las corrientes GABAérgicas (mIPSCs, del inglés *miniature inhibitory post synaptic currents*).

Se observó que tras la adición de PTX los eventos de origen GABAérgico eran completamente eliminados (**Figura 5**).

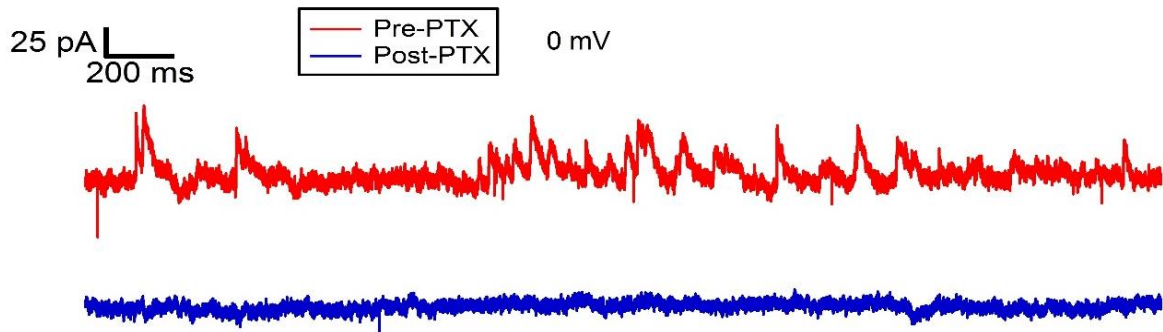


Figura 5. La aplicación de PTX al baño de registro elimina las corrientes GABAérgicas. Se muestran trazos de un registro de corriente previo a la adición de PTX (rojo) y otro posterior a la adición de PTX (concentración final de 100 μ M) al baño de registro (azul). Son observables mPSC a 0 mV sólo cuando no hay PTX. Los experimentos fueron realizados en presencia de TTX para de impedir el disparo de potenciales de acción.

5.6 Cuantificación de los mEPSCs

Los eventos en miniatura fueron cuantificados mediante un algoritmo aplicado en el programa IgorPro 6.3, previamente utilizado por Vergara (2016), el cual es una modificación del algoritmo creado por Kudoh y Taguchi (2002) (**Figura 6**).

Previo a la cuantificación de eventos, el algoritmo realiza un suavizado del registro que consiste en una convolución de los datos originales con coeficientes normalizados derivados del triángulo de pascal, calculados según el parámetro de suavizado, en este caso $n=25$, basado en el trabajo de Marchand y Marmet (1983). Este proceso mejora considerablemente la relación señal-ruido sin alterar los parámetros estadísticos de los eventos analizados (Vergara, 2016).

El algoritmo posee dos etapas, en la primera (**Figura 6**) se comienza en el tiempo inicial del registro, analizando una ventana móvil de tiempo de 2 ms, centrada en el tiempo medio de dicha ventana “ i ”, dentro de la cual se calcula el valor promedio de la corriente a la que se le denomina “ $A(i)$ ”. Con esta ventana móvil se busca un tiempo “ $i+w$ ” (donde “ w ” representa un tiempo de 2 ms) a la derecha de i cuya corriente es “ $A(i+w)$ ”, tal que la diferencia entre $A(i)$ y $A(i+w)$ sea mayor a un umbral “ Tr ”, en este caso, 5 pA (valor determinado empíricamente). Si esto no se cumple, la ventana temporal avanza un punto (cada punto corresponde a un valor de corriente registrada, digitalizada cada 0,05 ms) y se repite este proceso hasta hallar un punto en que se cumpla el criterio. Una vez hallado este punto, se determina el tiempo al que ocurre éste como posible tiempo de inicio de un evento en miniatura (t_{event}), entonces el algoritmo evalúa en una ventana temporal de 0,5 ms a la izquierda de t_{event} , si es que se cumple que el punto tiene un valor de corriente menor al promedio, pero no más allá de una desviación estándar (SD) de éste (barras negras, **Figura 6**) en dicha ventana temporal. En caso de cumplirse esto último, el algoritmo selecciona dicho tiempo como el verdadero tiempo de inicio del evento (t_{onset}), en caso de no cumplirse esta condición, se analiza el siguiente punto hacia la izquierda de t_{event} , si no se cumple, se analiza el punto a la izquierda de éste y así sucesivamente hasta que se cumpla el criterio y se determine el verdadero tiempo de inicio o hasta que se llegue a un tiempo límite de búsqueda (en este caso 2 ms) sin haberlo encontrado y se descarte el evento. Finalmente, se calcula el punto pico del evento, de manera similar, mediante la búsqueda desde t_{event} hacia la derecha (dentro de un límite de búsqueda de 3 ms), del primer punto cuya corriente sea más negativa que una desviación estándar bajo el promedio de amplitudes de una ventana de 0,5 ms ubicada a la derecha del punto que está siendo evaluado como posible pico. Para terminar esta primera etapa se guarda el

evento, se establece el tiempo del punto pico como nuevo valor de i , y se repite el proceso ya descrito.

En una última etapa, el algoritmo filtra los eventos encontrados en el paso anterior por su constante de decaimiento, descartando todos aquellos eventos cuya constante de decaimiento sea menor a 1,1 ms (valor empírico para descartar cierto tipo de ruido especialmente prevalente).

Una vez seleccionados los eventos, se miden distintos parámetros de los eventos de mEPSCs como la amplitud, intervalo entre eventos y tiempos de decaimiento. A partir de los datos de intervalos entre eventos se calculó la frecuencia promedio (en Hz) de eventos como el inverso del promedio entre éstos y la amplitud promedio como el promedio de todas las amplitudes de los eventos.

