

UCH-FC
MAG-BMCN
V473
C.1

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE



**“EFECTO DEL COBRE SOBRE LA
EXCITABILIDAD ELÉCTRICA DE NEURONAS
PIRAMIDALES DE CA1”**

Tesis

**Entregada A La
Universidad De Chile
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos
Para Optar Al Grado De**

**Magíster en Ciencias con Mención
Biología Molecular, Celular Y Neurociencias.**

Facultad De Ciencias

Por

Jorge Alejandro Vera Buschmann

Junio, 2010

Director de Tesis Dra: Cecilia Vergara Montecinos

Co-Director de Tesis Dra: Magdalena Sanhueza Tohá



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por el candidato

JORGE ALEJANDRO VERA BUSCHMANN

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias con mención en Biología Molecular Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 14 de Mayo de 2010.

Director de Tesis:

Dra. Cecilia Vergara

C. Vergara
.....

Co-Director de Tesis:

Dra. Magdalena Sanhueza

M. Sanhueza
.....

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Christian Gonzalez

Christian Gonzalez
.....

Dr. Miguel Arredondo

Miguel Arredondo
.....



Dedicado a mi hijo Gaspar...



AGRADECIMIENTOS

Agradezco profunda y sinceramente a todos los integrantes del Laboratorio de Fisiología Celular, quienes me acompañaron en este lindo y sufrido proceso convirtiéndose en un factor clave para mi concepción actual de la ciencia.

A la profe Ceci V. muchísimas gracias por todo el apoyo, confianza y plena libertad al momento de tomar decisiones. A la profe Magda S. por su tiempo, dedicación e interés entregados en la realización de esta investigación. Agradezco también a Carlos M, quien a la distancia colaboró en el desarrollo de este trabajo. A los profesores Juan Bacigalupo y Osvaldo Álvarez, por su completa disposición y colaboración.

Desde un punto de vista más personal, agradezco infinitamente a los Profesores Julio Alcayaga y Ricardo delgado, quienes al pasar los años se han convertido en pilares de mi formación científica y, además, un apoyo emocional importante (casi guía espiritual) a lo largo de mi estadía en el laboratorio.

Muchas gracias a Jannette B., a Danny A. y Jorge A. por encargarse de que todo funcione en el lab. A mis compañeros (de sufrimiento) los cuales coexistieron junto a mi en el lab durante este periodo compartiendo el desafío de hacer ciencia: M. Pezzoli, German F., Marcelo S., Camilo G., Ignacio D., Fabian L., Belen A, Carolina G., Estefanía L., Ma José D., Graciela D., Guadalupe A, y Gabriela. Muchas gracias al Señor X por proveerme de toda la literatura necesaria para desarrollar este trabajo.

Muchas gracias a toda mi familia, mamá, papá, la tiuchita, mis hermanos, a Gasparín... mi hijo querido. Agradezco también a Maritza Oñate, quien me ha acompañado en este camino, avanzando juntos paso a paso, haciendo especiales hasta los días más oscuros. Además, muchas gracias por toda la ayuda entregada para la realización de este trabajo.

Por su puesto que los amigos y compañeros de la U han contribuido en gran medida en hacerme lo que ahora soy, son parte de mi vida, de mis recuerdos, a todos ustedes... muchísimas gracias!

FINANCIAMIENTO

Este trabajo fue posible gracias a la beca CONICYT de Magíster otorgada a Jorge Vera B., al Proyecto FONDECYT 1080670 y al Proyecto ENLACE DI 2007, ambos otorgados a la Dra. Cecilia Vergara.

I. ÍNDICE



I.1 ÍNDICE DE CONTENIDOS

I. ÍNDICE	IV
I.1 ÍNDICE DE CONTENIDOS	V
I.2 ÍNDICE DE TABLAS	VI
I.3 ÍNDICE DE FIGURAS	VI
I.4 LISTA DE ABREVIATURAS	VIII
II. RESUMEN	1
III. ABSTRACT	3
IV. INTRODUCCIÓN	5
V. MATERIALES Y MÉTODOS	14
V.1 OBTENCIÓN DE LAS REBANADAS DE HIPOCAMPO DE RATA	14
V.2 REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS	15
V.3 MEDICIÓN Y ANÁLISIS DE LAS PROPIEDADES ELÉCTRICAS	16
V.4 MEDICIÓN DE LAS ENTRADAS SINÁPTICAS	20
V.5 BLOQUEADORES SINÁPTICOS	21
V.6 APLICACIÓN DE COBRE	22
VI. RESULTADOS	23
VI.1 EFECTO DEL COBRE SOBRE PROPIEDADES INTRÍNSECAS DE MEMBRANA DE NEURONAS PIRAMIDALES DE CA1	24
VI.2. EFECTO DEL COBRE SOBRE LOS POTENCIALES POSTSINÁPTICOS EXCITATORIOS DE NEURONAS PIRAMIDALES DE CA1	35
VI.2.1 Cobre modifica diferencialmente la frecuencia de los PSP espontáneos que arriban a las neuronas piramidales de CA1	35
VI.2.1.1 Aumento de la frecuencia de arribo de EPSP	36
VI.2.1.2 Disminución de la frecuencia de arribo de EPSP	39
VII. DISCUSIÓN	42
VII.1 COBRE Y EXCITABILIDAD INTRÍNSECA	43
VII.2 COBRE MODIFICA LA FRECUENCIA DE ARRIBO DE LOS PSP	45
VII.3 TRABAJO FUTURO Y PROYECCIONES DE LÍNEA DE INVESTIGACIÓN	52



VIII. CONCLUSIÓN	54
IX. BIBLIOGRAFÍA	55
X. MATERIAL SUPLEMENTARIO	60

I.2 ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resumen del efecto de cobre 0,1 μM sobre parámetros del potenciales de acción unitarios de neuronas piramidales de CA1

28

I.3 ÍNDICE DE FIGURAS



Figura 1. Rebanadas transversales de hipocampo de rata y neuronas piramidales de CA1	10
Figura 2. Protocolos de estimulación utilizados en el estudio de las propiedades intrínsecas de la excitabilidad de las neuronas piramidales de CA1	19
Figura 3. Cobre no modifica la resistencia de entrada de las neuronas piramidales de CA1	25
Figura 4. Cobre 0,1 μM no modifica el curso temporal de potenciales de acción unitarios de neuronas piramidales de CA1	27
Figura 5. Cobre 0,1 μM aumenta la variabilidad del umbral de disparo de las neuronas piramidales de CA1 sin modificar el valor promedio	29
Figura 6. Cobre no modifica significativamente la curva de entrada-salida de las neuronas piramidales de CA1	32
Figura 7. La acomodación de la frecuencia de las neuronas piramidales de CA1 no se modifica con cobre 0,1 μM	34
Figura 8. Cobre aumenta la frecuencia de arribo de los inputs sinápticos en una fracción de neuronas piramidales	37
Figura 9. Cobre disminuye la frecuencia de arribo de los inputs sinápticos en una fracción de neuronas piramidales	40
Figura 10. Modelo del efecto modulador del cobre sobre la actividad de neuronas piramidales de CA1.	51
Figura S1. Cobre submicromolar aumenta la tasa de disparo de neuronas piramidales de CA1 en rebanadas transversales de hipocampo de rata	60

I.4 LISTA DE ABREVIATURAS



EPSP: Potencial postsináptico excitatorio

IPSP: Potencial postsináptico inhibitorio

Re: Resistencia de entrada

Rs: Resistencia en serie

Rt: Resistencia total

SLM: Stratum lacunosum moleculare

SNC: Sistema nervioso central

SO: Stratum oriens

SP: Stratum pyramidale

SR: Stratum radiatum

Vm: Potencial transmembrana

VMD: Velocidad máxima de despolarización

VMD: Velocidad máxima de despolarización

VMR: Velocidad máxima de repolarización

VMR: Velocidad máxima de repolarización

II. RESUMEN

El cobre es un metal esencial para los organismos aeróbicos y ha sido vinculado principalmente al metabolismo celular. Además, existen evidencias para proponer que este metal tiene un rol en la modulación de la excitabilidad neuronal. Sin embargo, esta hipótesis no ha sido demostrada directamente.

En nuestro laboratorio encontramos que cobre en concentraciones que pueden alcanzarse en el espacio sináptico (0,01-0,1 μM), aumenta la tasa de disparos espontáneos de neuronas piramidales del área CA1 en rebanadas de hipocampo de rata.

El objetivo de esta tesis fue determinar en qué medida el aumento de la tasa de disparos observado en presencia del metal es causada por modificaciones sobre la excitabilidad intrínseca o sobre las entradas sinápticas de estas neuronas. Para esto utilizamos la técnica de *patch-clamp* en modalidad de corriente controlada de célula completa.

La adición de cobre 0,1 μM aumentó la variabilidad del umbral de disparo, incrementando su coeficiente de variación en un 24%, sugiriendo que cobre interactúa con canales de sodio. Sin embargo, la presencia de cobre no modificó el potencial de reposo, la resistencia de entrada, el umbral de disparo, la función de transferencia, la acomodación de la frecuencia y tampoco modificó la amplitud ni la duración de los potenciales de acción unitarios de estas neuronas. Esto sugiere que los únicos componentes intrínsecos de membrana que están relacionados con el aumento de la tasa de disparo son los canales de sodio.

Las entradas sinápticas excitatorias de estas neuronas fueron afectadas de manera diferente por 0,1 μM cobre. De un total de 13 neuronas registradas, en 7 neuronas la adición de cobre aumentó la frecuencia de arribo en cerca de un 75%,

en 3 neuronas la frecuencia de arribo disminuyó en cerca de un 50%, mientras que en otras tres neuronas el cobre no produjo cambios. En ninguna de estas 13 neuronas la adición del metal modificó la amplitud de los eventos excitatorios. Estos resultados sugieren que el cobre 0,1 μM modifica diferencialmente las entradas sinápticas de las neuronas piramidales, lo cual podría generar circuitos de sensibilidad a cobre en función del tipo de aferencias que tenga cada neurona.

La conclusión de este trabajo, que resume las observaciones obtenidas en el laboratorio, es que el cobre aumenta la tasa de disparo de una fracción de neuronas piramidales de CA1 aumentando las entradas excitatorias y disminuyendo el peso relativo de la red inhibitoria, apoyando fuertemente la idea de que el cobre es un neuromodulador endógeno de algunas regiones del cerebro.

III. ABSTRACT

Ionic copper is essential for aerobic organisms and has been linked mainly to cellular metabolism. Also, several results hint that this metal has a role in modulating neuronal excitability. However, this has not been directly demonstrated and the question of whether copper is a neuromodulator remains open.

We found that copper added at concentrations that can be achieved in the synaptic cleft (0.01 - 0.1 μM), increases the spontaneous firing rate of CA1 pyramidal neurons in rat hippocampal slices.

In order to explain the increase in firing rate observed in the presence of copper we studied its effect on CA1 pyramidal neurons intrinsic excitability and over its synaptic inputs by using the patch-clamp technique in whole-cell current clamp modality.

First we studied the effect of copper on intrinsic membrane components. The addition of this metal produces an increase in the firing threshold variability, with a 24% increment in its coefficient of variation. Copper did not change the resting potential, input resistance, firing threshold, transfer function, frequency accommodation, nor the amplitude and duration of single action potentials. This indicates that none of the conductance's involved in single cell dynamics are changed significantly due to the addition of the metal.

Then we determined whether the addition of 0.1 μM copper altered the excitatory synaptic inputs of these neurons, finding that copper modulates differentially two groups of pyramidal neurons. From a total of 13 recorded neurons, we found that in 7 neurons the addition of copper increased the arrival frequency by 75%, in 3 neurons the metal reduced the arrival frequency of excitatory inputs by 50%, while in other 3 neurons copper had no effect. The

average amplitude of the synaptic inputs remained unchanged in all tested neurons, suggesting that copper modifies synaptic input frequency interacting with presynaptic components.

These results, in addition to others obtained in the laboratory, show that copper increases the firing rate of a fraction of CA1 pyramidal neurons producing an increment of excitatory inputs and by decreasing the relative weight of inhibitory network activity, strongly supporting the idea that the copper is an endogenous neuromodulator of several brain regions.

IV. INTRODUCCIÓN

El cobre es un metal esencial para los organismos aeróbicos y su principal función conocida es servir como agente oxido-reductor en reacciones de transferencia de electrones que son fundamentales para el metabolismo celular, tales como la fosforilación oxidativa y la eliminación de agentes oxidantes (Mathie y col., 2006). Actualmente existe evidencia suficiente para proponer que este metal tiene un papel en la modulación de la excitabilidad eléctrica en regiones particulares del cerebro de mamíferos, actuando como agente de señalización entre neuronas (Mathie y col., 2006; Schlieff y Gitlin, 2006). Sin embargo, aun no ha sido posible demostrar directamente esta hipótesis y la pregunta de si el cobre es un neuromodulador sigue abierta.

La importancia del cobre en el sistema nervioso central (SNC) de humanos es revelada por ciertas patologías que producen un desequilibrio en la homeostasis celular con consecuencias críticas, siendo las más conocidas las enfermedades de Menkes y Willson. Estas enfermedades se caracterizan por la degeneración de la materia gris y anomalías en la morfología celular que producen neurodegeneración, síntomas parkinsonianos y características neuropsiquiátricas (Okaeda y col., 1991; Lutsenko y Petris, 2003). Además, existe otro gran número de patologías neurodegenerativas que están relacionadas con la homeostasis de cobre en el cerebro, tales como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica, y la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (Waggoner y col., 1999).

Las evidencias que sustentan la hipótesis de que el cobre es un modulador de la excitabilidad neuronal pueden agruparse en tres aspectos claves para su formulación.

El primero de ellos es que el cerebro tiene cobre distribuido de manera diferencial en distintas regiones. El rango de concentración es estrecho y va desde los 2 $\mu\text{g/g}$ que se encuentran en el hipocampo hasta los cerca de 4 $\mu\text{g/g}$ que se encuentran en el tálamo y sustancia nigra (Szerdahelyi y Kása, 1986; Tarohda y col., 2004).

El segundo aspecto es que parte del cobre presente en las neuronas puede ser liberado y puede difundir hacia las neuronas vecinas. Gracias a las técnicas que permiten ver la distribución intracelular de cobre se ha encontrado que hay marca en el soma celular, en los axones y también en las glías (Kozma, Szerdahelyi y Kása, 1981). Parte del cobre que está en estas regiones (hasta 1/5 del total) está almacenado en vesículas desde donde puede ser liberado al espacio sináptico y perisomático de manera inducida por despolarización (Colburn y Maas, 1965; Hartter y Barnea, 1988; Sato y col., 1994; Schlieff y Gitlin, 2006). Utilizando un fluoróforo selectivo para Cu^{2+} , Hopt y colaboradores estudiaron la liberación endógena de cobre y estimaron que la concentración máxima que podría alcanzar este metal en el espacio sináptico está entre los 2 y 14 μM (Hopt y col., 2003).

El tercero de los aspectos es que el cobre liberado podría viajar por difusión hacia las neuronas vecinas, interactuando con ellas y modificando distintos componentes de la excitabilidad. Mediante la adición exógena de diferentes concentraciones de este metal se ha demostrado que Cu^{+2} tiene la capacidad de alterar el funcionamiento de canales y receptores de membrana que determinan la actividad neuronal. De esta manera se ha encontrado que el cobre modifica corrientes de sodio (Delgado y col., 2006), distintos canales de potasio (Morera y col., 2003; Niu y col., 2005 y 2006; Ma y col., 2008), canales de calcio (Jeong y col., 2003; Castelli y col., 2003), canales de background (Gruss y col., 2004),

receptores de GABA tipo A (Trombley y Sheperd, 1996; Sharonova y col., 1998), receptores de NMDA (Vlachová y col., 1996; Trombley y Sheperd, 1996), receptores de AMPA (Weiser y Wienrich, 1996) y también receptores purinérgicos (revisados por Huidobro-Toro y col., 2008). Como factor común de estas modificaciones está que el cobre tiene un efecto bloqueador, disminuyendo la conductancia promedio con una IC_{50} que varía entre 1 y 30 μ M. Como excepción a esta regla está el canal de background TREK-1 y el receptor purinérgico P2X2 en los que el cobre tiene un efecto activador (Gruss y col., 2004; Lorca y col., 2005).