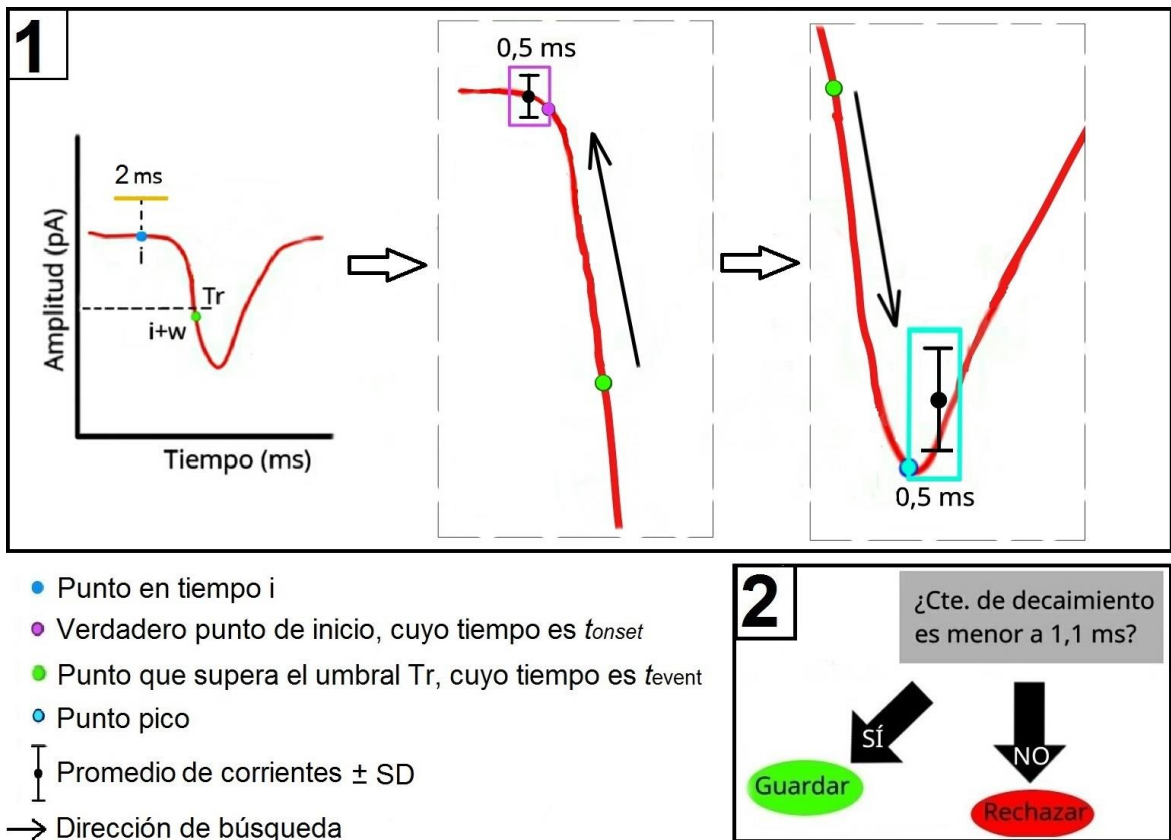


Figura 6. Representación esquemática del algoritmo de detección de mEPSCs en el registro obtenido por *voltage-clamp*. 1: Primero se busca un posible punto de inicio (imagen de la izquierda), luego se evalúa si dicho punto cumple las condiciones exigidas (ver texto). Si no las cumple, se busca hacia la izquierda de éste, un punto que las cumpla y se establece como verdadero punto de inicio (imagen del centro). Luego se busca el punto pico mediante un método similar en una ventana de tiempo a la derecha del primer punto en el que se cruzó el umbral de detección (imagen de la derecha). 2: Finalmente, en la etapa 2 se discrimina si el evento encontrado es válido o no según su constante de decaimiento desde el pico. En el ejemplo se muestra un evento que cumple con las condiciones exigidas. Las flechas pequeñas indican la dirección de búsqueda del punto en cada caso.

5.7 Análisis estadísticos y tratamiento de datos

Para comparar los registros de ambos períodos de tiempo (temprano y tardío), se utilizó, la prueba t de student para comparar amplitudes y frecuencias promedio de

mEPSC, y la prueba de Kolmogorov-Smirnov (K-S) para comparar las distribuciones de amplitud y frecuencia de mEPSC en ambos períodos.

Para comparar dos distribuciones de datos, suele usarse una prueba de K-S (Turrigiano y col., 1998; Kim y col., 2012) el cual es una prueba estadística no paramétrica que se basa en la construcción de curvas de distribución de probabilidad acumulada (CPDF; del inglés *cumulative probability distribution function*, ver **Figura 7**), en donde cada set de datos se agrupa en dos distribuciones a comparar, en este caso se agrupan todas las amplitudes de todos los eventos, de todas las células de un mismo período de tiempo, se construyen las funciones de densidad de probabilidad acumulada (CPDF) de cada período, y luego se comparan entre sí, mediante la medición de la distancia máxima entre ambas CPDF, la cual se designa como estadígrafo “D”. Este valor D es mapeado en tablas que muestran el valor de P para distintos valores de D, indicativo de la probabilidad de observar un valor de D entre dos CPDF cuando se asume como hipótesis nula que los datos con los que se construyeron dichas CPDF provienen de una misma distribución.

En el presente caso, cada distribución de eventos de cada célula registrada en un mismo período tenía un número muy disímil de eventos, y esto tendría por consecuencia que, al realizar una prueba de K-S agrupando los eventos de todas las células de un mismo período, aquellas con un mayor número de eventos ponderarían mucho más que aquellas de menor número de eventos.

Dado lo anterior, se optó por emplear una aproximación implementada previamente (Vergara, 2016), que consiste en una prueba de K-S con valores críticos obtenidos mediante el uso de simulaciones de Montecarlo diseñadas para determinar valores críticos de probabilidad para el estadígrafo D. Brevemente, éste método consiste en el

cálculo de las CPDF de un parámetro a comparar (i.e. amplitud o intervalo entre eventos) de cada célula registrada, la agrupación de estas distribuciones por período de registro y la obtención de la CPDF promedio en cada período, de manera de obtener una CPDF del período temprano y otra del período tardío y calcular el valor de D. Luego se agrupan todas las CPDF de ambos períodos de registro en un solo grupo, el cual es usado para generar 2 grupos aleatorios, compuestos cada uno del número de curvas que originalmente se tenían para cada período, luego se calcula la CPDF promedio de cada grupo y se mide su valor de D. Este proceso se repite 10.000 veces mediante simulaciones de Montecarlo y así se obtiene una curva de probabilidad acumulada para el estadígrafo D como el que se muestra en el inserto de la **Figura 8**. Finalmente, se busca la distancia máxima obtenida entre las CPDF promedio obtenidas originalmente, en dicha curva, para conocer la probabilidad de observar dicho valor cuando las curvas comparadas provienen de una misma distribución. En la **Figura 8** se ejemplifica un caso donde se obtuvo que para un valor de $D=0,086$, P tiene un valor de 0,05, es decir, si se considera como significativo un valor de $P>0,05$, entonces la diferencia D debe ser mayor o igual a 0,086 para ser considerada significativa.

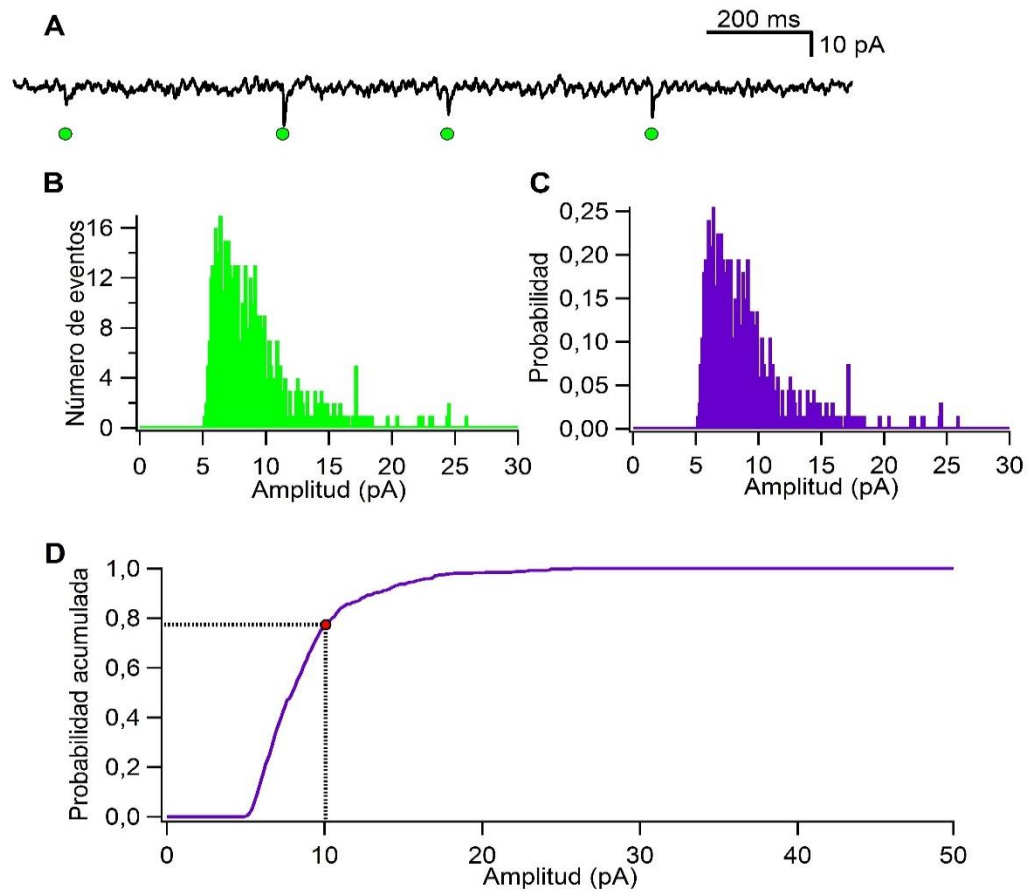


Figura 7. Construcción de curvas de función de distribución de probabilidad acumulada a partir de los datos de amplitud de mEPSC de una célula. A: Se muestra un segmento del registro de corriente de una célula (trazo negro) y los eventos de mEPSC marcados (puntos verdes). B: Histograma de amplitudes de los eventos de la célula. Para cada intervalo (o bin) de amplitud se muestra el número de eventos observados dentro de dicho intervalo. C: Histograma de probabilidades construido a partir de B; se divide el número de observaciones de cada intervalo de amplitudes por el número total de observaciones. D: Curva de función de distribución de probabilidad acumulada (CPDF) construida en base a C; ésta se realiza integrando en una dimensión el histograma de probabilidad, acumulándose la probabilidad para cada intervalo de amplitudes. Éste último gráfico muestra cuál es la probabilidad de hallar una amplitud menor o igual a un cierto valor, como por ejemplo 10 pA; en tal caso, puede verse en el gráfico que la probabilidad de que hallar una amplitud menor o igual a 10 pA es de 0,77 (punto rojo).