Si bien estas investigaciones muestran que el cobre puede modificar distintos componentes de la excitabilidad neuronal, tienen algunos inconvenientes. El primero es que la mayoría de los efectos del cobre se producen en un rango de concentración mayor al que se puede alcanzar en el espacio sináptico (según la estimación de Hopt y col., 2003). El segundo es que la gran mayoría de estos estudios (si no todos) han sido realizados en sistemas de expresión heteróloga o en células en cultivo, presentando condiciones distintas a las encontradas en condiciones fisiológicas. Tercero, gran parte de estas observaciones electrofisiológicas se han realizado en modalidad de potencial controlado (*voltage-clamp*), midiendo los cambios en la corriente mientras se mantiene el potencial de membrana constante y en condiciones que favorecen el registro de las corrientes estudiadas. Estos inconvenientes dificultan el extender dichas observaciones de los efectos moduladores del cobre hacia sistemas con mayor organización, como los circuitos neuronales, dejando la duda de si este metal puede o no modular la excitabilidad en condiciones fisiológicas normales.

Utilizando el epitelio olfatorio de rana como modelo experimental, en nuestro

laboratorio se encontró que el cobre, en un rango de concentraciones bajas (entre 10 nM y 10 μ M), tiene un efecto modulador bifásico sobre la actividad espontánea de estas neuronas. Entre 10 y 100 nM este metal tiene un efecto activador que aumenta la tasa de disparos espontáneos hasta cuatro veces, mientras que a concentraciones entre 1 y 5 μ M tiene un efecto inhibitorio que disminuye la tasa de disparo a menos de la mitad (Aedo y col., 2007). Como las neuronas están desprovistas de contactos sinápticos entre ellas, las modificaciones producidas por el metal debían ocurrir sobre componentes intrínsecos de membrana de estas neuronas. En efecto, el aumento de la tasa de disparo se produce por un aumento en la amplitud de las corrientes de sodio, mientras que el efecto inhibitorio por una disminución de la amplitud de estas corrientes (Delgado y col., 2006), hallazgo que muestra la susceptibilidad de esos canales de sodio por bajas concentraciones de cobre y el impacto de la modificación de esas corrientes sobre la actividad neuronal.

Para estudiar si este efecto modulador del cobre está conservado en alguna región del cerebro de mamíferos hemos utilizado rebanadas de hipocampo de rata como modelo experimental. De manera similar a lo encontrado en el epitelio olfatorio de rata, hemos encontrado que la adición del metal en concentraciones entre 10 y 100 nM aumenta la tasa de disparos espontánea de neuronas piramidales del área CA1 (Maureira y col., 2010). Cabe destacar que a diferencia del epitelio olfatorio, el hipocampo consiste en una red neuronal altamente interconectada, cuya actividad es el resultado de una dinámica compleja entre conexiones inhibitorias y excitatorias (Ahmed y Metha, 2009).

Esta observación podría ser de gran impacto, puesto que se ha demostrado que estas mismas neuronas piramidales poseen toda la maquinaria necesaria para

incorporar cobre, para almacenarlo en vesículas somáticas encargadas de la homeostasis intracelular de cobre y, lo que es más relevante, poseen un mecanismo para liberar este cobre vesicular al espacio perisomático de manera dependiente de la actividad de los receptores de NMDA (Schlief y Gitlin, 2006).

El hipocampo es una de las regiones más estudiadas del cerebro de mamíferos debido a que es una estructura necesaria para la formación de memorias nuevas, porque la actividad de sus neuronas está relacionada con la ubicación espacial y la navegación; y además porque se utiliza como modelo de estudio de circuitos corticales debido a que tiene una conectividad simple respecto a otras regiones de la neocorteza (Traub y Miles, 1991; Klausberger y Somogyi, 2008; Ahmed y Metha, 2009). Macroscópicamente es una estructura alargada con el eje longitudinal doblado en forma de C que se extiende desde el septum en posición craneal y luego en dirección caudoventral hacia el lóbulo temporal (Figura 1A). Un corte transversal de hipocampo permite ver la organización interna de su estructura, la cual se repite a lo largo del eje septotemporal (Figura 1A). La conectividad interna del hipocampo y los distintos tipos celulares que posee permite separarlo en tres regiones principales, el giro dentado, CA3 y CA1, las cuales procesan secuencialmente las señales eléctricas que provienen desde la corteza entorrinal, la principal aferencia del hipocampo. Las neuronas de la capa II de la corteza entorrinal proyectan hacia el giro dentado mediante la vía perforante, mientras que las neuronas de la capa III proyectan hacia CA1 a través de esta misma vía. Las neuronas del giro dentado proyectan sus axones hacia CA3 mediante las fibras musgosas y las neuronas piramidales de CA3 proyectan hacia CA1 a través de las colaterales de Shaffer. Las neuronas de CA1 proyectan de vuelta hacia la corteza entorrinal, devolviendo las señales procesadas hacia esa región. El hipocampo

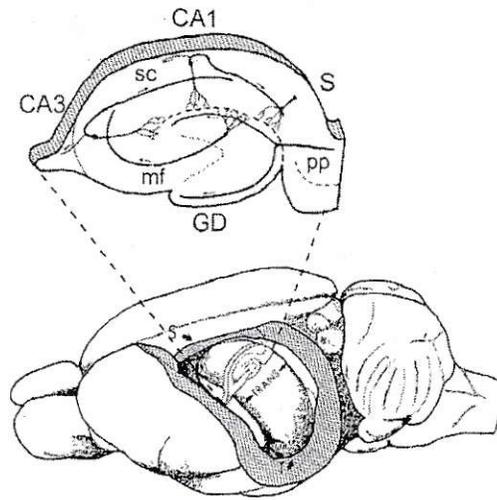
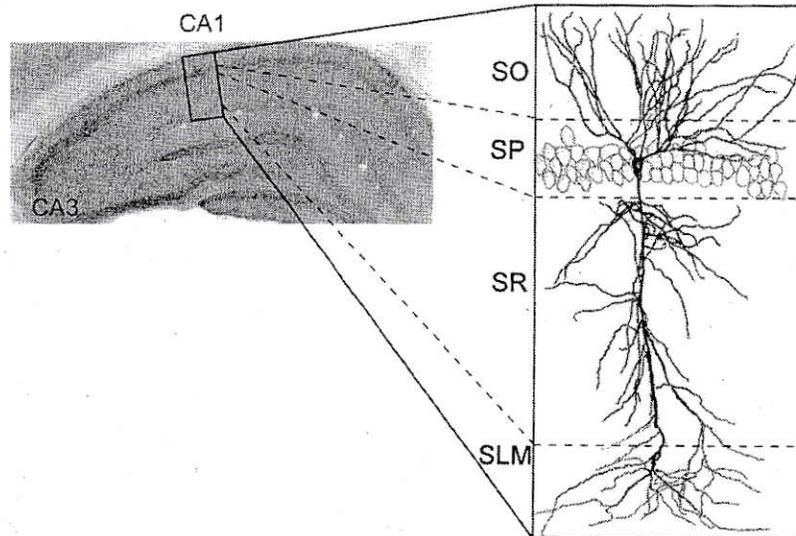
A**B**

Figura 1. Rebanadas transversales de hipocampo de rata y neuronas piramidales de CA1. **A)** Esquema que muestra un cerebro de rata completo (inferior) con parte de la corteza izquierda removida para ver la disposición del hipocampo a lo largo del eje septotemporal (S, T). En la parte superior está el esquema de una rebanada transversal de hipocampo que muestra los principales componentes del circuito hipocampal. GD (giro dentado); CA3, CA1, S (subículo), PP (vía perforante), mf (fibras musgosas), sc (colaterales de Schaffer). **B)** Fotografía de una rebanada transversal de rata que muestra de forma aumentada una neurona piramidal de CA1 reconstruida con cámara lúcida. El esquema permite ver cual parte de estas neuronas dan lugar a las distintas láminas de CA1. SO, stratum oriens; SP, stratum pyramidale; SR, stratum radiatum; SLM, stratum lacunosum moleculare. La figura A fue extraída de Johnston y Amaral, 1998; La figura B izquierda fue extraída de Freund y Buzsáki, 1996, mientras que la de la derecha de Megías y col, 2001.

también recibe aferencias desde otras áreas del cerebro como los núcleos septales y el hipotálamo, entre otros (Johnston y Amaral, 1998).

En la rebanada transversal que se muestra en la figura 1B es posible ver que CA1 tiene cuatro capas bien definidas: stratum oriens (SO), stratum pyramidale (SP), stratum radiatum (SR) y stratum lacunosum moleculare (SLM), las cuales son el producto de la disposición ordenada que tienen las neuronas piramidales, las más abundantes de CA1. Estas neuronas tienen un soma piramidal u ovoide de unos 10-15 μm de diámetro que está alojado en el SP. Cada soma posee entre 3 a 7 dendritas basales que emergen desde el extremo basal formando el SO, mientras que hacia el otro extremo del soma emerge una única gran dendrita apical de uno 700 μm de largo, de la cual emergen dendritas secundarias, que da lugar al SR. En el extremo distal la dendrita apical se ramifica en dirección perpendicular formando el SLM (Figura 1B; Traub y Miles, 1992; Johnston y Amaral, 1998). Entremedio de este gran número de neuronas piramidales (>400.000 en el área CA1 del hipocampo de rata) están dispersas en las cuatro capas más de 26 tipos de interneuronas inhibitorias que liberan el neurotransmisor GABA (Klausberger y Somogyi, 2008). El otro tipo celular que forma parte de los circuitos locales de CA1 son los astrocitos, los cuales están alojados en SO y SR extendiendo procesos en toda la región. Están en contacto con cerca del 40% de las sinapsis de las neuronas piramidales controlando el procesamiento de las señales eléctricas en una estructura funcional denominada sinapsis tripartita (Perea y col., 2009).

La actividad eléctrica de las neuronas piramidales de CA1 es el resultado de las propiedades intrínsecas de membrana compuesta por más de diez canales iónicos sensibles a voltaje y/o calcio, los cuales generan la compleja dinámica que

determina la forma del potencial de acción y la frecuencia de disparo con que estas neuronas transmiten las señales que procesan (Káli y Freund, 2005; Vervaeke y col., 2006; Bean 2007). El potencial de membrana, que es regulado por las propiedades intrínsecas de membrana, es perturbado continuamente por un bombardeo de entradas sinápticas que arriban esporádicamente por alguna de las 30.000 sinapsis excitatorias distribuidas a lo largo de estas neuronas y más de 17.000 sinapsis inhibitorias ubicadas estratégicamente en el soma y en el segmento inicial del axón (Megías y col., 2001). Del total de sinapsis excitatorias la mayoría (29.000) proviene desde CA3 mediante las colaterales de Shaffer y están distribuidas homogéneamente a lo largo del SR y SO. Las sinapsis excitatorias restantes (1000) están distribuidas en el SLM y provienen desde la corteza entorrinal, el septum y el hipotálamo, entre otros (Megías y col., 2001; Johnston y Amaral, 1998).

Cuando un terminal presináptico libera neurotransmisores excitatorios estos difunden hasta la neurona vecina y activan distintos receptores postsinápticos ionotrópicos y metabotrópicos produciendo una despolarización transitoria denominada PSP (del inglés *Post Synaptic Potential*) que se propaga hasta el soma neuronal. Esta región actúa como un colector de PSPs, integrando temporalmente los PSPs que impactan a la neurona en distintas regiones de su arborización dendrítica. La despolarización del soma se propaga hacia el segmento inicial del axón (SIA), región en la cual se generan los potenciales de acción debido a que contiene una alta densidad de canales de sodio $Na_v1.6$ (Royeck y col., 2008). Debido a las propiedades pasivas de las membranas, la amplitud de los PSP disminuye y su cinética se enlentece durante la propagación desde su punto de origen hacia el soma (filtrado dendrítico). Esto significaría que

los PSP que se generan en regiones alejadas del soma tendrían un menor peso sobre el potencial en la zona de disparo del potencial de acción que los PSP que se generan en regiones cercanas. Sin embargo, las sinapsis que provienen desde CA3 y que arriban en el stratum radiatum poseen un mecanismo de compensación para las sinapsis que están más alejadas del soma, las cuales poseen un aumento gradual de la densidad de receptores AMPA de manera proporcional a la distancia que separa a la sinapsis del soma (Andrasfalvy y Magee, 2001). De esta manera la efectividad de los PSPs que abordan en el SR se independiza de la posición de la sinapsis (Magee y Cook, 2000). Los PSPs excitatorios evocados por las aferencias desde CA3 se observan en el soma como una despolarización con amplitudes menores a 1 mV, un tiempo de ascenso promedio de 4 ms y una duración promedio de 40 ms (Sayer y col., 1990).

La regulación fina de la excitabilidad intrínseca y de las entradas sinápticas es la que produce una determinada frecuencia de disparo en las neuronas piramidales, de modo que el aumento de la tasa de disparo observado con la adición de cobre podría ser consecuencia de la modificación de uno o más de los parámetros que las determinan.

El objetivo principal de este trabajo fue determinar en qué medida el aumento de la frecuencia de disparo de estas neuronas que se produce con cobre $0,1 \mu\text{M}$ es el resultado de modificaciones en las propiedades intrínsecas de estas neuronas y/o a cambios en las entradas sinápticas. Con esta finalidad realizamos un estudio exploratorio del efecto del cobre sobre la excitabilidad intrínseca y conexiones sinápticas de las neuronas piramidales de CA1 utilizando la técnica de *patch-clamp* de célula completa en modalidad de corriente controlada en rebanadas transversales de hipocampo de rata.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.1 OBTENCIÓN DE LAS REBANADAS DE HIPOCAMPO DE RATA

En este trabajo utilicé ratas Spargue Dawly de entre 18-23 días de edad. Las ratas fueron anestesiadas con éter y luego decapitadas utilizando tijeras. El cerebro fue extraído mediante un corte en la parte medial superior del cráneo en sentido caudo-rostral, rápidamente el cerebro fue puesto en un vaso precipitado con solución de disección a 4° C, que contenía (en mM): sacarosa 206; KCl 2,8; CaCl₂ 1; MgCl₂ 1; Mg₂SO₄ 2; Na₂HPO₄ 1,125; NaHCO₃ 26; glucosa 10; osmolaridad de 295 ± 5 mOsm y pH 7,4 obtenido mediante burbujeo con mezcla de O₂/CO₂ al 5%. Luego de un minuto de reposo los cerebros fueron disectados en una placa petri sobre hielo que contenía solución de disección. Los hemisferios fueron separados y luego se realizó un corte en la parte posterior de cada hemisferio en sentido septotemporal con 45° respecto al eje longitudinal del cerebro. Los dos hemisferios fueron pegados con cianoacrilato en un vibrátomo, dejando vertical el eje dorsoventral del hipocampo, y luego bañados con solución de disección. Por cada hemisferio se obtuvo un total de 4 rebanadas transversales de 400 µm de espesor, las cuales conservan la conectividad entre el giro dentado, CA3 y CA1. El área CA3 fue removida con una Gillette en las rebanadas utilizadas en los experimentos de propiedades intrínsecas de membrana. Las rebanadas fueron puestas en una cámara de mantención que contenía líquido cefalorraquídeo artificial (LCRA) compuesto de (en mM): NaCl 124; KCl 2,8; CaCl₂ 2; Mg₂SO₄ 2; Na₂HPO₄ 1,25; NaHCO₃ 26; glucosa 10; osmolaridad de 295 ± 5 mOsm y pH 7,4 obtenido mediante burbujeo con mezcla de O₂/CO₂ al 5%; e incubadas a 30° C durante 1 hora y luego mantenidas a temperatura ambiente durante no más de 7 horas antes de comenzar los registros.

V.2 REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS

Para realizar los registros de la actividad eléctrica de las neuronas piramidales puse una rebanada de cerebro en una cámara de registro de 400 μ l de capacidad y la aseguré poniendo sobre ella un ancla de acero inoxidable en forma de herradura que tenía hilos de fibra de vidrio conectando los dos extremos de la herradura. La cámara de registro va montada sobre la platina de un microscopio Eclipse E600FN (Nikon Instruments) y conectada mediante mangueras a un contenedor de 15 ml de LCRA provisto de una bomba peristáltica Masterflex modelo HV-77120-62 (www.masterflex.com) que permite la recirculación del LCRA que baña a la rebanada con un flujo de 2 ml/min. La temperatura de la solución en la cámara de registro se ajustó a $30 \pm 1^\circ$ C (salvo que se mencione lo contrario) mediante un termorregulador basado en resistencias de potencia (hecho en el laboratorio) que cubría un serpentín de la manguera de la salida de la solución, ubicado a 10 cm de la cámara de registro. Las neuronas fueron visualizadas con un objetivo de 40X mediante óptica de contraste por interferencia diferencial con luz infrarroja (IR-DIC) montada en el microscopio, el cual cuenta con una cámara infrarroja conectada a un computador mediante una video captadora, permitiendo ver las imágenes en un monitor LCD.