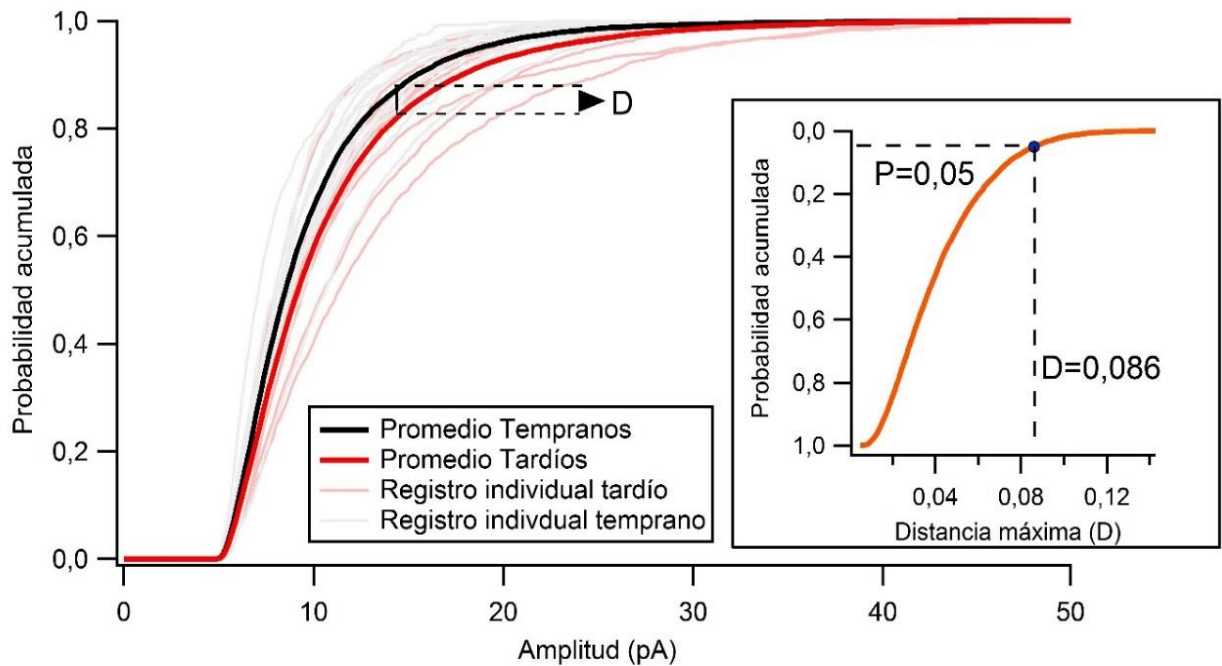


Figura 8. Cálculo de probabilidad de observar la distancia máxima D entre dos CPDF. Como ejemplo, se muestra el caso de las CPDF promedio obtenida a partir de las CPDF de amplitudes de cada célula, para cada período de registro, y su distancia máxima calculada (D) (curvas negra y roja). El inserto muestra la curva de probabilidad para cada valor de D , obtenida mediante simulaciones de Montecarlo.

6. Resultados

En primer lugar y en línea con los objetivos de aprendizaje de este trabajo, se realizó un experimento de protocolo de pulsos pareados, para corroborar la irregularidad de las corrientes evocadas cuando se utiliza PTX en la solución de registro. Este resultado se muestra en la Figura Suplementaria 1 (**Figura S1**)

6.1. Registro de mEPSC en solución alta en divalentes.

Con el propósito de evaluar la observación del fenómeno de PSH en solución alta en divalentes, se procedió a registrar eventos de mEPSC durante ~6 minutos a un voltaje de mantención de -60 mV, en una solución de registro de LCRa 4 mM de Ca²⁺ y Mg²⁺. En estas condiciones, se registraron eventos distinguibles de mEPSCs (**Figura 9**), siendo posible analizar la amplitud de cada evento, así como el intervalo de tiempo entre cada uno.

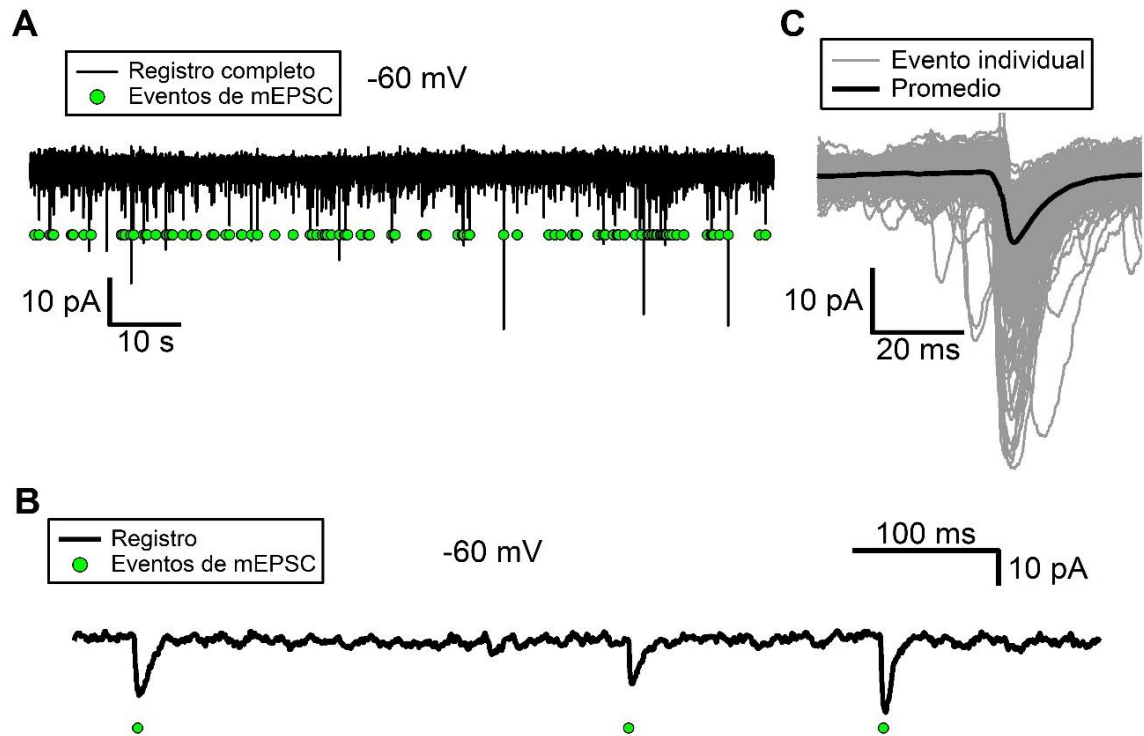


Figura 9. Registro representativo de mEPSCs. A: Segmento de un registro completo de corrientes medidas en *voltage-clamp* (trazo negro) y eventos reconocidos por el algoritmo como mEPSC (puntos verdes). B: Ampliación de una fracción del trazo mostrado en A, C: Superposición de los mEPSC seleccionados por el programa (líneas grises) y promedio de éstos (curva negra).

6.2 Evaluación del fenómeno de PSH en solución alta en divalentes.

6.2.1 Comparación de la frecuencia de mEPSCs en los períodos temprano y tardío

Los registros se realizaron en 2 períodos: período “temprano”: entre 5 a 8 hrs post-rebanado y “tardío”: entre 9 a 12 hrs post-rebanado.

Con el fin de evaluar y comparar las frecuencias de mEPSCs en ambos períodos de registro, se calculó, en primer lugar, el promedio de la frecuencia de los mEPSCs para cada célula como el inverso del promedio de los intervalos entre eventos consecutivos.

Luego, estos valores fueron promediados para obtener la frecuencia promedio de mEPSCs de cada período de registro.

Al comparar la frecuencia promedio entre ambos tiempos de registro mediante prueba t de student, se observa una diferencia significativa: tiempos tempranos= $2,7 \pm 0,5$ Hz; tiempos tardíos= $5,4 \pm 0,4$ Hz; diferencia entre ambos = $100 \pm 33\%$ (prueba t de student con corrección de Welch: $P=0,0002$) (**Figura 10**).