Utilicé pipetas de vidrio con resistencias entre 4-5 $M\Omega$ confeccionadas con un *Puller* horizontal Sutter P-87 (www.sutter.com) rellenas con solución de pipeta que contenía (en mM): K-gluconato 123; KCl 10; $CaCl_2$ 0,1; $MgCl_2$ 1; Na_2 -ATP 1; NaGTP 0,2; glucosa 14; EGTA 1; HEPES 10; Fosfocreatina- Na_2 10, osmolaridad 285 ± 5 mOsm y pH 7,4 con KOH. Luego de identificar la neurona apropiada llevé la pipeta hacia ella aplicando presión positiva y estando sobre el soma liberé la presión aplicada para formar el gigasello ($>10G\Omega$). Evalué la magnitud del sello en

modalidad de potencial controlado midiendo la corriente que se producía entre la pipeta y el electrodo de tierra al aplicar un pulso cuadrado de 5 mV sobre un potencial de mantención de -70 mV. Si luego de un minuto no se producía la condición de célula completa (que se rompa la membrana que separa el interior de la pipeta con el interior de la célula) induje la ruptura de la membrana aplicando una leve presión negativa en la pipeta. Entre la solución de la pipeta y el LCRA se produjo un potencial de juntura de +10,4 mV (medido experimentalmente según Neher, 1992) que fue corregido sumando +10,4 mV a los registros después de ser adquiridos. Una vez realizada la configuración de célula completa terminé la aplicación de los +10,4 mV. Sólo utilicé experimentos cuya resistencia en serie (R_s) estuviera entre los 10-20 M Ω para los experimentos de excitabilidad intrínseca y 10-30 M Ω en los experimentos de las entradas sináptica y no fue compensada en ninguno de los experimentos.

La actividad eléctrica fue medida con el amplificador Axopatch 200B (Axon CNS, Molecular Devices), filtrando las frecuencias mayores a 5 KHz con el filtro de 8 polos incorporado en el amplificador. Las señales de potencial de membrana fueron visualizadas en un osciloscopio y almacenadas en un computador Pentium IV a una frecuencia de muestreo entre 10-40 KHz utilizando el programa PClamp6 (Axon CNS, Molecular Devices).

V.3 MEDICIÓN Y ANÁLISIS DE LAS PROPIEDADES ELÉCTRICAS

Luego de obtener la configuración de célula completa en modalidad de voltaje controlado esperé entre 3 y 5 minutos con un voltaje de mantención de -60 mV para dializar la neurona con la solución de la pipeta. Para evaluar la R_s y la resistencia total (R_t) de la configuración apliqué una serie de cuatro pulsos de

potencial de 50 ms de duración con amplitudes de -10, -5, 5 y 10 mV desde el potencial de mantención. Medí R_s y R_t para cada pulso como el voltaje del pulso dividido por la corriente máxima y la corriente en estado estacionario evocadas, respectivamente. Como valor final de R_s y R_t utilicé el promedio de los valores obtenidos en cada pulso. Una vez que R_s y R_t alcanzaron un valor estacionario (entre 10-20 y 130-160 $M\Omega$, respectivamente) cambié a la modalidad de corriente controlada y apliqué secuencialmente cuatro protocolos de inyección de corriente (nombrados de P1, P2, P3 y P4) para medir distintos parámetros de la excitabilidad intrínseca. El análisis de datos offline lo realicé con el programa Igor Pro 6.12 (www.wavemetrics.com) mediante procedimientos creados *ad hoc* para cada tipo de experimento. Para evaluar si el cobre modificaba los parámetros respecto a la condición utilicé el test de Student pareado de dos colas con un nivel de significancia de 0,05. Todos los valores se informan con el error estándar.

P1. Resistencia de entrada: Este protocolo consiste la inyección de una familia de pulsos cuadrados de corriente hiperpolarizante de 500 ms de duración que comienzan en -260 pA y aumenta en saltos de 40 pA de de duración con 2 segundos de descanso entre cada pulso (Figura 2A). Estas neuronas responden a los pulsos de corriente hiperpolarizante con un máximo de hiperpolarización (flecha negra, Figura 2A) que luego alcanza un valor estacionario más despolarizado (flecha gris). Cuando se termina el pulso hiperpolarizante se produce un rebote del potencial de membrana cuando se dirige al valor de reposo (Figura 2A). Restando el potencial de mantención de la neurona (-60 mV) al máximo de hiperpolarización o al promedio de hiperpolarización obtenido en el estado estacionario (al final del pulso) se obtiene el cambio de voltaje con el que

respondió la neurona a un determinado pulso de corriente. La resistencia de entrada se obtiene de la pendiente de la gráfica de cambio de voltaje vs intensidad del pulso hiperpolarizante.

P2. Potencial de acción único: Para evocar un potencial de acción único estimulé con un pulso de corriente subumbral de 7,5 ms de duración (rojo, inferior Figura 2B) y fui aumentando la intensidad del pulso de a 20 pA hasta que se volvió supra umbral y desencadenó un potencial de acción. Con esa intensidad de corriente (normalmente entre 100 y 200 pA) evoqué 20 potenciales de acción con 3 segundos de descanso entre cada pulso. Para caracterizar el potencial de acción único obtuve el curso temporal promedio de los 20 registros y medí la amplitud (1, Figura 2B) y la duración, medida en la mitad de la amplitud (2), la amplitud de las postdepolarización (3), el máximo de velocidad de despolarización, MVD (4), el máximo de velocidad de repolarización, MVR (5) y el tiempo en el que se producen estos máximos respecto al pico del potencial de acción (6 y 7, respectivamente).

P3. Umbral de disparo: Este protocolo comienza con un pulso cuadrado hiperpolarizante de -250 pA y 200 ms de duración seguido de una rampa de corriente despolarizante de 0,6 nA/s y 0,9 s de duración que llevaba el potencial de membrana desde unos -90 mV hasta cerca de -30 mV (Figura 2C). El umbral de disparo lo definí como el potencial al cual la derivada del registro superó los 5 mV/ms; para obtener una población de umbrales que permitiera estudiar su variabilidad repetí seis veces el protocolo por cada condición experimental, con dos segundos de descanso entre cada aplicación.

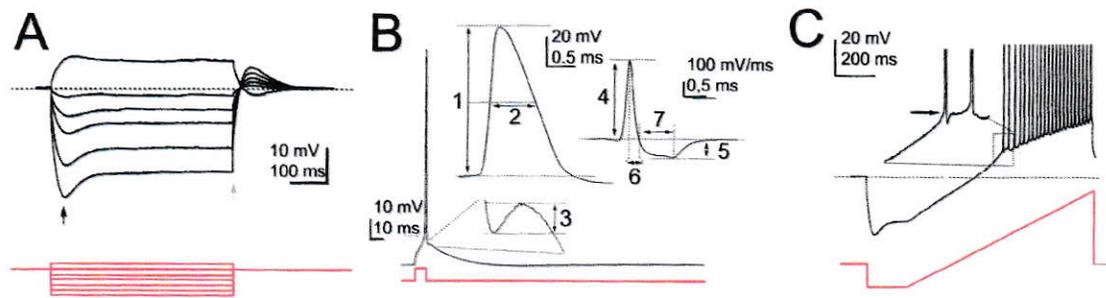


Figura 2. Protocolos de estimulación utilizados en el estudio de las propiedades intrínsecas de la excitabilidad de las neuronas piramidales de CA1. Las líneas rojas muestran la forma de los pulsos de corriente inyectada, mientras que las líneas negras muestran las respuestas del potencial de membrana a la inyección de corriente. A) Protocolo P1, resistencia de entrada (Re). B) Protocolo P2, espigas unitarias. Se muestra, de izquierda a derecha: 20 potenciales de acción (gris) y el potencial de acción promedio (negro), un aumento de la fase rápida del potencial (arriba), un aumento del ADP (abajo) y la derivada respecto al tiempo de la fase rápida del potencial de acción. Los números indican que región se utilizó para medir los distintos parámetros estudiados. C) Protocolo P3, umbral de disparo. La línea punteada muestra el nivel del potencial de mantenimiento, -60 mV. Los potenciales están truncados en cero mV y se aumentó el tamaño de las dos primeras espigas para indicar la región del umbral de disparo (flecha). Para más detalle ver texto principal.

P4. Frecuencia de disparo: Para estudiar el patrón de disparo estas neuronas fueron despolarizadas con una familia de pulsos cuadrados de corriente (similares a los mostrados en la Figura 2A) con valores máximos que variaron entre los 100 y 300 pA, con tres segundos de descanso entre cada pulso. La duración de los pulsos fue de 500 ms para estudiar la curva de entrada y salida y de 3 s para estudiar la acomodación de la frecuencia.

Curva de entrada-salida. Se calculó la frecuencia promedio como el promedio de las frecuencias instantáneas (recíproco del tiempo entre un potencial de acción y el siguiente) de los cuatro primeros potenciales de acción.

Acomodación de la frecuencia. Definí el índice de acomodación como la razón entre la frecuencia mínima y la frecuencia máxima obtenida con cada pulso de corriente. El índice de acomodación promedio lo calculé como el promedio de los

valores obtenidos con todos los pulsos de corriente. Para caracterizar el curso temporal de la acomodación de la frecuencia ajusté la curva de frecuencia instantánea a una curva exponencial doble obteniendo tres parámetros que la describen, una constante de tiempo rápida (τ_1) y una lenta (τ_2) y una frecuencia de disparo en estado estacionario (Frecuencia EE) que se comparó con el promedio de las frecuencias instantáneas obtenidas en los últimos 50 ms del pulso entregando valores similares.

V.4 MEDICIÓN DE LAS ENTRADAS SINÁPTICAS

Para medir el impacto somático de los EPSP utilicé la modalidad de corriente controlada e inyecté corriente manualmente para mantener el potencial de membrana en -60 ± 1 mV y registré pasivamente el arribo las entradas sinápticas en registros continuos de 3 minutos de duración, con tres registros por condición. Luego de la adición de cobre esperé un minuto para continuar con los registros.

Para facilitar el análisis de los datos registré solo los eventos excitatorios llevando el potencial de membrana hasta el potencial de inversión del ión cloruro ($V_{Cl^-} = -60$ mV) anulando las corrientes de los receptores de GABA_A, principal entrada inhibitoria de estas neuronas (Johnston y Amaral, 1998).

Los PSP fueron seleccionados a partir de la derivada respecto al tiempo del registro del potencial, seleccionando los eventos cuyo máximo era superior a 4 veces la desviación estándar obtenida del ajuste gaussiano centrado en cero del histograma de la derivada del registro. Todas las cuantificaciones se realizaron en ventanas de 3 minutos. La frecuencia de los eventos es el número de eventos dividido por el tiempo de observación.

Los *raster plots* muestran los eventos como una pequeña línea vertical, el eje

x indica 30 segundos del experimento y avanza de izquierda a derecha y de abajo hacia arriba, representando un total de 6 minutos de condición control y luego 9 minutos de condición con cobre. La línea roja de cada raster indica la adición de cobre.

Los histogramas acumulados de las neuronas en que aumenta la frecuencia de arribo con la adición de cobre se realizaron utilizando el registro previo y posterior a la adición del metal. El histograma de la frecuencia se hizo con 200 intervalos de ancho 0,1 Hz, los de amplitud con 100 intervalos de 0,05 mV de amplitud y los de la velocidad máxima de despolarización (VMD) con 100 intervalos de 0,005 mV/ms.

Para las neuronas en que la frecuencia de arribo de los PSP disminuye con la presencia de cobre los histogramas acumulados se hicieron con los eventos correspondientes a los dos registros previos y dos registros posteriores a la adición del metal para aumentar el número de eventos. Para los histogramas acumulados de frecuencia utilicé 100 intervalos de ancho 0,1 Hz, los de amplitud con 100 intervalos de 0,05 mV y los de VMD con 100 intervalos de 0,005 mV/ms.

La evaluación del cambio que produjo el cobre sobre la distribución de los parámetro utilicé el test estadístico Kolmogorov-Smirnov (K-S) (<http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/eda/section3/eda35g.htm>), incorporado en el programa Igor Pro 6.12, con un nivel de significancia de 0,05.

V.5 BLOQUEADORES SINÁPTICOS

En los experimentos de las propiedades intrínsecas utilicé LCRA con 10 μM de ácido 2-amino-5 fosfonopentanoico (APV), 100 μM de Picrotoxina (PTX) y 10 μM de 7-nitro-2,3-dioxo-1,4- dihidroquinoxalina-6-carbonitrilo (CNQX).

V.6 APLICACIÓN DE COBRE.

La solución de cobre (CuCl_2) se preparó diariamente como un stock 100 mM en agua bidestilada que fue diluido mediante dilución seriada hasta 10 μM (el último paso en LCRA) para agregar 150 μL en los 15 ml de LCRA del estanque y obtener la concentración de 0,1 μM en el LCRA del circuito de perfusión.

VI. RESULTADOS

Nuestra principal observación a favor de que este metal puede ser un modulador endógeno es que la adición de cobre nanomolar aumenta la tasa de disparo espontánea de neuronas piramidales en rebanadas transversales de hipocampo (Figura suplementaria S1, página 60). Debido a que el hipocampo es una red altamente interconectada (Johnston y Amaral, 1998; Klausberger and Somogyi, 2008), este aumento de la tasa de disparos espontáneos de las neuronas piramidales puede deberse a un aumento en la excitabilidad intrínseca de estas neuronas, a un aumento de las entradas excitatorias respecto a las entradas inhibitorias que arriban a estas células, o a una mezcla de ellos (Haider y McCormick, 2009). De esta manera, para investigar cuál o cuáles son los blancos del cobre, investigué primero qué efectos tiene este metal sobre distintos parámetros de la excitabilidad intrínseca de estas neuronas, los cuales involucran conductancias de sodio, potasio y calcio, que previamente han sido descritas como sensibles a cobre en otros sistemas experimentales (Trombley y Sheperd, 1996; Horning y Trombley 2001; Jeong y col., 2003; Castelli y col., 2003; Gruss y col., 2004; Niu y col., 2005 y 2006; Delgado y col., 2006; Wang y col., 2007; Ma y col., 2008; revisados por Mathie y col., 2006). Luego investigué las modificaciones que produce el cobre sobre las entradas sinápticas que arriban espontáneamente sobre estas neuronas, donde están involucrados receptores sinápticos de NMDA, de AMPA, GABA-a y receptores purinérgicos, que también han sido descritos como sensibles a cobre en otros modelos experimentales (Vlachová y col., 1996; Trombley y Sheperd, 1996; Sharonova y col., 1996; Schlef y Gitlin, 2006; Huidobro-Toro y col., 2008).

VI.1 EFECTO DEL COBRE SOBRE PROPIEDADES INTRÍNSECAS DE MEMBRANA DE NEURONAS PIRAMIDALES DE CA1.

Para estudiar las propiedades intrínsecas de las neuronas piramidales de CA1 eliminamos los inputs sinápticos utilizando rebanadas horizontales de hipocampo sin la región CA3 y agregué bloqueadores de los receptores AMPA, NMDA y GABA-a (para más detalles ver materiales y métodos).

Uno de los parámetros claves de la excitabilidad intrínseca es la resistencia de entrada de la célula (Haider y McCormick, 2009), ya que determina en qué medida el potencial de membrana responde a flujos de corriente (a mayor resistencia de entrada mayor cambio de voltaje que produce una determinada corriente). En las neuronas piramidales de CA1 este parámetro, medido a potenciales menores a -60 mV depende de los canales de *background* TASK (Taverna y col., 2005), que se han reportado como sensibles a cobre (Gruss y col., 2004), y de la corriente activada por hiperpolarización I_h (Ludwig y col., 1998). Para medir la resistencia de entrada se aplica una familia de pulsos de corriente hiperpolarizante y se mide el cambio de voltaje que produce cada uno de ellos; la resistencia de entrada es la pendiente de la curva de cambio de voltaje vs corriente inyectada. La figura 3A muestra la típica respuesta del potencial de membrana de una neurona piramidal de CA1 cuando se inyecta un pulso de corriente hiperpolarizante. Una vez que se aplica el pulso de corriente el potencial de membrana cae exponencialmente debido a las propiedades pasivas (resistencia y capacitancia de membrana). Al mismo tiempo se comienza a activar la corriente I_h (tau activación de 50-150 ms) que es despolarizante y contrarresta la hiperpolarización producida por el pulso de corriente. Esta interacción entre hiperpolarización y despolarización produce el

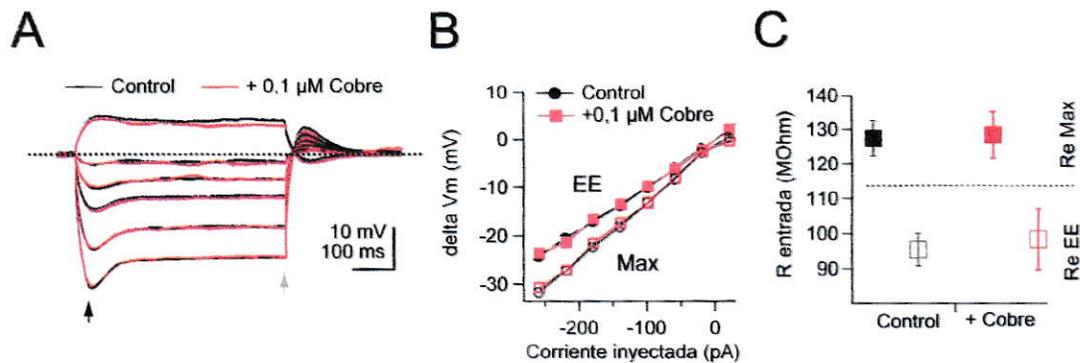


Figura 3. Cobre no modifica la resistencia de entrada de las neuronas piramidales de CA1. **A)** Registros de *current-clamp* de célula completa obtenidos en respuesta a la inyección del protocolo P1. Se sobreponen los registros obtenidos en condición control y luego de la adición de cobre en la misma célula. Máximo de hiperpolarización (flecha negra) y valor estacionario de despolarización (flecha gris). Se observa que la adición del metal no produce cambios en el curso temporal del potencial de membrana. **B)** Relación entre la diferencia de voltaje respecto al potencial de mantención y los pulsos de corriente hiperpolarizante en condición control y con cobre en la misma célula. Curva que fue medida en el máximo de hiperpolarización (Re Max, flecha negra en A) ni la medida en el estado estacionario (Re EE, flecha gris en A). **C)** Resistencia de entrada medida como la pendiente de las curvas mostradas en B. Se observa que no hay diferencias con la adición del metal para la resistencia de entrada medida en el máximo de hiperpolarización.

llamado “zag” hiperpolarizante que se observa como un máximo de hiperpolarización seguido de un estado estacionario más despolarizado. Determiné si el cobre 0,1 μM modifica la resistencia de entrada medida en el máximo de la hiperpolarización (Re Max) y en el estado estacionario al final del pulso (Re EE, Figura 3A y B). La adición del metal no modificó la Re Max de las neuronas registradas ($127,4 \pm 3,3$ vs $128,3 \pm 4,8$ $\text{M}\Omega$, para condición control y con cobre, respectivamente, $p = 0,87$; $n = 6$), ni la Re EE ($95,4 \pm 3,0$ vs $98,3 \pm 6,7$ $\text{M}\Omega$, $p = 0,4$; $n = 6$; figura 3C). Al comparar el potencial de reposo de estas neuronas en condición control y luego de la adición de cobre 0,1 μM , se observa que no hay cambio significativo ($-63,7 \pm 1,5$ mV vs $-65,1 \pm 0,9$ mV, $p = 0,35$; $n = 10$. Datos no mostrados). Estos resultados muestran que el cobre agregado no modifica las conductancias que determinan la resistencia de entrada ni el potencial de reposo de estas neuronas.

Debido a que se ha reportado que el cobre puede modificar la conductancia de canales claves para la dinámica de generación y repolarización del potencial de acción (corrientes de sodio, Aedo y col., 2007; corrientes de potasio, Ma y col., 2008; corrientes de calcio, Castelli y col., 2003), estudiamos si este metal modifica parámetros clásicos que caracterizan los potenciales de acción de estas neuronas según describió Storm, 1987 (Figura 4). La tabla 1 resume los valores obtenidos para la medición de la amplitud y duración del potencial de acción, para la amplitud de la despolarización post potencial (ADP, del ingles *after depolarization potential*; Figura 4 inserto inferior), del máximo de la velocidad de despolarización (MVD) y de la velocidad de repolarización (MVR), y el tiempo en que estos máximos ocurren (para más detalles ver Materiales y Métodos). En la tabla 1 puede verse que la dinámica rápida del potencial de acción (<10 ms) en la que están involucrados canales de sodio, de potasio y de calcio, no cambia con la adición de cobre. La figura 4 muestra la sobreposición de un potencial de acción en condición control y luego de agregar cobre, y se ve que no cambia ni la amplitud, ni la duración, indicando que los canales involucrados en este proceso no se ven modificados por la presencia del metal (valores en tabla 1, ver figura 4 potencial de acción ampliado). Para hacer un examen más detallado del curso temporal de los potenciales de acción se comparó la velocidad máxima de despolarización y de repolarización. El inserto a la derecha en la figura 4 muestra la sobreposición del diagrama de fase (derivada respecto al tiempo del potencial de membrana vs el potencial de membrana) en condición control y luego de agregar cobre. Se ve que no hay cambio significativo de las velocidades de despolarización (activación de canales de sodio) ni de repolarización (activación de canales de potasio) en la presencia del metal, ni de los tiempos en que estos máximos ocurren (valores en

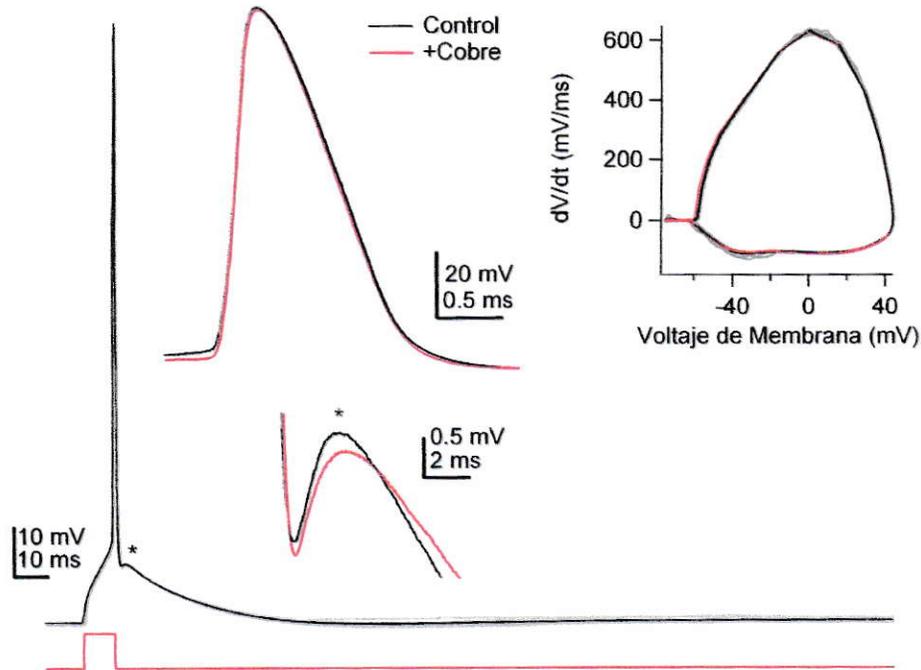


Figura 4. Cobre 0,1 μM no modifica el curso temporal de potenciales de acción unitarios de neuronas piramidales de CA1. Izquierda inferior: Curso temporal de un potencial de acción unitario típico de una neurona piramidal de CA1 (en gris sobreposición de 20 potenciales de acción registrados en la misma neurona en condición control, en negro el promedio). Se ve la típica espiga rápida seguida de una post despolarización más lenta (*). **Centro:** En la parte superior central se muestra una ampliación temporal de la región rápida del potencial de acción que permite ver que la adición de cobre no modifica su curso temporal, ni su duración. En la parte central inferior se muestra una ampliación de la región de postdepolarización del potencial, ADP, marcado con (*) el cual no presenta modificación significativa de su amplitud con la adición del metal. **Derecha superior:** Diagrama de fase del potencial de acción unitario que grafica la derivada temporal del potencial de membrana vs el potencial de membrana en condición control y luego de la adición de cobre, y permite ver que las orbitas son idénticas en ambas condiciones. **Todos los valores medidos se resumen en la tabla 1.**

tabla 1). Esto muestra que los canales involucrados en la dinámica que da lugar al potencial de acción se mantienen inalterados luego de agregar el metal. El ADP se produce por una corriente de entrada de calcio (Storm, 1987) y se ve como un hombro en el voltaje de membrana inmediatamente posterior a la despolarización principal (Figura 4 (*), inserto inferior). Se cree que tiene relevancia en la conexión entre actividad eléctrica y metabolismo celular, ya que el calcio que ingresa a la neurona produce un aumento de su concentración interna que activa

Tabla 1. Resumen del efecto de cobre 0,1 μ M sobre parámetros del potenciales de acción unitarios de neuronas piramidales de CA1.

Valores obtenidos en condición control y luego de agregar en siete parámetros del curso temporal de potenciales de acción unitarios. En la figura 2 se explica cómo se midieron los distintos parámetros. Además se indica el número de neuronas registradas (n) y el valor "p" de la comparación (test de Student pareado de una cola).

<i>Parámetro</i>	<i>n</i>	<i>Control</i>	<i>Cobre</i>	<i>p</i>
<i>Amplitud PA (mV)</i>	7	101.2 \pm 1.0	99.9 \pm 1.4	0.17
<i>Duración PA (μs)</i>	7	811.8 \pm 32.6	808.1 \pm 40.8	0.72
<i>fADP (mV)</i>	5	0.56 \pm 0.09	0.50 \pm 0.19	0.65
<i>Maximo dV/dt (mV/ms)</i>	7	586.8 \pm 20.0	561.0 \pm 22.5	0.12
<i>Tiempo de Max dV/dt (ms)</i>	7	-0.19 \pm 0.02	-0.21 \pm 0.02	0.09
<i>Mínimo dV/dt (mV/ms)</i>	7	-105.0 \pm 5.7	108.7 \pm 7.0	0.27
<i>Tiempo de Min dV/dt (ms)</i>	7	0.63 \pm 0.07	0.56 \pm 0.07	0.23

conductancias encargadas de la repolarización y además puede actuar como segundo mensajero, activando vías de señalización que desencadenan procesos celulares (Cook y col., 2007). No se observó un cambio significativo de la amplitud del ADP luego de agregar cobre (valores tabla 1).

Estos resultados muestran que el cobre no modifica las propiedades de los potenciales de acción únicos, indicando que deben ser otros los factores que causan el aumento de la frecuencia de disparo que se observa en presencia de este metal.

Dado que el umbral de disparo es un parámetro fundamental en determinar si un estímulo determinado produce o no un potencial de acción, investigamos si la adición de cobre podía disminuir el umbral de disparo y así aumentar la actividad de estas neuronas. Para estudiar esto se aplicó un pulso de corriente hiperpolarizante a estas neuronas para llevar a un extremo los parámetros que determinan la cinética de los canales de sodio y luego se despolarizó gradualmente las células aplicando una rampa de corriente por sobre el umbral de

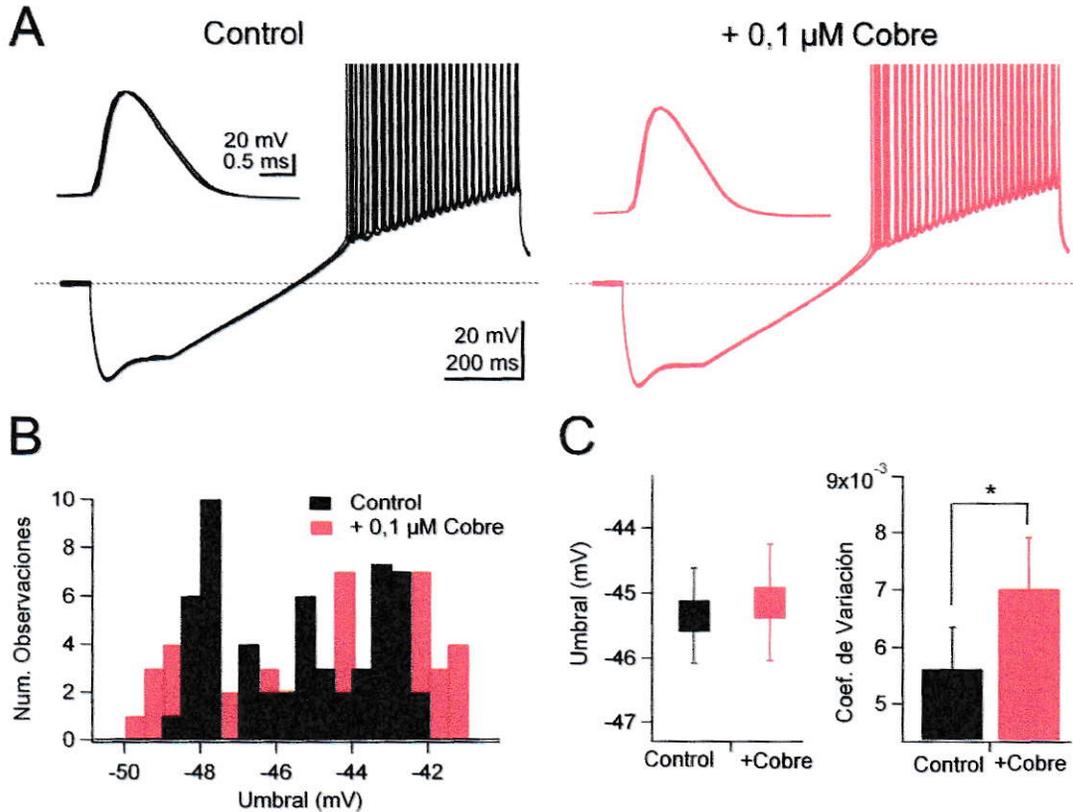


Figura 5. Cobre 0,1 μM aumenta la variabilidad del umbral de disparo de las neuronas piramidales de CA1 sin modificar el valor promedio. **A.** Registros de la respuesta del voltaje de membrana a la inyección de una rampa de corriente despolarizante en condición control y luego de la adición de cobre. El protocolo se repitió seis veces en cada condición (se muestran los seis trazos sobrepuestos) con dos segundos de descanso entre cada aplicación. La línea punteada muestra el potencial de mantenimiento de -60 mV. Los potenciales de acción están truncados en 0 mV y el inserto muestra la sobreposición de los seis primeros potenciales de acción de cada condición. **B.** Histograma de los umbrales medidos en 10 neuronas en condición control y luego de la adición de cobre (6 umbrales por neurona). **C.** El valor promedio del umbral de disparo no cambió luego de la adición de cobre ($-55,8 \pm 0,8$ vs $-56,0 \pm 1,2$ mV, $p > 0,05$; $n = 10$, izquierda), mientras que el coeficiente de variación (desviación estándar / promedio) de los umbrales de disparo aumentó en un 24% en presencia del metal ($5,6 \times 10^{-3} \pm 0,7 \times 10^{-3}$ vs $7,0 \times 10^{-3} \pm 0,9 \times 10^{-3}$, (*) $p < 0,02$; $n = 10$, derecha).

disparo evocando una ráfaga de potenciales de acción (Figura 5). Para obtener un valor de umbral representativo en cada condición se aplicó seis veces el protocolo de inyección de corriente, obteniendo un umbral promedio a partir de seis mediciones en cada condición. La figura 5A muestra que no hay diferencia entre los registros obtenidos en condición control y con cobre 0,1 μM. Para ver si el cobre modifica la distribución de los umbrales de disparo realizamos un

histograma con todos los umbrales en condición control y los obtenidos luego de agregar el cobre (seis umbrales por condición en 10 neuronas registradas), histograma que se muestra en la Figura 5B. En el histograma puede verse que luego de agregar cobre la distribución de los umbrales es más ancha, sin embargo, no se produce una modificación significativa en el valor promedio del umbral ($-55,8 \pm 0,8$ vs $-56,0 \pm 1,2$ mV; $p > 0,05$; $n = 10$; Figura 5C). Este aumento en el ancho del histograma es producto de un incremento en la variabilidad de los umbrales en presencia de cobre, que se ve reflejado en un aumento promedio de 24% del coeficiente de variación (Coeficiente de variación: $5,6 \times 10^{-3} \pm 0,7 \times 10^{-3}$ vs $7,0 \times 10^{-3} \pm 0,9 \times 10^{-3}$, $p < 0,02$; $n = 10$; figura 5C). Este aumento en la variabilidad del umbral de disparo puede deberse a modificaciones en las corrientes de sodio que generan la despolarización en el segmento inicial del axón y son transportadas por los canales $Na_v1.6$ (Royeck y col., 2008; Hu y col., 2009).