Estos resultados indican que, al registrar en solución de alta concentración de divalentes, el fenómeno homeostático de aumento de la frecuencia es robusto, lo que coincide con lo observado previamente en el laboratorio en condiciones de registro con concentraciones fisiológicas de Ca^{2+} y Mg^{2+} (Vergara, 2016).

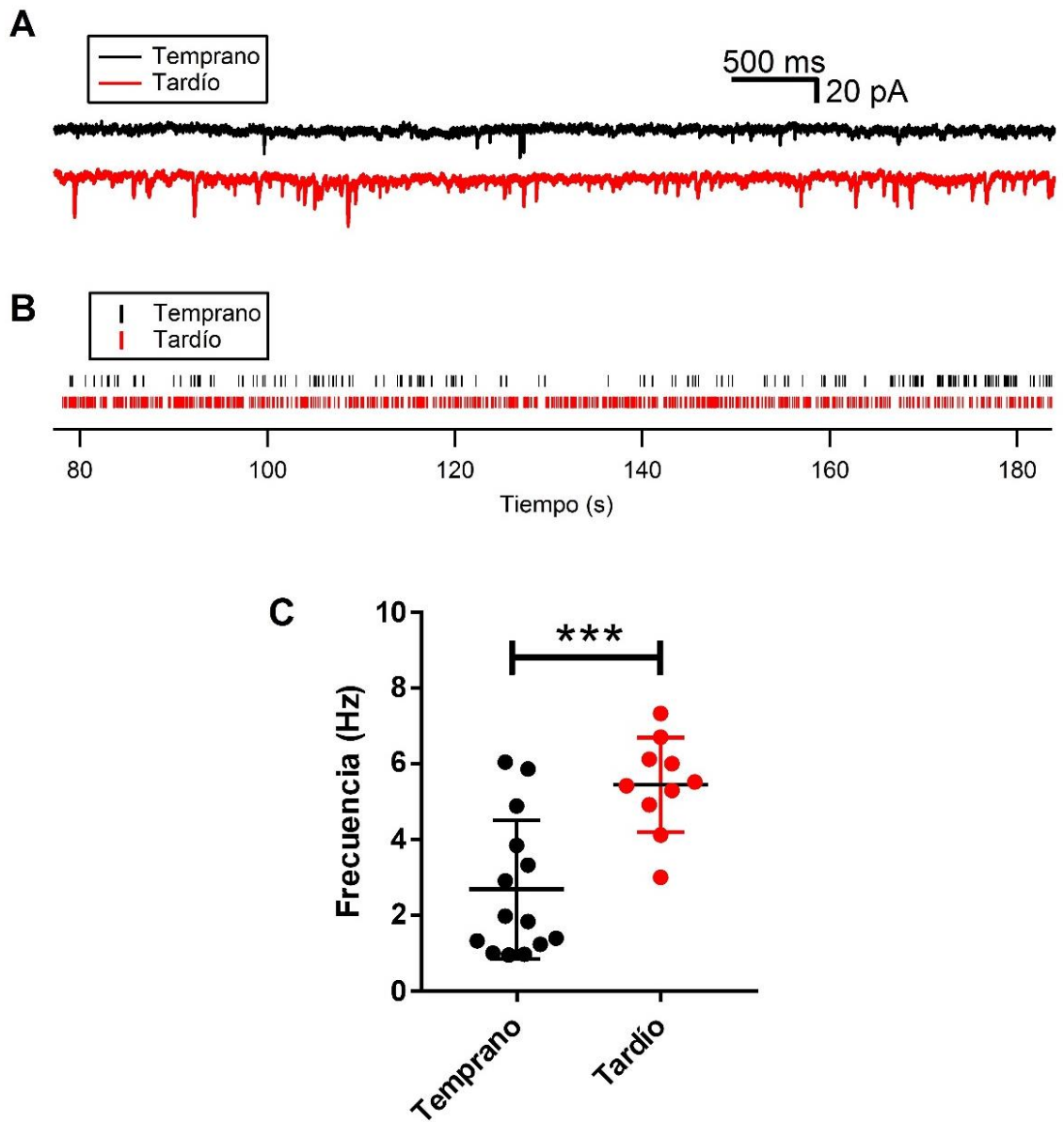
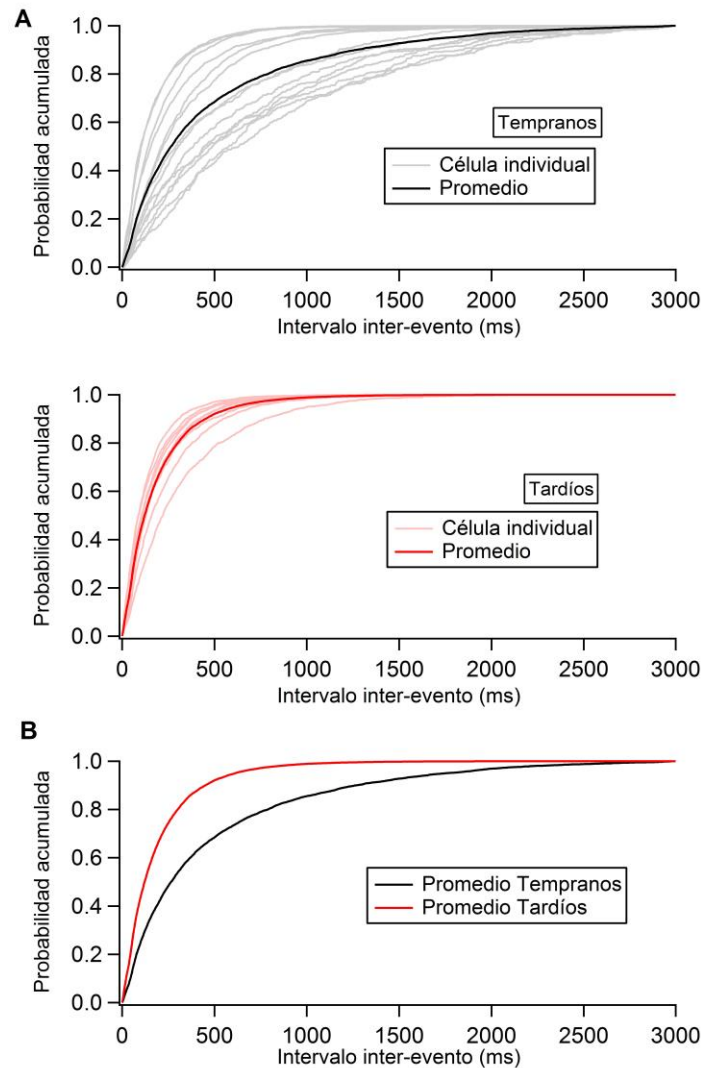


Figura 10. Aumento de la frecuencia de mEPSCs en el tiempo. A: Trazos representativos de registros de corrientes provenientes de una célula registrada en período temprano (trazo negro) y de una registrada en periodo tardío (trazo rojo). B: Raster plot de eventos en miniatura en una ventana de tiempo de 100 segundos, construido con los eventos de las mismas células de las cuales provienen los trazos en A; cada línea corresponde a la ocurrencia de un evento de mEPSC. C: Comparación mediante prueba t de student, de las frecuencias promedio a tiempos tempranos (círculos negros, n=14) y tardíos (círculos rojos, n=10). *** P < 0,001. Las varianzas obtenidas fueron significativamente distintas (prueba de normalidad de Shapiro-Wilk), por lo que se usó una prueba t de student con corrección de Welch.

Finalmente, las distribuciones de intervalos entre eventos resultaron ser significativamente distintas ($D=0,265$ y $P=0,0013$; **Figura 11**), lo que se condice con el gran aumento en la frecuencia de mEPSCs a tiempos tardíos.



6.2.2. Comparación de las amplitudes de mEPSCs tempranas y tardías

Luego, para comparar las amplitudes promedio de mEPSCs entre ambos períodos de registro, se calculó la amplitud promedio de mEPSCs para cada célula y estos valores fueron promediados para obtener la amplitud promedio de mEPSCs para cada período de registro.