Cabe mencionar que la frecuencia de disparo de las neuronas en respuesta a la inyección de la rampa de corriente no se vio modificada significativamente en la presencia del metal ($14,9 \pm 2,2$ Hz vs $17,5 \pm 2,6$ Hz, $p > 0,05$; $n = 10$; datos no mostrados).

Para saber de una manera más detallada si el cobre modifica la frecuencia de disparo de estas neuronas se realizó la clásica curva de entrada-salida que describe la relación entre la corriente inyectada y la frecuencia de disparo con que responde una neurona. Cuando se despolariza una neurona mediante la inyección de un pulso cuadrado de corriente en el soma, la neurona responde con una frecuencia de disparo que es proporcional a la corriente inyectada. En la Figura 6A se ve que a medida que aumenta la intensidad del pulso de corriente de 90 pA a 180 pA, la neurona responde linealmente con un aumento en la frecuencia de

disparo. Es importante mencionar que durante una despolarización con corriente constante la neurona responde con una frecuencia de disparo que disminuye en el tiempo debido a un fenómeno denominado acomodación de la frecuencia (Madison y Nicoll, 1983). Esta acomodación resulta en una frecuencia de disparo que no es constante en el tiempo y dificulta obtener un valor promedio. Por este motivo se calculó la "frecuencia promedio" como el promedio de la frecuencia instantánea de las cuatro primeras espigas ya que se ha demostrado que estas neuronas in vivo disparan trenes de 4 espigas a una frecuencia entre 6-7 Hz (Harris y col., 2001).

Los registros obtenidos en condición control y con cobre $0,1 \mu\text{M}$ no presentan diferencias estadísticamente significativas (Figura 6A). Se caracterizó la curva de entrada-salida ajustando una línea recta y obteniendo un valor para la pendiente y otro valor de corriente mínima, donde comienza la curva en el eje de la corriente. La figura 6B muestra la curva promedio para la condición control y con cobre. Si bien en la presencia del metal la curva pareciera tener una pendiente menor y conservar el valor de corriente mínima, al comparar los valores promedios no se encontró una modificación significativa en la pendiente de la curva ($0,37 \pm 0,12$ vs $0,36 \pm 0,11$ Hz/pA, $p > 0,05$; $n = 6$), ni en la corriente mínima ($59,5 \pm 4,2$ pA vs $51,2 \pm 5,0$ pA; $p > 0,05$; $n = 6$. Figura 6C).

Finalmente, en esta exploración de las propiedades intrínsecas, se estudió si la adición de cobre $0,1 \mu\text{M}$ modificaba la acomodación de la frecuencia. Esta se define como la disminución de la frecuencia de disparo frente a una despolarización sostenida (Madison y Nicoll, 1983) y es claramente distinguible en los registros de la figura 6A. Es una propiedad distintiva de estas neuronas piramidales y se debe a dos corrientes de potasio, una sensible a potencial y a

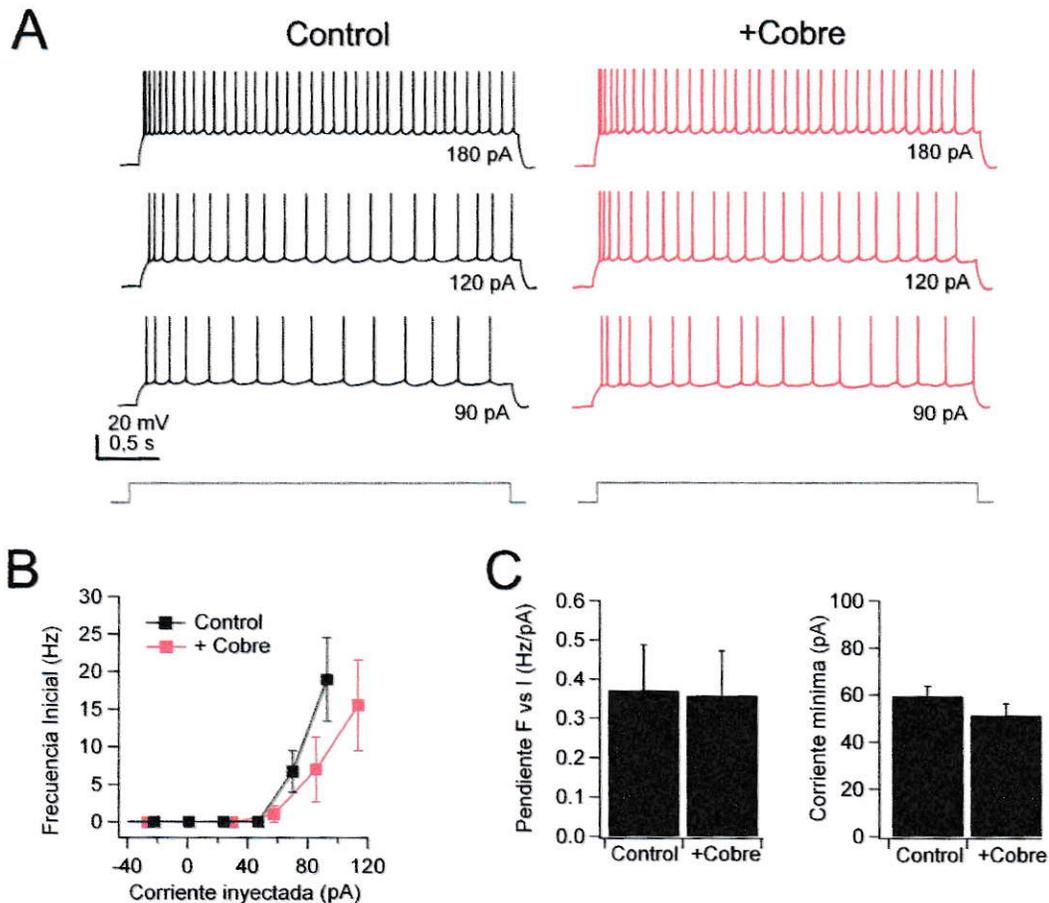


Figura 6. Cobre no modifica significativamente la curva de entrada-salida de las neuronas piramidales de CA1.

A) Registros obtenidos en una neurona representativa que muestra la respuesta del potencial de membrana a los pulsos despolarizante de 3 s de duración para la condición control y luego de la adición de cobre; ver como la frecuencia de disparo aumenta al aumentar la amplitud de la corriente inyectada (los potenciales de acción están truncados en 0 mV). La inspección visual de los registros permite ver que no hay gran diferencia al comparar los registros en cada condición. **B)** Grafico de las curvas de entrada-salida promedio de seis neuronas registradas en condición control y con cobre. **C)** Las curvas fueron ajustadas a una línea recta y se compararon los parámetros obtenidos. La adición de cobre no modificó significativamente la pendiente de las curvas ($0,37 \pm 0,12$ vs $0,36 \pm 0,11$ Hz/pA, $p > 0,05$; izquierda), ni el valor de corriente mínima en el cual comienza la curva ($59,5 \pm 4,2$ pA vs $51,2 \pm 5,0$ pA; $p > 0,05$; n = 6, derecha).

muscarina, denominada IM, y la otra sensible a calcio y transportada por los canales SK (Madison y Nicoll, 1983; Stocker y col., 1999). La despolarización prolongada y la consecuente entrada de calcio activan estas corrientes de potasio que repolarizan levemente la neurona disminuyendo la frecuencia de disparo. La Figura 7A muestra un gráfico representativo de la frecuencia instantánea vs el

tiempo del estímulo aplicado para la condición control y luego de la adición de cobre (estímulo de 200 pA, hay un retardo de 100 ms en la aplicación del pulso). Se ve que no hay ningún cambio aparente en el curso temporal de la frecuencia de disparo luego de agregar el metal. En ambas condiciones la neurona comienza disparando con una frecuencia cercana a los 80 Hz que cae por debajo de los 20 Hz en menos de 300 ms desde aplicado el pulso. Para poder cuantificar la acomodación de la frecuencia se definió el *índice de acomodación* (IA) como la razón entre la frecuencia mínima y la frecuencia máxima ($F_{\text{Min}}/F_{\text{Max}}$) que se obtienen para un mismo pulso de corriente. La figura 7B muestra el IA de una neurona en función de la corriente inyectada en la condición control y luego de la adición de cobre 0,1 μM . Es interesante ver que el IA es independiente de la corriente inyectada y que presenta un valor relativamente constante en torno a 0,25 que no cambia en presencia de cobre (la acomodación que se produce con los primeros pulsos de corriente presenta valores mayores que la constante porque las frecuencias máximas que evocan los primeros pulsos son bajas y elevan el valor de la razón $F_{\text{Min}}/F_{\text{Max}}$). La comparación del IA promedio, obtenida de diferentes intensidades de corriente inyectada, entre la condición control y con cobre no muestra cambios significativos ($0,15 \pm 0,07$ vs $0,17 \pm 0,07$; $p > 0,05$; $n = 7$. Gráfico de valores en Figura 7C).

Para caracterizar el curso temporal de la acomodación de la frecuencia se ajustó la curva experimental con una caída exponencial doble (figura 7A inserto), lo que sugiere que existen dos procesos involucrados, uno con cinética rápida (tau 5-15 ms) y otro más lento (tau 50-100 ms). La figura 7D muestra el curso temporal promedio de la frecuencia en función del tiempo obtenida a partir cinco experimentos. Puede verse que no ocurren cambios aparentes entre la curva

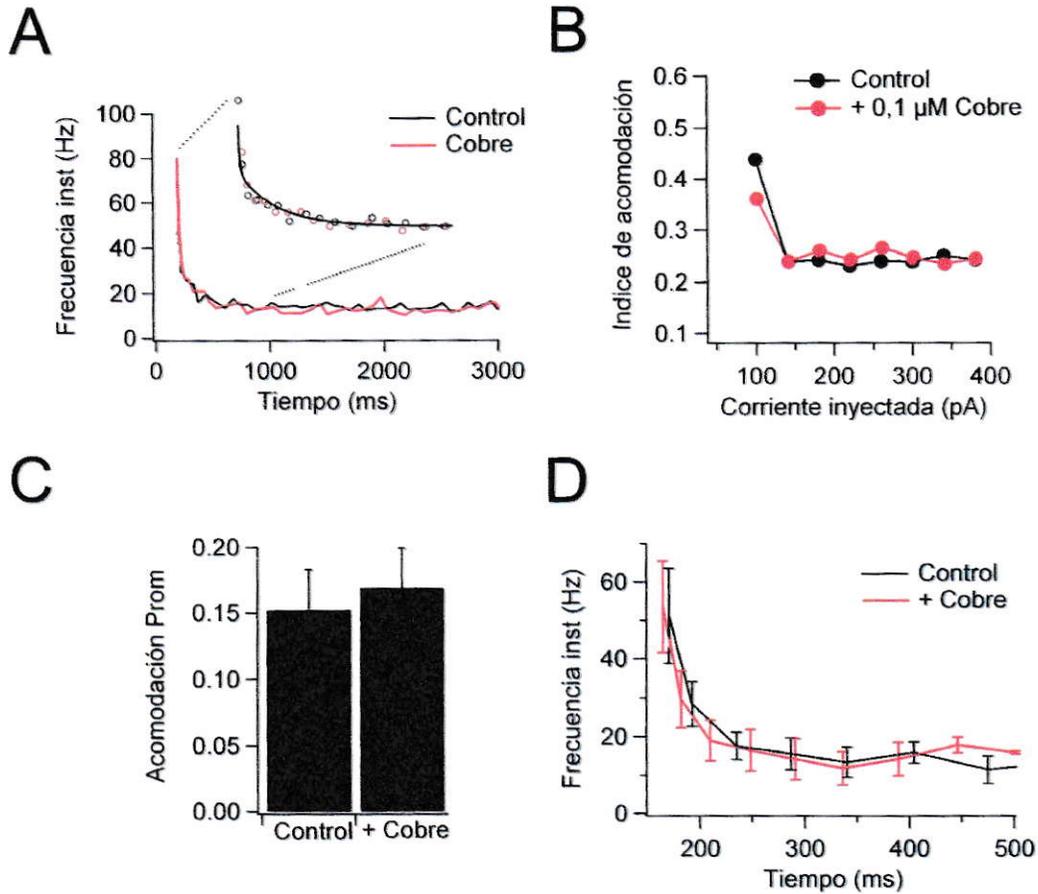


Figura 7. La acomodación de la frecuencia de las neuronas piramidales de CA1 no se modifica con cobre 0,1 μ M. Con los mismos registros utilizados para caracterizar la curva de entrada-salida que se muestra en la figura 6, estudiamos si la acomodación de la frecuencia se ve modificada con la presencia del metal. **A)** Frecuencia de disparo instantánea (1/tiempo entre espigas) en función del tiempo de un estímulo de 200 pA que comienza en $t=100$ ms, para la condición control y luego de la adición de cobre. El inserto muestra un zoom de la región marcada en donde los datos experimentales se muestran como círculos ajustados a una curva exponencial doble como línea continua. **B)** Relación del *Índice de acomodación* con la intensidad de la corriente inyectada. **C)** Gráfico de Acomodación promedio, calculada como el promedio de todos los *Índice de acomodación* obtenidos al despolarizar 5 neuronas, en condición control y luego de la adición de 0,1 μ M cobre. **D)** Gráfico que muestra el curso temporal promedio de la frecuencia instantánea en condición control y luego de la adición de 0,1 μ M cobre en 5 neuronas registradas.

control y la con cobre 0,1 μ M.

De esta manera, de todos los componentes de la excitabilidad intrínseca que estudiamos, el cobre en concentración 0,1 μ M solo produjo una modificación significativa en el coeficiente de variación del umbral de disparo de estas neuronas. El resto de los parámetros estudiados, y los canales relacionados a

ellos, no son modificados significativamente por cobre, y por lo tanto, no son la causa del aumento de la tasa de disparo observada con cobre submicromolar.

VI.2. EFECTO DEL COBRE SOBRE LOS POTENCIALES POSTSINAPTICOS EXCITATORIOS DE NEURONAS PIRAMIDALES DE CA1.

Una vez estudiado el efecto del cobre sobre las propiedades intrínsecas de la excitabilidad de las neuronas piramidales de CA1, el siguiente paso fue investigar si este metal, en concentraciones que podrían alcanzarse en las sinapsis, modifica algún parámetro de las entradas sinápticas de estas neuronas. Para esta serie de experimentos utilizamos las mismas rebanadas horizontales de hipocampo, pero a diferencia de la condición anterior, se preservó la rebanada completa y no se agregaron bloqueadores de la transmisión sináptica, con el objetivo de mantener la conectividad clásica del circuito hipocampal (Johnston y Amaral, 1998).

VI.2.1 Cobre modifica diferencialmente la frecuencia de los PSP espontáneos que arriban a las neuronas piramidales de CA1

En condición control, la amplitud promedio de los EPSP fue de $0,80 \pm 0,14$ mV, con una frecuencia de arribo de $0,80 \pm 0,20$ Hz; $n = 10$. Luego de estudiar si el cobre modificaba algún parámetro de estas entradas sinápticas encontramos que el cobre modifica selectivamente la frecuencia de arribo de las entradas sinápticas en una fracción de neuronas, mientras que hay un grupo de neuronas en las cuales no varía la frecuencia de arribo y que clasificamos como insensibles a la presencia del metal. De un total de 13 neuronas registradas (por cada neurona se utilizó una rebana), en 7 de ellas la presencia del metal produjo un aumento de la

frecuencia de arribo de los PSP, mientras que en 3 experimentos ocurrió todo lo contrario, la frecuencia de arribo disminuyó luego de la adición del metal. En los tres experimentos restantes la frecuencia de arribo no se vio modificada (neuronas insensibles). A continuación hablaremos separadamente de estos efectos, con la finalidad de que sea más clara su comprensión.

VI.2.1.1 Aumento de la frecuencia de arribo de EPSP.

La figura 8 resume la caracterización realizada a los PSP cuya frecuencia de arribo aumentó al agregar cobre $0,1 \mu\text{M}$. La figura 8A muestra un experimento representativo en el cual se ve claramente que en la condición con cobre aumenta el número de eventos sinápticos (8A izquierda). Al lado derecho de los registros se muestran alineados todos los PSP que abordaron la célula durante 3 minutos. El curso temporal de los arribos se muestra en forma de *raster plot* (ver Materiales y Métodos), el cual muestra una gran correlación entre la adición de cobre y el aumento de la frecuencia de arribo de los PSP (Figura 8B). Luego de los tres primeros minutos desde la adición del metal se produce un aumento cercano al 75% respecto a la condición control (desde $0,62 \pm 0,05$ a $1,08 \pm 0,19$ Hz; $p < 0,05$; $n = 7$). Este aumento de la frecuencia se mantiene durante los siguientes nueve minutos de observación, corroborando la autenticidad del efecto ($0,87 \pm 0,12$ y $0,96 \pm 0,06$ Hz para los intervalos correspondientes a los 4-6 y 7-9 minutos posteriores a la adición de cobre; $p < 0,02$ para ambos intervalos; Figura 8C).

De manera interesante, la amplitud promedio de los PSP presentó una leve tendencia a disminuir luego de la adición de cobre, pero el cambio no es significativo ($0,56 \pm 0,23$ vs $0,50 \pm 0,14$; $0,48 \pm 0,15$ y $0,47 \pm 0,16$ mV; $p > 0,05$ para control vs los tres intervalos posteriores a la adición de cobre,

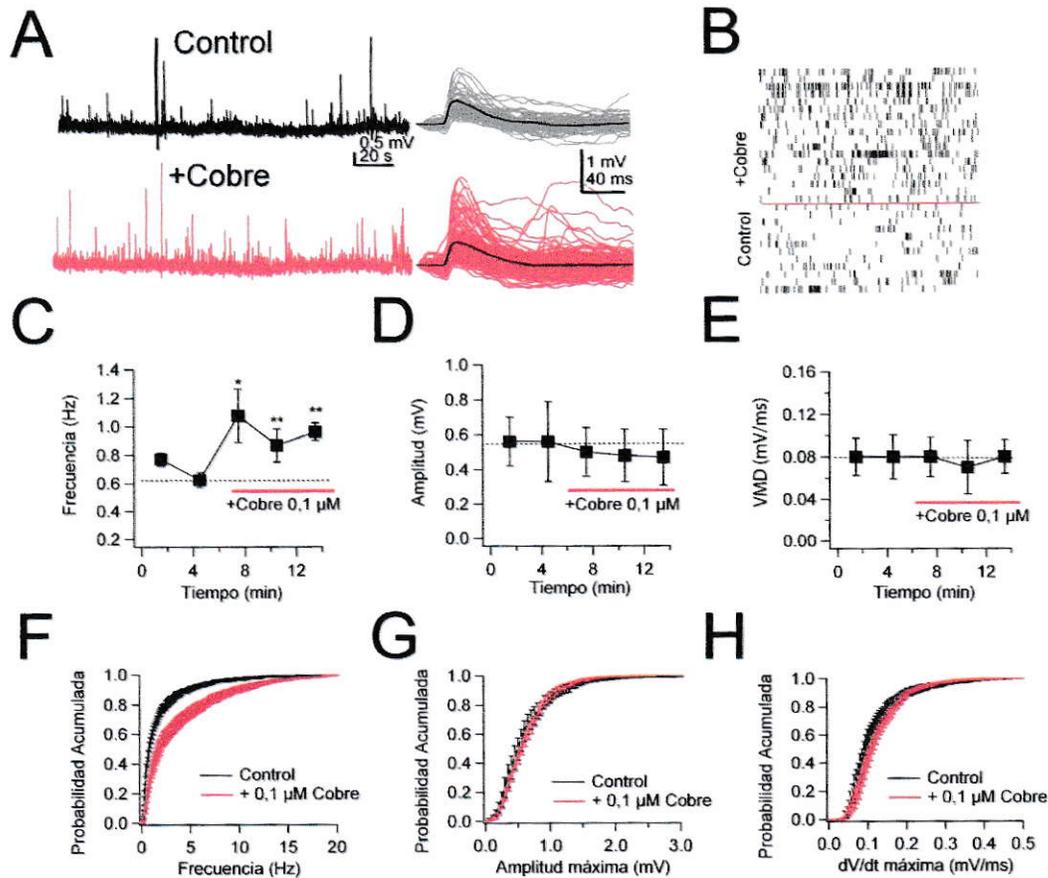


Figura 8. Cobre aumenta la frecuencia de arribo de entradas sinápticas en una fracción de neuronas piramidales.

A) Registros representativos del potencial de membrana de una neurona en condición control y luego dos minutos de la adición de cobre (izquierda). A la derecha está la sobreposición de todos los PSP encontrados en 180 segundos de registros previos y posteriores a la adición del metal (valor promedio en negro). **B)** Raster plot que muestra el aumento en la frecuencia de los PSP luego de la adición de cobre (la línea roja muestra el momento en que se agregó el cobre). **C, D y E)** Curso temporal promedio de la frecuencia de arribo, de la amplitud y de la VMD de los PSP excitatorios, respectivamente, registrados en siete neuronas. Líneas punteadas muestran el valor de la condición control previo a la adición de cobre. **F, G y H)** Promedio de los histogramas acumulados de la frecuencia, amplitud y VMD a partir de los histogramas de las siete neuronas estudiadas (se muestran con error estándar). La comparación de la distribución de las poblaciones en condición control y con cobre muestra que hay cambios solo en la distribución de las frecuencias, curva que se desplaza hacia la derecha en la presencia del metal. La amplitud y la VMD no presentan cambios en la distribución de sus valores (test K-S con $p < 0,05$ como criterio de significancia).

respectivamente; Figura 8D). Para tener un indicador sobre la cinética de la fase de asenso de los PSPs se utilizó la velocidad máxima de despolarización (VMD) de cada evento. Comparando este valor para las distintas condiciones se observa que no hay cambios significativos ($0,08 \pm 0,021$ vs $0,08 \pm 0,019$; $0,07 \pm 0,025$ y

$0,08 \pm 0,016$ mV/ms para la condición control vs los tres intervalos posteriores a la adición de cobre, respectivamente; $p > 0,05$ para todas las comparaciones; $n = 7$; figura 8E).

Como los PSPs registrados pertenecen a una población heterogénea respecto a sus frecuencias promedio, amplitud y VMD, es complicado hacer una caracterización precisa de estos parámetros, por lo cual estudiamos los cambios que produjo el cobre en las distribuciones de los valores de los parámetros mencionados.

Para saber si el cobre modificó la distribución de la frecuencia de arribo, de la amplitud o de la VMD de los PSP comparamos la función de densidad de probabilidad acumulada (FDPA) para ambas condiciones. La figura 8F muestra el promedio de las FDPA obtenido a partir de los siete experimentos en condición control e inmediatamente luego de agregar cobre $0,1 \mu\text{M}$. La adición del metal cambia la distribución de la frecuencia de arribo, desplazándola hacia la derecha, aumentando los eventos con frecuencias mayores (Prueba Kolmogorov-Smirnov para los pares control vs cobre, $p < 0,01$; Figura 8F). Por otra parte, la comparación de las FPDA de las amplitudes de los PSP para condición control y con cobre muestra que, a pesar de aumentar el número de eventos en más de un 70%, la distribución de las amplitudes no cambia (Prueba Kolmogorov-Smirnov para los pares control vs cobre, $p > 0,05$; Figura 8G). Por su parte, la VMD tampoco cambia su distribución significativamente luego de la adición del metal (Prueba Kolmogorov-Smirnov para los pares control vs cobre, $p > 0,05$; Figura 8H).

Dado que la adición de cobre cambió solo la frecuencia de arribo de los PSP y no la amplitud, ni tampoco la VMD, es posible decir que cobre $0,1 \mu\text{M}$ modifica componentes presinápticos del circuito sin alterar los componentes postsinápticos

presentes en estas neuronas piramidales (los distintos tipos de receptores).

VI.2.1.2 Disminución de la frecuencia de arribo de EPSP.

En tres de las trece neuronas registradas en las que estudiamos el efecto de cobre $0,1 \mu\text{M}$ sobre los inputs sinápticos encontramos que la adición del metal produce una disminución de la frecuencia de arribo de los PSPs. La figura 9A muestra uno de los tres experimentos. Al igual que en la figura 8, se muestran trazos de los registros en condición control y con cobre además de una sobreposición de los PSP que abordaron la célula durante 3 minutos de observación en cada condición. En el *raster plot* que muestra el curso temporal del arribo de los PSP antes y después de la adición del metal se ve claramente que la disminución de la frecuencia de los PSP se correlaciona con la presencia de cobre. La frecuencia de arribo de los PSP cae por debajo del 50% del nivel control ($0,85 \pm 0,46$ vs $0,42 \pm 0,33$; $0,32 \pm 0,15$ y $0,43 \pm 0,05$ Hz para la condición control vs los tres intervalos posteriores a la adición del metal; $p < 0,05$ para todas las comparaciones; $n=3$; Figura 9C). La amplitud promedio presenta una tendencia a aumentar, pero no logra cambios significativos ($0,98 \pm 0,12$ vs $1,13 \pm 0,17$; $1,13 \pm 0,17$ y $1,07 \pm 0,19$ mV para la condición control vs los tres intervalos posteriores a la adición de cobre; $p > 0,05$ para todas las comparaciones; $n=3$; Figura 9D).

Por su parte, la VMD de los PSP comienza a aumentar gradualmente luego de la adición de cobre alcanzando cambios muy significativos en el tercer intervalo posterior a la adición del metal ($0,161 \pm 0,016$ vs $0,183 \pm 0,023$; $0,196 \pm 0,016$ y $0,197 \pm 0,014$ mV/ms para la condición control vs los tres intervalos posteriores a la adición del metal; $p < 0,05$ y $p < 0,02$ para los segundo y tercer intervalos de observación comparados con la condición con cobre, respectivamente; Figura 9E).

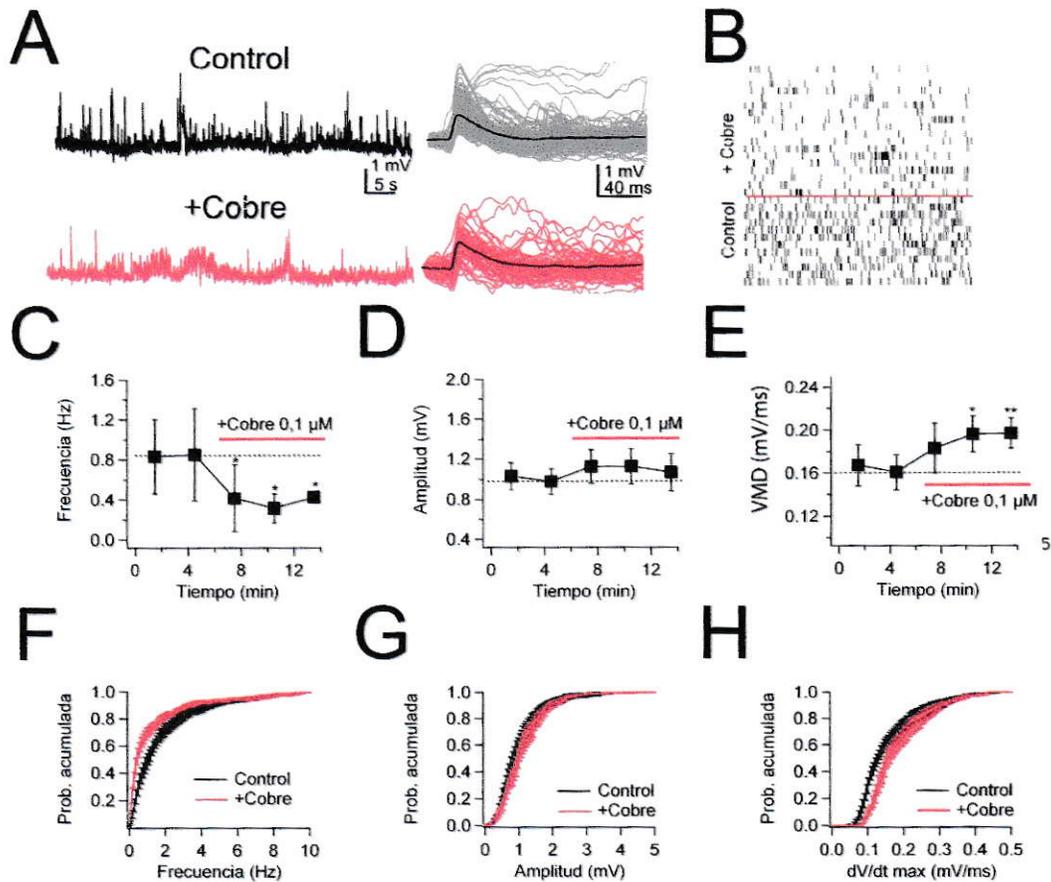


Figura 9. Cobre disminuye la frecuencia de arribo de los inputs sinápticos en una fracción de neuronas piramidales. **A)** Registros representativos del potencial de membrana de una neurona en condición control y luego dos minutos de la adición de cobre (izquierda) y la sobreposición de todos los PSP encontrados en 180 segundos de registros previos y posteriores a la adición del metal (valor promedio en negro, derecha). **B)** Raster plot que muestra la disminución de la frecuencia de los PSP luego de la adición de cobre (la línea roja muestra el momento en que se agregó el cobre). **C, D y E)** Curso temporal promedio de la frecuencia de arribo, de la amplitud y de la VMD de los PSP excitatorios, respectivamente, registrados en las tres neuronas en que cobre disminuyó la frecuencia de arribo de los PSPs. Líneas punteadas muestran el valor de la condición control previo a la adición de cobre. **F, G y H)** Promedio de los histogramas acumulados de Frecuencia de arribo, amplitud y VMD de los PSPs de las tres neuronas estudiadas (se muestran con error estándar). La comparación de la distribución de las poblaciones muestra que hay cambios en la distribución de las frecuencias, curva que se desplaza hacia izquierda, y en la VMD, curva que se desplaza hacia la derecha, aumentando las VMD máximas (test K-S con $p < 0,05$ como criterio de significancia).

Dado que la cinética de los PSP depende principalmente de los receptores postsinápticos y de las propiedades de conducción de la neurona registrada, el aumento en el VMD sugiere que ocurre una modificación lenta que se produce sobre componentes postsinápticos.

Al comparar el promedio de los histogramas acumulados para las tres variables estudiadas se observa que en el caso de la frecuencia de arribo de los PSP la adición de cobre cambia la distribución, desplazando hacia la izquierda la curva dejando la distribución de frecuencias sobre valores más pequeños (prueba Kolmogorov-Smirnov entre pares Control vs Cobre, $p < 0,01$; Figura 9F). Las distribuciones de las amplitudes no presentan cambios significativos en condición control y luego de agregar cobre (prueba Kolmogorov-Smirnov entre pares Control vs Cobre, $p > 0,05$; Figura 9G). Esta vez la VMD de los PSP si cambió su distribución en presencia de cobre, desplazándose hacia la derecha, de manera correspondiente al efecto sobre la VMD promedio, presentando mayores valores (prueba Kolmogorov-Smirnov entre pares Control vs Cobre, $p < 0,01$; Figura 9H).

La disminución en la frecuencia de arribo de los PSP sin que cambie su amplitud promedio nuevamente indica que el cobre está modificando componentes presinápticos, pero en este grupo de neuronas tiene un efecto completamente distinto al descrito previamente, disminuyendo el arribo de PSP. Por otra parte, el aumento de la VMD sugiere modificaciones postsinápticas que podrían tener un impacto en la integración temporal de las entradas sinápticas.

VII. DISCUSIÓN

A pesar de existir evidencia sobre la presencia, la liberación y la potencialidad moduladora del cobre en el cerebro, aun no se ha podido demostrar si este metal es un neuromodulador en condiciones fisiológicas. Su alta reactividad y consecuente toxicidad (Brown y col., 1998) se traduce en un estricto control intracelular de su concentración, llegando a menos de una molécula de cobre libre por célula (Rae y col., 1999). Esto hace poco probable que en el espacio sináptico se puedan lograr concentraciones del orden de los 100-200 μM como fue estimado inicialmente con experimentos en los cuales se midió la liberación de cobre exógeno que previamente había sido cargado en los tejidos (Hartter y Barnea, 1988; Kardos y col., 1989). En el laboratorio hemos observado que neuronas piramidales expuestas a 100 μM de cobre se despolarizan rápidamente, evidenciando una modificación que podría estar relacionada con un efecto tóxico del metal (~ 10 mV/min, $n = 6$ de 6. Datos no mostrados). Esta despolarización es posible que se deba a modificaciones en la excitabilidad intrínseca de estas neuronas o a un aumento en la liberación espontánea de neurotransmisores, ya que se mantiene en presencia de tetrodotoxina (TTX, toxina que bloquea los canales de sodio eliminando los potenciales de acción). Estas observaciones apoyan la idea que concentraciones de cobre mayores a 10 μM tienen consecuencias dañinas para las células, indicando que de existir efectos de cobre relevantes para la fisiología del cerebro, estas deben ocurrir en rangos de concentraciones más bajas. Por este motivo es posible que las observaciones hechas en nuestro laboratorio, en las cuales el cobre aumenta la tasa de disparos espontáneos de neuronas piramidales, describan un fenómeno natural en la

regulación endógena de la excitabilidad neuronal.