Al comparar los promedios de amplitud a tiempos tempranos y tardíos, se observa un aumento significativo de la amplitud promedio de éstos, a tiempos tardíos respecto de los tempranos: amplitud a tiempos tempranos = $10,0 \pm 0,3$ pA; a tiempos tardíos = $11,1 \pm 0,5$ pA; diferencia entre ambos = $11 \pm 8\%$ (prueba t de student: $P = 0,0444$) (**Figura 12**).

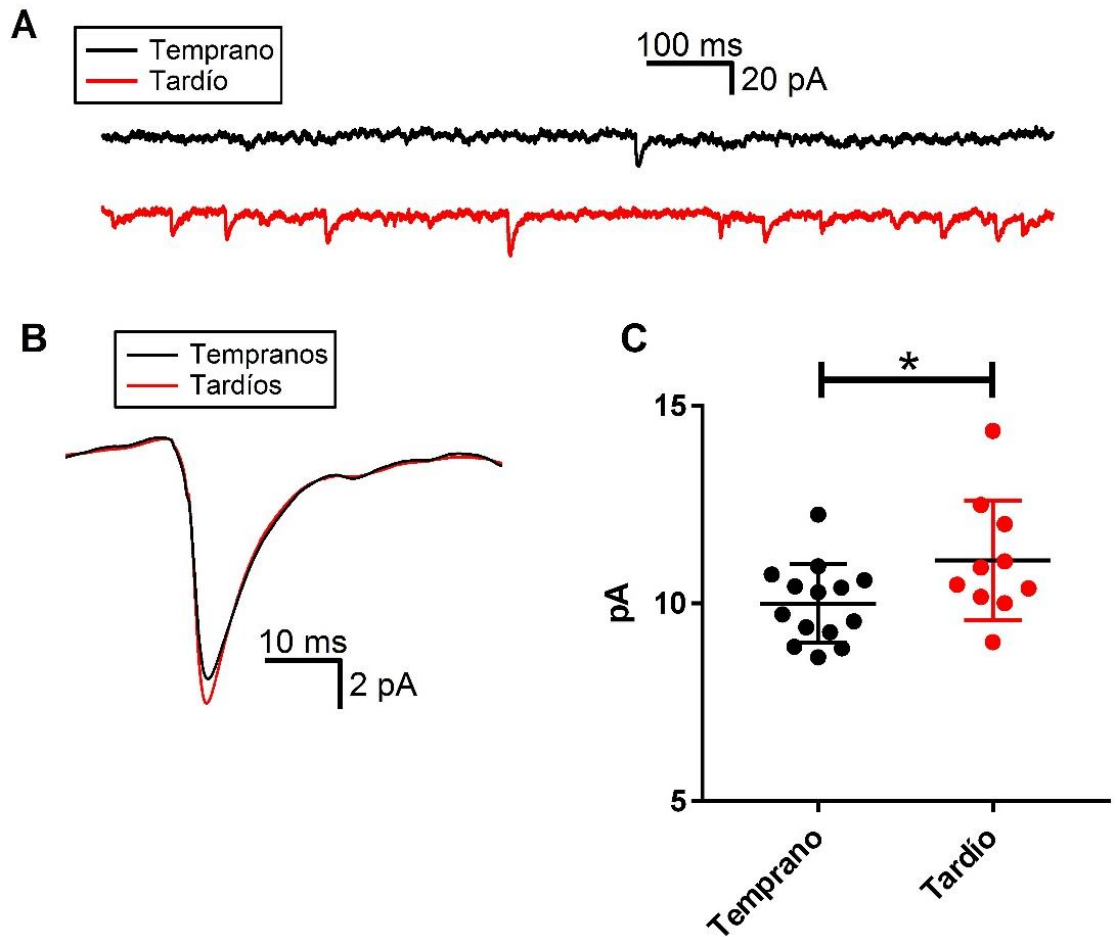


Figura 12. Aumento de la amplitud de mEPSCs en el tiempo. A: Trazos representativos de registros de corrientes provenientes de una célula registrada en período temprano (trazo negro) y de una registrada en periodo tardío (trazo rojo). B: Superposición de los mEPSC promedio por tiempos: primero se calcula el evento promedio para cada célula y luego se promedian éstos por condición. Tiempos tempranos: curva negra, n=14. Tiempos tardíos: curva roja, n=10. C: Comparación de las amplitudes promedio de cada célula para períodos tempranos y tardíos. Prueba t de student, * $P < 0,05$.

Para evaluar si también se observan diferencias en las distribuciones de eventos tempranos y tardíos, se calcularon las distribuciones para cada célula y la distribución promedio de éstas por período (**Figura 13**). Al realizar la prueba de K-S, con valores críticos obtenidos mediante simulaciones de Montecarlo, entre las curvas promedio de amplitudes de un período de registro y otro, las distribuciones no presentan diferencias significativas. Dado esto, no se prosiguió con la evaluación de escalamiento sináptico.

La prueba de K-S con valores críticos obtenidos mediante simulaciones de Montecarlo muestra que no hay diferencias significativas entre ambas distribuciones ($P=0,06$; $D=0,080$; registros tempranos: $n=14$ y registros tardíos: $n=10$).

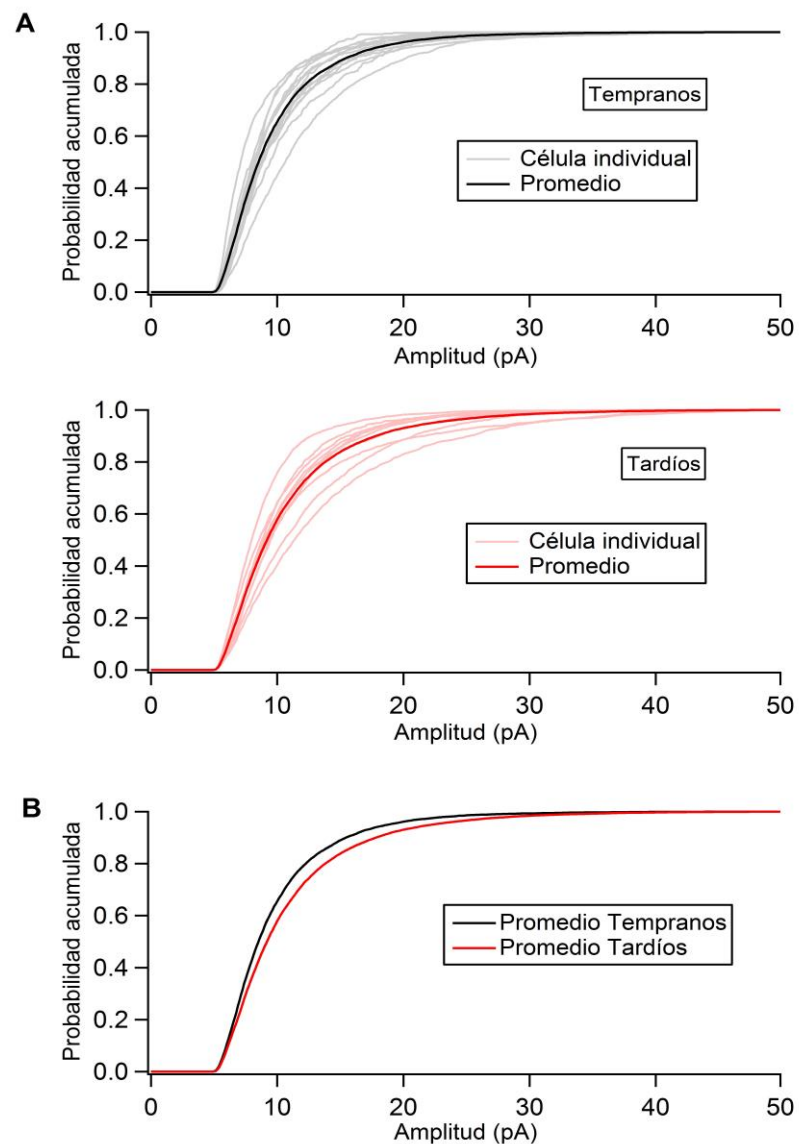


Figura 13. Distribuciones de probabilidad acumulada (CPDF) de amplitudes de mEPSCs para cada período de registro. A: Se muestran las distribuciones de probabilidad acumulada de amplitudes para cada célula registrada decada período de tiempo, así como el promedio de dichas CPDF, para cada período de tiempo de registro (temprano; imagen superior, y tardío; imagen inferior). B: Superposición de las curvas promedio de cada período mostrado en A.

7. Discusión y Proyecciones

La presencia de corrientes irregulares en las células de CA1 durante la inhibición de la transmisión GABAérgica, ha sido descrita previamente en otros trabajos (Crépel y col., 1997; Sivaramakrishnan y col., 2013) y en nuestro modelo de estudio (P. Vergara; **Figura S1**). Una explicación posible de este fenómeno sería que la descarga de los colaterales de Schaffer estimule a una población de neuronas en CA1, que a su vez estimulen a la neurona que está siendo registrada, causando una serie de despolarizaciones seguidas. Esta suposición se basa en evidencia que muestra conexiones excitatorias longitudinales entre neuronas de CA1 (Yang y col., 2014), que si bien se verían disminuidas en la preparación usada en este trabajo (cortes transversales y no longitudinales de hipocampo), no estarían del todo ausentes. Podría ser el caso que la actividad de estas neuronas con conexiones longitudinales sobre la neurona registrada esté siendo inhibida normalmente por sinapsis inhibitorias, de modo que, al agregar PTX a la solución de registro, estas sinapsis dejarían de ejercer su efecto inhibitorio, causando que dichas neuronas puedan descargar más fácilmente, respondiendo al estímulo aplicado a los colaterales de Schaffer y estimulando, por tanto, a la neurona registrada. El uso de una solución alta en divalentes elimina los eventos polisinápticos (Liao y Walters, 2002; Sivaramakrishnan *et al.*, 2013; Vergara, 2017)

Los registros de mEPSCs mostraron que al usar esta solución de registro de alta concentración de divalentes es posible observar un proceso homeostático de aumento de la frecuencia a tiempos tardíos en comparación con tiempos tempranos. Esta observación es similar a lo descrito en trabajos anteriores en que se registró en LCRa con concentraciones normales de divalentes (Vergara, 2016, 2017).

El aumento de la frecuencia fue observado tanto en el promedio de frecuencias como en la distribución de intervalos inter-eventos, manifestándose un corrimiento de la distribución tardía hacia intervalos más cortos respecto a la distribución temprana. Se puede afirmar entonces que el uso de esta solución externa no impide observar el cambio en la frecuencia. La diferencia observada en este trabajo fue de un $\sim 100 \pm 33\%$, mientras que la diferencia observada anteriormente (Vergara, 2016) en solución regular fue de $280,40 \pm 59,34\%$. Una posible explicación de esto sería que las altas concentraciones de Ca^{2+} hayan aumentado la probabilidad basal de liberación de neurotransmisor, lo que causaría que a tiempos tempranos las frecuencias de mEPSCs sean mayores, en cambio, la probabilidad de liberación a tiempos tardíos podría no verse mayormente afectada por las altas concentraciones de Ca^{2+} puesto que los mecanismos homeostáticos ya habrían elevado ésta hasta un punto cercano a la saturación, de modo que los aumentos en este valor serían menores. Lo anterior causaría que en la solución alta en divalentes la diferencia entre la frecuencia a tiempos tempranos y tardíos sea menor. Aun así, el aumento de la frecuencia promedio observado en este trabajo es muy robusto.

Por otro lado, si bien se observó un aumento en el promedio de amplitudes, no fue posible detectar una diferencia significativa de la distribución de amplitudes.

La discrepancia entre lo encontrado al comparar el promedio de amplitudes y la distribución de éstas probablemente se deba al carácter más conservador del análisis mediante simulaciones de Montecarlo comparado con la prueba t de student, aunque tampoco puede descartarse la contribución de algún efecto de las condiciones de registro sobre la forma de las CPDF de amplitudes de cada período, que las haga levemente más similares entre sí y disminuya cualquier diferencia entre ambas.

Ahora bien, un mecanismo que explique el presente resultado podría ser también que, el aumento de la amplitud a tiempos tardíos se deba a la incorporación de AMPAR impermeables a Ca^{2+} , de esta manera, el alto Ca^{2+} aumentaría el *driving force* de dicho ion a tiempos tempranos, pero no a tiempos tardíos, y por tanto la amplitud de los mEPSCs a tiempos tempranos sería mayor, lo cual tendría el efecto de disminuir la diferencia observada respecto a los tiempos tardíos, haciendo que logre detectarse esta diferencia mediante la prueba t de student pero no mediante la comparación de distribuciones por método de simulaciones de Montecarlo debido al carácter más conservador de este último.

Puesto que el fenómeno homeostático de aumento de la frecuencia está presente también al registrar en solución alta en divalentes, una implicancia importante de los resultados de este trabajo es que resulta válido utilizar un protocolo de pulsos pareados en estas condiciones experimentales para evaluar si este aumento se debe a un incremento en la probabilidad de liberación de neurotransmisores. Sin embargo, como se discutió en la introducción, es necesario complementar estos experimentos con otros que permitan obtener información sobre posibles cambios pre y postsinápticos. Por otra parte, existe evidencia de que en rebanadas agudas de cerebro de rata ocurre un aumento del número de sinapsis dentro de la primera hora post-rebanado en comparación a una preparación de cerebro completo (Kirov y col., 1999), lo cual sería un mecanismo que involucra tanto el elemento pre como post sináptico. Para evaluar si hay un aumento de sinapsis en la etapa tardía de nuestros experimentos respecto de la etapa temprana, podría compararse la densidad de terminales presinápticos o de espinas dendríticas mediante métodos

inmunohistoquímicos a períodos tempranos y tardíos, y ver si hay diferencias significativas en el promedio.

Otro mecanismo, que sería de carácter tanto pre como post sináptico, del aumento en la frecuencia, podría ser la transformación de sinapsis silentes en funcionales. Las sinapsis silentes sólo contienen NMDAR y su presencia podría evaluarse, por ejemplo, mediante ensayos de co-inmunofluorescencia con anticuerpos específicos contra NMDAR y específicos contra AMPAR, de manera de contabilizar el número de sinapsis que marquen positivo sólo para NMDAR (i.e. sinapsis silentes) (Liao y col., 2001), a ambos tiempos de registro y observar si hay diferencias en la densidad de éstas. Otra aproximación para evaluar la presencia de sinapsis silentes y cambios en su número sería mediante métodos electrofisiológicos: se miden EPSCs a una intensidad de estimulación mínima a potenciales negativos y positivos, en donde los registros a potenciales negativos corresponderían a corrientes a través de AMPAR y los registros a potenciales positivos a corrientes a través de AMPAR y NMDAR. Un menor porcentaje de fallos a potenciales positivos, comparado con los negativos, indica la existencia de sinapsis silentes (Kullmann, 2003). De este modo, es posible evaluar si hay cambios en la proporción de sinapsis silentes entre las etapas temprana y tardía.

Por otra parte, existe también la posibilidad de que el mecanismo de aumento en la frecuencia de mEPSCs observado tenga un importante componente netamente postsináptico. Esto, pues dado que el método de detección sólo cuenta aquellos eventos cuya amplitud supere un cierto umbral (en este caso, 5 pA), existe un sesgo en donde todos los eventos que caigan por debajo de este umbral no son considerados como tales y, por tanto, no contados, lo cual afecta la frecuencia calculada de eventos en el tiempo.

Esto induce a pensar que los cambios de origen postsináptico que subyacen al aumento de amplitud previamente encontrado (Vergara, 2016) podrían ser capaces de aumentar la amplitud de todos los mEPSCs de un período respecto a otro a un grado tal que a tiempos tardíos haya un mayor número de eventos que superen el umbral de detección (y que por tanto sean contabilizados), respecto del período temprano. Lo anterior causaría un aparente aumento de la frecuencia de eventos a tiempos tardíos respecto de los tiempos tempranos, sólo por el hecho de estar incluyendo más eventos dentro de los eventos contabilizados para el período tardío, mientras que la amplitud promedio no se vería tan afectada como la frecuencia pues los nuevos eventos contabilizados serían de amplitudes mucho menores al promedio. Si bien se encontró previamente que la abolición del aumento de la amplitud no altera el aumento de la frecuencia (Vergara, 2017), no puede descartarse que un cambio indetectable en la amplitud pueda, de todos modos, tener efectos de gran magnitud en la frecuencia medida. Otro posible mecanismo de origen postsináptico que explique el cambio en la frecuencia de mEPSCs comprendería un aumento del número nanodominios de receptores (agrupaciones de receptores) de glutamato en la densidad post sináptica, lo que haría más probable que los neurotransmisores liberados desde el terminal presináptico lleguen a activar suficientes receptores de glutamato como para producir una respuesta medible en la neurona post sináptica. Esto tendría por consecuencia un aumento en la frecuencia sin afectar la amplitud de los mEPSCs y asu vez, una disminución del número de fallos de EPSCs frente a estimulación mínima de vías aferentes (Scheefhals y Macgillavry, 2018).