Este modelo propone que es la liberación de cobre sináptico lo que produciría cambios en la excitabilidad de las neuronas, y de él se deduce que debería existir una concentración basal de cobre en el espacio extracelular que mantiene un nivel de modificación permanente. Resultados de nuestro laboratorio muestran que la adición de un quelante selectivo de cobre (II) (batocupreína sulfónica) a las rebanadas de hipocampo disminuye la frecuencia de disparo de neuronas de CA1 y CA3, produciendo el efecto contrario de la adición de cobre. Estos resultados apoyan el modelo de estudio, sugiriendo que la actividad basal de esas neuronas depende de la presencia de cobre endógeno (Ignacio Díaz F., datos no publicados).

VII.1 Cobre y excitabilidad intrínseca

La forma en que las neuronas integran, procesan y transmiten las señales eléctricas que reciben por las miles de entradas sinápticas depende de sus propiedades intrínsecas de membrana, las cuales son blanco de distintos neuromoduladores (Bean 2007; McCormick 1992) y podría ser el mecanismo por el cual cobre aumenta la frecuencia de disparo de un grupo de neuronas piramidales.

De todos los componentes de la excitabilidad intrínseca estudiados el único cambio significativo que se encontró fue el aumento en la variabilidad del umbral de disparo (aumento de 24% del coeficiente de variación, figura 5C). Como el umbral de disparo es un parámetro que refleja la activación de los canales de sodio $Na_v1.6$ (Royeck y col., 2008; Hu y col., 2009), es posible que el cobre esté interactuando de alguna manera con estos canales. Además, debido a que los

canales de sodio sensibles a voltaje pertenecen a una familia de canales que mantiene altos niveles de identidad en sus secuencias aminoacídicas (Yu y Catterall, 2003) y podrían tener conservado los sitios de unión a cobre, es posible que el aumento de la variabilidad del umbral esté relacionado estructuralmente con las modificaciones que produce el cobre sobre las corrientes de sodio de neuronas olfatorias (Delgado y col., 2006; Aedo y col., 2007). Sin embargo, la interpretación del efecto que pueda tener el aumento en la variabilidad del umbral en la actividad de las neuronas piramidales y finalmente, en la actividad de la red hipocampal completa, es muy compleja y es necesario hacer otro tipo de experimentos para evaluar el impacto de esta modificación. Una buena aproximación para su comprensión sería hacer simulaciones computacionales para tener una idea del efecto de la variabilidad del umbral de disparo en la dinámica de redes neuronales.

Estos resultados que muestran que el cobre no modifica distintos componentes de la excitabilidad intrínseca de membrana son interesantes, ya que algunos de los canales involucrados en ellos han sido reportados como sensibles a cobre. Gruss y col. 2004, describieron que el cobre activa en un 80% a los canales TREK-1, encargados del potencial de reposo y la resistencia de entrada, con una IC_{50} de 3 μM (Gruss y col., 2004). De manera similar, se describió que el cobre se une de manera selectiva al canal BK, el canal encargado en la repolarización de la espiga y facilitación de las frecuencias de disparo altas, inhibiéndolo con una IC_{50} de 2 μM (Gu y col., 2007; Ma et al, 2008). Mediante estudios de corrientes de célula completa se demostró que el cobre es un potente inhibidor de las corrientes de calcio presentes en neuronas corticales dissociadas, con una IC_{50} de 0,9 μM (Castelli y col., 2003). Según estas investigaciones era esperable encontrar modificaciones significativas de los parámetros que aquellos canales y corrientes

determinan, sin embargo no hubo cambios apreciables luego de la adición del metal (potencial de reposo, amplitud y duración del potencial de acción, ADP, VMD y VMR, frecuencia de disparo y acomodación de la frecuencia).

Es interesante el hecho que, a pesar de que esté descrito que el cobre modifica las corrientes transportadas por ciertos canales no es seguro de que dichas modificaciones tengan una repercusión en la actividad eléctrica de las neuronas que las poseen. Esto queda de manifiesto en los estudios de Trombley y Sheperd (1996) en neuronas del bulbo olfatorio donde ellos encuentran que cobre $30 \mu\text{M}$ modifica significativamente las corrientes de sodio y de potasio (registradas mediante voltaje controlado), sin embargo el curso temporal del potencial de acción no se ve modificado (registrado mediante corriente controlada)(Horning y Trombley, 2001). Esto ocurre porque al registrar las corrientes utilizando voltaje controlado se utilizan condiciones especiales para favorecer la resolución de una corriente en particular y se observa el curso temporal frente a un pulso de voltaje constante. Por el contrario, al medir la actividad eléctrica de las neuronas utilizando la modalidad de corriente controlada se observa cómo responde el voltaje de membrana en su totalidad en función de los distintos componentes que interactúan en una compleja dinámica temporal, que es lo que se necesita si se quiere evaluar un posible papel del cobre en la modulación de la excitabilidad neuronal.

VII.2. Cobre modifica la frecuencia de arribo de los EPSP.

La actividad de las neuronas corticales depende de la frecuencia con que arriben a ella los PSPs generando un bombardeo sináptico, cuya razón entre PSP inhibitorios y excitatorios (peso sináptico) determina si una neurona se mantiene

silente o si se despolariza sobre el umbral y dispara potenciales de acción (Haider y McCormick, 2009). El principal hallazgo de este trabajo es que el cobre $0,1 \mu\text{M}$ modifica la frecuencia de arribo de los PSP excitatorios en una fracción de neuronas piramidales de CA1, demostrando la potencialidad moduladora de este metal sobre un parámetro directamente relacionado con la excitabilidad neuronal.

Estos cambios pueden deberse a modificaciones sobre la actividad de las neuronas aferentes (sobre sus propiedades intrínsecas) o a modificaciones sobre la probabilidad de liberación de las vesículas sinápticas, produciendo que el mismo nivel de actividad aferente libere distinta cantidad de vesículas, o a una mezcla de ambas modificaciones. Resultados de nuestro laboratorio de mediciones de potenciales de campo en CA1 resultantes de la estimulación de CA3 muestran que, en una fracción de los registros, el cobre produce un aumento de la eficacia sináptica entre estas neuronas, corroborando desde un enfoque poblacional la observación que realizamos en neuronas individuales.

De forma interesante, el hecho de que luego de la adición de cobre la modificación de la frecuencia promedio de los PSPs excitatorios pueda ocurrir tanto como un aumento o como una disminución indica que existen sinapsis o aferencias con distinta respuesta a la presencia del metal, unas que aumentan su probabilidad de liberación y otras que la disminuyen. Es posible que el cobre también esté modificando la probabilidad de liberación espontánea de vesículas (no confundir con la liberación de vesículas debido a potenciales de acción) provenientes desde las decenas de miles de sinapsis que poseen estas neuronas, entre las que cuentan principalmente sinapsis glutamatérgicas, pero también gabaérgicas, colinérgicas, noradrenérgicas y serotoninérgicas (Megías y col., 2001; Johnston y Amaral, 1998). La distribución de la densidad de cada tipo de sinapsis

varía a lo largo del eje dorso-ventral del hipocampo, permitiendo que las mismas neuronas piramidales (mismas respecto a sus propiedades intrínsecas de membrana, pero diferentes respecto a sus aferencias) generen una gran heterogeneidad celular respecto a sus entradas sinápticas (Johnston y Amaral, 1998). De manera relacionada con esto, en nuestro laboratorio hemos encontrado que la concentración de cobre también muestra un gradiente a lo largo del eje dorso-ventral, presentando mayor marca en la región ventral (María José Díaz, datos no publicados). De esta manera, es muy probable que el aumento o disminución de la frecuencia de arribo de los PSP excitatorios se deba a que el cobre aumenta la probabilidad de liberación en un determinado tipo de sinapsis o aferencia, mientras que la disminuye en otro tipo, de modo que el resultado final sobre la frecuencia de arribo va a depender del tipo y de la cantidad de sinapsis que posea cada neurona registrada. Una observación experimental que apoya esta hipótesis es que registros simultáneos de dos neuronas piramidales separadas por cerca de 100 μm muestran que una neurona se ve modificada por la presencia del metal mientras que la otra mantiene sus parámetros constantes (Carlos Maureira, datos no publicados).

Todas las investigaciones en las que se ha estudiado el efecto de cobre sobre la excitabilidad neuronal se enfocan en modificaciones que se producen directamente en la neuronas, dejando de lado un componente del circuito neuronal que está involucrado directamente en la excitabilidad neuronal, estos son los astrocitos. El término "sinapsis tripartita" representa un nuevo concepto en la fisiología de las sinapsis y se refiere a la interacción funcional entre los astrocitos y los botones pre y postsinápticos (Perea y col., 2009). De modo similar a las neuronas que presentan excitabilidad eléctrica, los astrocitos presentan una

excitabilidad basada en oscilaciones de la concentración de calcio intracelular (Nett, y col., 2002; Perea y Araque, 2005; Aguado y col., 2002), que determina la dinámica de liberación de vesículas con glutamato mediante exocitosis (Malarkey y Parpura, 2008; Li y col., 2008). En el hipocampo, el glutamato liberado por los astrocitos produce un aumento en la probabilidad de liberación de vesículas sinápticas (Perea y Araque, 2007), modula las sinapsis inhibitorias (Kang J. y col., 1998) y promueve la actividad sincrónica de las neuronas piramidales de CA1 (Fellin y col., 2004). Esta liberación de glutamato por los astrocitos está conectada a la actividad sináptica, ya que los astrocitos censan la actividad presináptica mediante receptores purinérgicos P2Y1 y P2X7, los cuales captan el ATP liberado por la neurona presináptica desencadenando cambios en la dinámica del calcio intracelular, produciendo un claro efecto sobre el procesamiento de información en el que está involucrada la unidad sináptica (Pascual y col., 2005; Jourdain y col., 2007; Malarkey y Parpura, 2008; Perea y col., 2009).

Ya que las células gliales presentan marca de cobre y además poseen el mecanismo necesario para la acumulación de este metal, es posible que el cobre tenga un papel en su fisiología (Szerdahelyi y Kása, 1986; Scheiber y col., 2010). En sistemas de expresión heteróloga se ha demostrado que los receptores purinérgicos P2Y1 y P2X7, que determinan la dinámica de liberación de glutamato en los astrocitos, son sensibles a cobre. Se ha descrito que el receptor P2Y1 presenta una disminución en su actividad con cobre en concentraciones mayores a 30 μM (Huidobro-Toro y col., 2008), presentando una baja sensibilidad al metal. Sin embargo, es posible que los receptores expresados endógenamente en los astrocitos presenten una sensibilidad distinta. Por su parte, el cobre inhibe las corrientes del receptor P2X7 con un IC_{50} de 0,5 μM (Virginio y col., 1997). Dado

que los astrocitos están presentes en cerca de un 40% de las sinapsis hipocampales (Ventura y Harris, 1999), es posible que el cobre liberado modifique la dinámica de calcio intracelular de los astrocitos y con ello la probabilidad de liberación de las vesículas sinápticas y la red inhibitoria de las neuronas hipocampales, ambos efectos que hemos observado luego de la adición del metal. Otra posibilidad que no se ha explorado es que quizás los astrocitos también puedan participar en una liberación de cobre hacia el espacio extracelular, de forma dependiente de actividad.

Otro factor que podría estar involucrado en este efecto diferencial del cobre sobre la frecuencia de arribo de los PSP se desprende del efecto inhibitorio que se ha descrito para el cobre como bloqueador de los receptores de GABA-a con una IC_{50} de $0,03 \mu\text{M}$ (Kardos y col., 1989; Sharonova y col., 1998). La actividad de las neuronas piramidales de CA1 ya sea *in vivo* o *in vitro* es baja, estando silentes o con una frecuencia de disparo de un par de hercios, debido a que están bajo un fuerte control inhibitorio producido por un grupo diverso de interneuronas inhibitorias (Klausberger y Somogyi, 2008; Ahmed y Metha, 2009). Las entradas glutamatérgicas de las colaterales de Shaffer, además de estimular a las neuronas piramidales estimulan al mismo tiempo a las distintas interneuronas ubicadas en CA1, las cuales al ser despolarizadas inhiben a las neuronas piramidales que previamente habían sido despolarizadas. La señal inhibitoria llega a la neurona piramidal con un leve retardo respecto a la señal excitatoria (producido por la sinapsis adicional), aumentando la precisión de la ventana de actividad de las neuronas piramidales de CA1, proceso denominado *feedforward inhibition* (Traub y Miles, 1991; Sheperd y Koch, 1998). Por este motivo, es muy probable que la adición de cobre $0,1 \mu\text{M}$ haya disminuido el tono inhibitorio del la red hipocampal

mediante el bloqueo de receptores GABA-a, desplazando la relación entre inhibición y excitación que llega a las neuronas piramidales. Esto puede traducirse en un aumento o disminución de la frecuencia de arribo de los EPSP dependiendo del efecto total que se produzca en el microcircuito en el que se encuentra la neurona piramidal registrada. Resultados de nuestro laboratorio que concuerdan con esta hipótesis, muestran que cobre 0,05 μM disminuye la inhibición post estímulo de las neuronas piramidales, demostrando que la adición del metal decrece el peso de las conexiones inhibitorias (Maureira y col., 2010).

Finalmente, resumo las observaciones realizadas con el modelo que se muestra en la figura 10. Nosotros proponemos que las aferencias excitatorias de las neuronas piramidales de CA1 pueden clasificarse en tres tipos dependiendo de su sensibilidad a cobre. Las que disminuyen la frecuencia de liberación de neurotransmisores al agregar cobre nanomolar (sensibilidad negativa), las que aumentan la frecuencia de liberación (sensibilidad positiva) y las que no se ven afectadas por la presencia del metal (no sensibles) (Figura 10A). Además están las aferencias inhibitorias cuya amplitud es disminuida en presencia del metal. Parte importante del modelo es que los astrocitos pueden estar involucrados en la modulación por cobre, y que incluso podrían ser ellos los que generen los distintos tipos de sensibilidad en las aferencias.

El efecto final que va a tener el cobre sobre la actividad de una determinada neurona va a depender del tipo y cantidad que tenga de estos cuatro tipos de aferencias. Las neuronas que posean mayor cantidad de aferencias sensibles positivas respecto a las sensibles negativas aumentarán sus entradas excitatorias, con el consecuente aumento de su actividad. Por el contrario, las que posean una mayor cantidad de aferencias sensibles negativas deberían disminuir su actividad.