Un aumento en la amplitud de mEPSCs, esto es, del tamaño cuantico, puede deberse a mecanismos post sinápticos como los mencionados en la introducción, en donde

ocurre una incorporación de receptores, usualmente AMPAR en la densidad postsináptica, de distintas composiciones de subunidades, usualmente inserción homómeros de subunidades GluA1. Por otra parte, podría sugerirse también un mecanismo de origen presináptico, pues el tamaño cuántico puede ser modulado mediante procesos que afecten la cantidad de neurotransmisores que contienen las vesículas en los terminales presinápticos. Una posibilidad sería la modificación de la expresión de transportadores de glutamato como VGLUT-1, el cual se ha visto que incrementa el tamaño cuántico cuando es sobre expresado in vitro (De Gois, 2005), y cuya abundancia en la sinapsis se ha visto modulada en respuesta a la inhibición o aumento de la actividad en cultivos disociados (Wilson, 2005). Para evaluar en una primera instancia esta posibilidad, podrían compararse los niveles VGLUT-1 en las sinapsis de preparaciones tempranas y tardías con tal de determinar cambios en su expresión, mediante Western blot en fracciones enriquecidas en membranas sinápticas así como los niveles de mRNA de VGLUT1 mediante RT-qPCR, y también realizando mediciones del tamaño de vesículas presentes en las zonas activas de las sinapsis mediante microscopía electrónica, pues se ha visto que el volumen de éstas se correlaciona con la cantidad de neurotransmisor que contiene (Daniels, 2004).

Finalmente, si bien los resultados no son concluyentes respecto de un posible aumento en la amplitud de los mEPSC entre un período y otro (discrepancia entre resultados de la prueba t de student y la prueba de K-S), el cambio en la frecuencia sí se observa claramente (ambas pruebas coinciden con un alto nivel de significancia). La observación de un evidente aumento en la frecuencia es similar a lo descrito anteriormente para una concentración normal de divalentes (Vergara, 2016). Por lo tanto, la solución alta en divalentes no enmascara la manifestación del fenómeno de

aumento de la frecuencia, validando el uso de esta solución para evaluar cambios pre y postsinápticos mediante las aproximaciones experimentales descritas en la introducción.

Otras direcciones futuras de investigación comprenderían una mayor caracterización de este fenómeno de PSH rápido, estudiando qué es lo que gatilla el proceso: Si acaso la desaferenciación de CA3 durante la preparación produce una disminución de la actividad neuronal y esto induce la respuesta homeostática, o si es alguna variable en el método de incubación que induce dicha respuesta, como por ejemplo, la acumulación de factores inflamatorios como TNF- α , que ha sido visto implicado en fenómenos de plasticidad homeostática (Stellwagen y Malenka, 2006), en la gota de LCRa donde se mantienen las rebanadas.

Para evaluar la primera posibilidad, habría que registrar mEPSCs en ambos tiempos, de rebanadas con CA3 versus sin CA3, y ver si se sigue observando el fenómeno de PSH, mientras que, para la segunda, habría que comparar la concentración de moléculas inflamatorias candidatas, como TNF- α , en el LCRa en que se mantienen las rebanadas, en ambos períodos de registro y ver si el bloqueo de receptores para dicha molécula inflamatoria durante la incubación elimina el fenómeno de PSH

Dado que este fenómeno podría tener su origen en procesos que ocurren durante la degradación del tejido, como se mencionó en el párrafo anterior, lo cual fue evidente durante la realización de los registros, en donde hubo gran dificultad para encontrar neuronas en buen estado hacia el período tardío, es posible que fenómenos similares tengan lugar durante las primeras horas tras la ocurrencia de lesiones o eventos traumáticos en el sistema nervioso *in vivo*, en donde la muerte celular inducida por éstos, trae consigo la desaferenciación de neuronas en los circuitos neuronales, así

como la liberación de factores pro inflamatorios (Deller y Frotscher, 1997), eventos que suponen una perturbación de la actividad del circuito que posiblemente gatille procesos homeostáticos como el aquí descrito, que podrían tener por efecto recuperar parte de la actividad normal del sistema. Esto último podría ser relevante en un contexto clínico, a la hora de tratar lesiones que hayan ocurrido dentro de unas pocas horas, en donde se requiere el restablecimiento funcional de las conexiones nerviosas para la recuperación del paciente, por lo que su mayor comprensión podría derivar en aplicaciones clínicas para dichos casos.

8. Conclusiones

El uso de una concentración alta en divalentes en la solución de registro no enmascara el aumento de la frecuencia de mEPCs, y por ende es una condición válida para evaluar la probabilidad de liberación de neurotransmisor mediante pulsos pareados, complementados con experimentos de estimulación mínima y análisis de fluctuaciones cuánticas.

9. Bibliografía

Bi, G. y Poo, D. M. (1998) "Synaptic Modifications in Cultured Hippocampal Neurons: Dependence on Spike Timing, Synaptic Strength, and Postsynaptic Cell type", *The Journal of Neuroscience*, 18(24), pp. 10464–10472.

Bliss, T. V. P. y Lømo, T. (1973) "Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path", *The Journal of Physiology*, 232(2), pp. 331–356.

Bliss, T. V y Collingridge, G. L. (1993) "A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus.", *Nature*, 361(6407), pp. 31–39.

Citri, A. y Malenka, R. C. (2008) "Synaptic plasticity: Multiple forms, functions, and mechanisms", *Neuropsychopharmacology*, 33(1), pp. 18–41.

Crépel, V., Khazipov, R. y Ben-Ari, Y. (1997) "Blocking GABA(A) inhibition reveals AMPA- and NMDA-receptor-mediated polysynaptic responses in the CA1 region of the rat hippocampus.", *Journal of neurophysiology*, 77(4), pp. 2071–82.

Daniels, R. W. (2004) "Increased Expression of the Drosophila Vesicular Glutamate Transporter Leads to Excess Glutamate Release and a Compensatory Decrease in Quantal Content", *The Journal of Neuroscience*, 24(46), pp. 10466–10474.

Davis, S. y col. (1997) "Induction and duration of long-term potentiation in the hippocampus of the freely moving mouse", *The Journal of Neuroscience Methods*, 75(1), pp. 75–80.

Deller, T. y Frotscher, M. (1997) "Lesion-induced plasticity of central neurons: Sprouting of single fibres in the rat hippocampus after unilateral entorhinal cortex lesion", *Progress in Neurobiology*, 53(6), pp. 687–727.

Desai, N. S., Rutherford, L. C. y Turrigiano, G. G. (1999) "Plasticity in the intrinsic excitability of cortical pyramidal neurons.", *Nature neuroscience*, 2(6), pp. 515–20.

Fernandes, D. y Carvalho, A. L. (2016) "Mechanisms of homeostatic plasticity in the excitatory synapse", *Journal of Neurochemistry*, pp. 973–996.

De Gois, S. (2005) "Homeostatic Scaling of Vesicular Glutamate and GABA Transporter Expression in Rat Neocortical Circuits", *The Journal of Neuroscience*, 25(31), pp. 7121–7133.

Fox K, Stryker M. (2017) "Integrating Hebbian and homeostatic plasticity: introduction."

Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 372: 20160413.

Hammond, C. (2008) *Cellular and Molecular Neurophysiology*, PP 46 y 195. *Academic Press*.

Hengen, K. B. y col. (2013) "Firing rate homeostasis in visual cortex of freely behaving rodents", *Neuron*. Elsevier Inc., 80(2), pp. 335–342.

Hengen, K. B. y col. (2016) "Neuronal Firing Rate Homeostasis Is Inhibited by Sleep and Promoted by Wake", *Cell*. Elsevier Inc., 165(1), pp. 180–191.

Ibata, K., Sun, Q. y Turrigiano, G. G. (2008) "Rapid Synaptic Scaling Induced by Changes in Postsynaptic Firing", *Neuron*, 57(6), pp. 819–826.

J.I.Hubbard (1961) "The effect of calcium and magnesium on the spontaneous release of transmitter from mammalian motor nerve endings", *Journal of Physiology*, 159, pp. 507–517.

Keck, T. y col. (2017) "Integrating Hebbian and homeostatic plasticity: the current state of the field and future research directions", *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1715), p. 20160158.

Kilman, V., van Rossum, M. C. W. y Turrigiano, G. G. (2002) "Activity deprivation reduces miniature IPSC amplitude by decreasing the number of postsynaptic GABA(A) receptors clustered at neocortical synapses.", *The Journal of Neuroscience*, 22(4), pp. 1328–1337.

Kim, J., Tsien, R. W. y Alger, B. E. (2012) "An improved test for detecting multiplicative homeostatic synaptic scaling", *PLoS ONE*, 7(5), pp. 1–9.

Kirov, S. A., Sorra, K. E. y Harris, K. M. (1999) "Slices have more synapses than

perfusion-fixed hippocampus from both young and mature rats.”, *The Journal of Neuroscience*, 19(8), pp. 2876–86.

Kullmann, D. M. (2003) “Silent synapses: what are they telling us about long-term potentiation?”, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 358(1432), pp. 727–733.

Liao, D., Scannevin, R. H. y Huganir, R. (2001) “Activation of silent synapses by rapid activity-dependent synaptic recruitment of AMPA receptors.”, *The Journal of Neuroscience*, 21(16), pp. 6008–17.

Lynch, M. A. (2004) “Long-term potentiation and memory.”, *Physiological Reviews*, 84(1), pp. 87–136.

Pozo, K. y Goda, Y. (2010) “Unraveling mechanisms of homeostatic synaptic plasticity”, *Neuron*, 66(3), pp. 337–351.

Scheefhals N., y Mcgilavry H., (2018) “Functional organization of postsynaptic glutamate receptors”, *Molecular and Cellular Neuroscience*, 91, September 2018, pp 82-94

Scheuss, V. and Neher, E. “Estimating Synaptic Parameters from Mean, Variance, and Covariance in Trains of Synaptic Responses” 1970 *Biophysical Journal*, 81 October 2001, pp. 1970–1989

Sivaramakrishnan, S., Sanchez, J. T. y Grimsley, C. A. (2013) “High concentrations of divalent cations isolate monosynaptic inputs from local circuits in the auditory midbrain”, *Frontiers in Neural Circuits*, 7(October), pp. 1–17.

Slutsky, I. y col. (2010) “Enhancement of Learning and Memory by Elevating Brain Magnesium”, *Neuron*. Elsevier Ltd, 65(2), pp. 165–177.

Squire, L. y col. (2008) *Fundamental Neuroscience*. 3ª ed, L. Squire y col. (Eds.), pp 15, Academic Press.

Stellwagen, D. y Malenka, R. C. (2006) "Synaptic scaling mediated by glial TNF- α ", *Nature*, 440(7087), pp. 1054–1059.

Stuchlik, A. (2014) "Dynamic learning and memory, synaptic plasticity and neurogenesis: an update", *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 8(April), pp. 1–6.

Südhof, T. C. (2012) "Calcium control of neurotransmitter release", *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(1).

Sutton, M. A. y col. (2006) "Miniature Neurotransmission Stabilizes Synaptic Function via Tonic Suppression of Local Dendritic Protein Synthesis", *Cell*, 125(4), pp. 785–799.

Turrigiano, G. (2011) "Homeostatic Synaptic Plasticity: Local and Global Mechanisms for Homeostatic Synaptic Plasticity: Local and Global Mechanisms for Stabilizing Neuronal Function", *Cold Spring Harb Perspect Biol*, pp. 1–18.

Turrigiano, G. G. y col. (1998) "Activity-dependent scaling of quantal amplitude in neocortical neurons", *Nature*, 391(6670), pp. 892–896.

Vergara, P. (2016) *Escalamiento sináptico homeostático rápido en rebanadas agudas de hipocampo (tesis de pregrado)*, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Vergara, P. (2017) *Role of the Ca²⁺/calmodulin kinase II (CaMKII) and its interaction with the NMDA receptor in homeostatic synaptic plasticity (tesis de magister)*, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Vyleta, N. P. y Smith, S. M. (2011) "Spontaneous Glutamate Release Is Independent of Calcium Influx and Tonicly Activated by the Calcium-Sensing Receptor", *The Journal*

of Neuroscience, 31(12), pp. 4593–4606.

van Welie, I., van Hooft, J. A. y Wadman, W. J. (2004) “Homeostatic scaling of neuronal excitability by synaptic modulation of somatic hyperpolarization-activated Ih channels”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(14), pp. 5123–5128.

Whitlock, J. R. y col. (2006) “Learning induces long-term potentiation in the hippocampus”, *Science*, 313(5790), pp. 1093–1097.

Wilson, N. R. (2005) “Presynaptic Regulation of Quantal Size by the Vesicular Glutamate Transporter VGLUT1”, *The Journal of Neuroscience*, 25(26), pp. 6221–6234.

Yang, S. y col. (2014) “Interlamellar CA1 network in the hippocampus”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(35), pp. 12919–12924.

Zenke F, Gerstner W. (2017) “Hebbian plasticity requires compensatory processes on multiple timescales.” *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372: 20160259

Anexo

Para estudiar los mecanismos subyacentes al fenómeno rápido de PSH se requiere realizar experimentos de EPSCs, sin embargo, las corrientes evocadas en las presentes condiciones no permitirían dichos análisis.

A modo de confirmación de los resultados anteriores (Vergara, 2016) y a modo de ejemplificar lo que ocurre al intentar realizar experimentos de EPSCs, se procedió a realizar experimentos de pulsos pareados y se encontró que la respuesta evocada al estimular en presencia de PTX presentaba efectivamente un carácter irregular, polifásico, que hacía imposible la cuantificación sistemática de la amplitud, especialmente de la respuesta al segundo pulso (**Figura S1**).

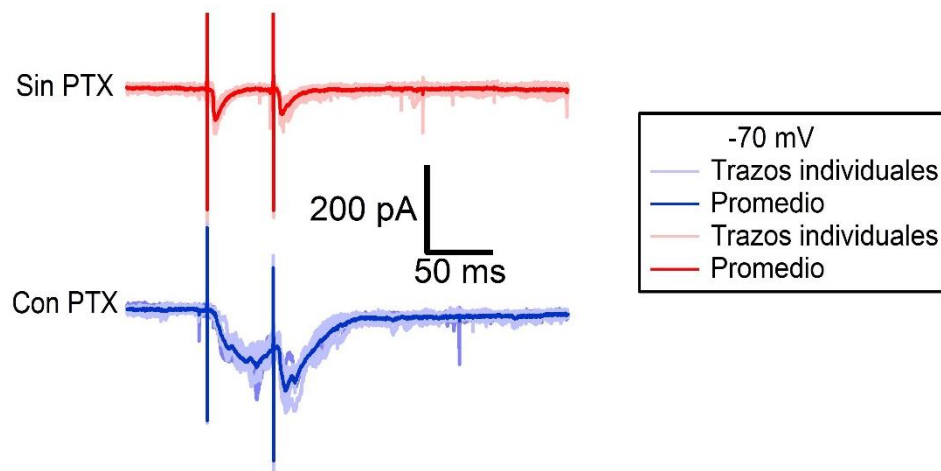


Figura S1. Corrientes evocadas irregulares en presencia de PTX imposibilitan el análisis de pulsos pareados. Al agregar PTX al baño la respuesta evocada mediante el protocolo de estimulación por pulsos pareados (pulsos separados por 50 ms, misma intensidad de estimulación) presenta un carácter irregular, con posibles eventos polisinápticos que impiden el análisis correspondiente. Las curvas azules y rojas oscuras corresponden al promedio de 10 registros (trazos rojos y azules claros) de una célula.