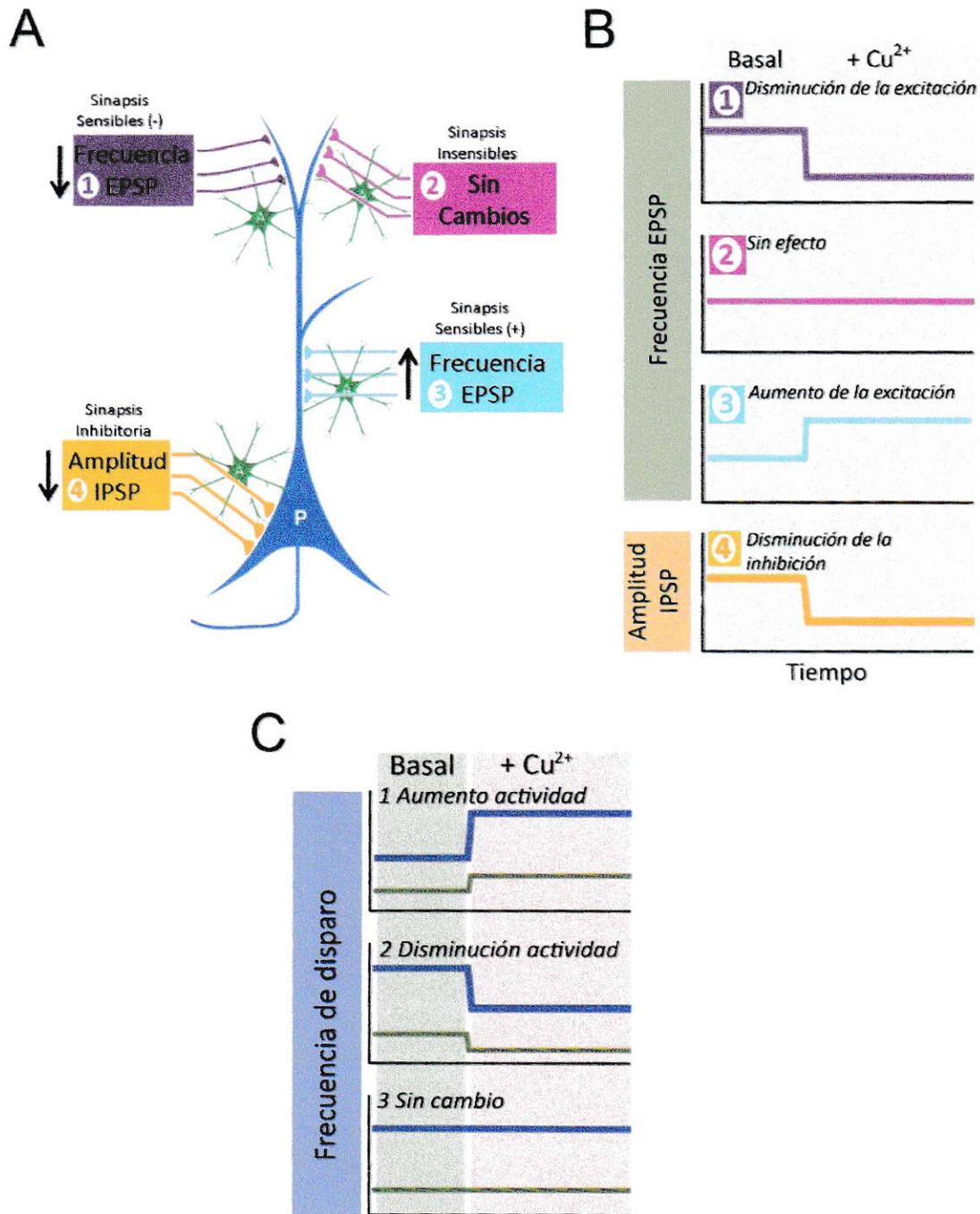


Figura 10. Modelo del efecto modulador del cobre sobre la actividad de neuronas piramidales de CA1. A. Neurona piramidal (P) con los distintos tipos de aferencia, mostrando como cambian sus parámetros al agregar cobre nanomolar. Los astrocitos (A) se muestran en verde. B. Esquema del curso temporal del efecto de cobre sobre los parámetros modificados en las distintas aferencias. C. Esquema del efecto del cobre sobre el curso temporal de la actividad de las neuronas piramidales, mostrando las tres tipos de respuestas esperadas según nuestro modelo. La línea azul representa el nivel de actividad (frecuencia de disparo) y la línea verde el nivel de entradas excitatorias respecto a las inhibitorias.

Dado que todas las neuronas presentan gran cantidad de aferencias inhibitorias, el aumento de excitación (producto de la disminución de la inhibición) debería ser observado en la mayoría de las neuronas registradas.

De esta manera, con distintas combinatorias de estas aferencias es posible obtener tres tipos de respuesta a la presencia del metal: Neuronas que aumenten su actividad, que disminuyan su actividad y un tercer tipo insensible a la presencia de cobre (Figura 10C).

VII.3. Trabajo futuro y proyección de la línea de investigación

El mecanismo por el cual produce estas modificaciones es un misterio. Sin embargo conocemos quienes son los posibles candidatos para realizar una estudio más dirigido. Para resolver ese problema es necesario hacer al menos tres series experimentales. La primera, consiste en estudiar el efecto del cobre sobre los PSP en presencia de TTX para eliminar la actividad eléctrica, y de esta manera saber si las modificaciones por cobre son dependientes de actividad presináptica (potenciales de acción) o si se modifica la probabilidad de liberación espontánea de las vesículas sinápticas. De esta manera se podrá identificar si cobre modifica directamente la probabilidad de liberación de las vesículas o si aumenta la actividad de las neuronas presinápticas.

La segunda serie de experimentos estaría enfocada en disectar el efecto de cobre sobre los distintos PSP excitatorios utilizando bloqueadores sinápticos para identificar cuál es el neurotransmisor principal que evoca los PSP que cambian su frecuencia. Por ejemplo, se podría encontrar que solo los PSP evocados por acetilcolina modifican su frecuencia, mostrando que son los inputs provenientes

desde el séptimo los sensibles a cobre.

Una tercera serie experimental estaría dirigida hacia determinar el efecto del cobre sobre los PSP inhibitorios. Según lo comentado, en este caso podría ocurrir una disminución considerable de la amplitud de los eventos, producto del bloqueo de los receptores GABA-a, o bien una disminución de la probabilidad de liberación, producto de una disminución del glutamato liberado por los astrocitos.

Una vez realizadas estas series experimentales será posible, siendo optimista, identificar cual es la causa de la modificación de la frecuencia de arribo de los EPSP, y de esta manera poder comprender un poco más cuál es papel del cobre en la fisiología del hipocampo.

VIII. CONCLUSIÓN

Cobre en concentraciones que pueden ser alcanzadas en el espacio sináptico produce un aumento en la variabilidad del umbral de disparo de las neuronas piramidales y además modifica la frecuencia de arribo de las entradas sináptica.

Suponiendo que en la rebanada de hipocampo las neuronas piramidales se encuentran con el potencial de membrana cercano al umbral de disparo, el aumento de la variabilidad del umbral de disparo, junto con un aumento de las entradas sinápticas, son suficientes para explicar el aumento de la tasa de disparo observado con la adición de cobre.

En este trabajo se encontró que las neuronas piramidales pueden presentar dos tipos de respuesta a la presencia de cobre. Este efecto heterogéneo puede ser el resultado de una conectividad diferencial de estas neuronas, que al tener distintas aferencias forman poblaciones de neuronas con distinta sensibilidad a cobre que en un contexto funcional podrían dar lugar a microcircuitos específicos de la red hipocampal que son sensibles al metal.

Debido a que la comunicación sináptica es la base de la conectividad funcional que determina la dinámica cortical y los procesos cognitivos que realiza el hipocampo (Treves, 2009), estos resultados muestran que el cobre puede tener un papel en la regulación de la excitabilidad de las neuronas hipocampales y contribuir con el funcionamiento normal de esta región del cerebro.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Aedo F, Delgado R, Wolff D, Vergara C (2007) Copper and zinc as modulators of neuronal excitability in a physiologically significant range. *Neurochem. Int.* 50: 591-600.
- Aguado F., Espinosa-Parrilla J., Carmona M. y Soriano E. (2002) Neuronal activity regulates correlated network properties of spontaneous calcium transients in astrocytes in situ. *J. Neurosci.* 22:9430-44.
- Ahmed O. y Metha M. (2009) The hippocampal rate code: anatomy, physiology and theory. *Trends Neurosci.* 32:329-338.
- Andrasfalvy B. y Magee J. (2001) Distance-dependent increase in AMPA receptor number in the dendrites of adult hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J. Neurosci.* 21, 9151-9159
- Bean B. (2007) The action potential in mammalian central neurons. *Nat. Rev. Neurosci.* 8:451-465.
- Brown D, Schmidt B and Kretzschmar H (1998) Effects of Copper on Survival of Prion Protein Knockout Neurons and Glia. *J Neurochem* 70:1687-1693.
- Castelli L., Tanzi F., Taglietti V. y Magistretti J. (2003) Cu^{2+} , Co^{2+} , and Mn^{2+} modify the gating kinetics of high-voltage-activated Ca^{2+} channels in rat palaeocortical neurons. *J. Membr. Biol.* 195:121-36.
- Colburn R. y Maas J (1965) Adenosine triphosphate metal norepinephrine ternary complexes and catecholamine binding. *Nature* 208:37-41.
- Cook C., Disterhoft J. y Spruston N. (2007) Stability and plasticity of intrinsic membrane properties in hippocampal CA1 pyramidal neurons: effects of internal ions. *J. Physiol.* 578:799-818.
- Delgado R., Vergara C. y Wolff D. (2006) Divalent cations as modulators of neuronal excitability: emphasis on copper and zinc. *Biol. Res.* 39:173-82.
- Fellin T., Pascual O., Gobbo S., Pozzan T., Haydon P. y Carmignoto G. (2004) Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors. *Neuron* 43:729-43.
- Freund T. y Buzsáki G. (1996) Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6:347-470.
- Gruss M., Mathie A., Lieb W. y Franks N. (2004) The two-pore-domain K^{+} channels TREK-1 and TASK-3 are differentially modulated by copper and zinc. *Mol Pharmacol.* 66:530-7.
- Gu N., Vervaeke K. y Storm J. (2007) BK potassium channels facilitate high-frequency firing and cause early spike frequency adaptation in rat CA1 hippocampal pyramidal cells. *J. Physiol.* 580:859-882.
- Haider B., y McCormick D. (2009) Rapid neocortical dynamics: cellular and network mechanisms. *Neuron* 30:171-189.
- Harris K., Hirase H., Leinekugel X., Henze A. y Buzsáki G. (2001) Temporal interaction between single spikes and complex spike bursts in hippocampal pyramidal cells. *Neuron* 32: 141-149.
- Hartter D. y Barnea A. (1988) Evidence for release of copper in the brain: depolarization-induced release of newly taken-up ^{67}Cu . *Synapse* 2: 412-415.
- Hopt A., Korte S., Fink H., Panne U., Niessner R., Jahn R., Kretzschmar H. y Herms J. (2003)

- Methods for studying synaptosomal copper release. *J Neurosci Methods* 128: 159-172.
- Horning M. y Trombley P. (2001) Zinc and copper influence excitability of rat olfactory bulb neurons by multiple mechanisms. *J. Neurophysiol.* 86:1652-1660.
- Hu W., Tian C., Li T., Yang M., Hou H. y Shu Y. (2009) Distinct contribution of Na_v1.6 and Na_v1.2 in action potential initiation and backpropagation. *Nat. Neurosci.* 12:996-1002.
- Huidobro-Toro J., Lorca R. y Coddou C. (2008) Trace metals in the brain: allosteric modulators of ligand-gated receptor channels, the case of ATP-gated P2X receptors. *Eur. Biophys. J.* 37:301-14.
- Jeong S., Park B., Park J., Lee JW. y Lee JH. (2003) Divalent metals differentially block cloned T-type calcium channels. *Neuroreport.* 14:1537-1540.
- Johnston D. y Amaral D. (1998) Hippocampus. En: Shepherd G. ed. *The Synaptic Organization of the Brain*. 4th ed. New York, NY: Oxford University Press, Inc.417-458.
- Jourdain P., Bergersen L., Bhaukaurally K., Bezzi P., Santello M., Domercq M., Matute C., Tonello F., Gundersen V. y Volterra A. (2007) Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength. *Nat. Neurosci.* 10:331-9.
- Káli S. y Freund T. (2005) Distinct properties of two major excitatory inputs to hippocampal pyramidal cells: a computational study. *Eur. J. Neurosci.* 22:2027:2048.
- Kang J., Jiang L., Goldman S. y Nedergaard M. (1998) Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nat. Neurosci.* 8:683-692.
- Kardos K., Kovács I., Hajós F., Kálmán M. y Simonyi M. (1989) Nerve endings from rat brain tissue release copper upon depolarization. A possible role in regulating neuronal excitability. *Neurosci Lett* 103: 139-144.
- Klausberger T., Somogyi P. (2008) Neuronal diversity and temporal dynamics: The unity of hippocampal circuit operations. *Science* 321: 53-57.
- Kozma M., Szerdahelyi P. y Kasa P. (1981) Histochemical detection of zinc and copper in various neurons of the central nervous system. *Acta. Histochem.* 69: 12-17.
- Li D., Ropert N., Koulakoff A., Giaume C. y Oheim M. (2008) Lysosomes are the major vesicular compartment undergoing Ca²⁺-regulated exocytosis from cortical astrocytes. *J. Neurosci.* 28:7648-58.
- Lorca R., Coddou C., Gazitúa M., Bull P., Arredondo C. y Huidobro-Toro J. (2005) Extracellular histidine residues identify common structural determinants in the copper/zinc P2X2 receptor modulation. *J Neurochem.* 95:499-512.
- Ludwig A., Zong X., Jeglitsch M., Hofmann F. and Biel M. (1998) A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature* 393, 587-591.
- Lutsenko S. and Petris M.J. (2003) Function and regulation of the mammalian copper-transporting ATPases: insights from biochemical and cell biological approaches. *J Membr boil* 191:1-12.
- Ma Z., Wong K. y Horrigan F. (2008) An Extracellular Cu²⁺ binding site in the voltage sensor of BK and Shaker potassium channels. *J. Gen. Physiol.* 131:483-502.

- Madison D. y Nicoll R. (1983) Control of the repetitive discharge of the rat CA1 pyramidal neurones *in vitro*. *J. Physiol.* 354:319-331.
- Magee J. y Cook E. (2000) Somatic EPSP amplitude is independent of synapse location in hippocampal pyramidal neurons. *Nat. Neurosci.* 3: 895–903.
- Malarkey E. y Parpura V. (2008) Mechanisms of glutamate release from astrocytes. *Neurochem. Int.* 52:142-54.
- Mathie A., Sutton G., Clarke C. y Veale E. (2006) Zinc and copper: Pharmacological probes and endogenous modulators of neuronal excitability. *Pharmacology and Therapeutics* 111: 567-583.
- Maureira C., Vera J., Delgado R., Wolff D., Alvarez A. y Vergara C. (2010) Low doses of copper and zinc modulates CA1 pyramidal neurons and network excitability in the rat hippocampus. En redacción.
- McCormick D. (1992) Neurotransmitter action in the thalamus and cerebral cortex and their role in neuromodulation of thalamocortical activity. *Prog. Neurobiol.* 39:337-388.
- Megías M., Emri Z., Freund T. y Gulyas A. (2001) Total number and distribution of inhibitory and excitatory synapses on hippocampal CA1 pyramidal cells. *Neuroscience* 102:527–540.
- Morera F., Wolff D. y Vergara C. (2003) External copper inhibits the activity of the large-conductance calcium- and voltage-sensitive potassium channel from skeletal muscle. *J. Membr. Biol.* 192:65-72.
- Neher E. (1992) Correction for liquid junction potentials in patch clamp experiments. *Methods. Enzymol.* 207:123-131.
- Nett W., Oloff S. y McCarthy K. (2002) Hippocampal astrocytes *in situ* exhibit calcium oscillations that occur independent of neuronal activity. *J. Neurophysiol.* 87:528-37.
- Niu Z., Yu K., Gu Y., Wang M., She J., Chen W. y Ruan D. (2005) Effects of copper on A-type potassium currents in acutely dissociated rat hippocampal CA1 neurons. *Neuroreport* 16:1585-1589.
- Niu Z., Chen J., Wang S. Wang M., Li X. y Ruan D. (2006) Inhibition of delayed rectifier K⁺ currents by copper in acutely dissociated rat hippocampal CA1 neurons *Toxicol. Lett.* 165:289-96.
- Okaeda, R., Gei S., Chen I., Okaniwa M., Shinomiya M. and Matsubara O. (1991) Menkes' kinky hair disease: morphological and immunohistochemical comparison of two autopsied patient. *Acta Neuropathol (Ber)* 81:450-457
- Pascual O., Casper K., Kubera C., Zhang J., Revilla-Sanchez R., Sul J., Takano H., Moss S., McCarthy K. y Haydon P. (2005) Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks. *Science* 310:113-6.
- Perea G. y Araque A. (2005) Properties of synaptically evoked astrocyte calcium signal reveal synaptic information processing by astrocytes. *J. Neurosci.* 25:2192-203.
- Perea G. y Araque A. (2007) Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science* 317:1083-6.
- Perea G., Navarrete M. y Araque A. (2009) Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends. Neurosci.* 32:421-31.
- Rae T., Schmidt P., Pufahl R., Culotta V. y O'Halloran T. (1999) Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science.* 284:805-8.
- Royeck M., Horstmann M., Remy S., Reitze M., Yaari Y. y Beck H. (2008) Role of axonal NaV1.6 sodium channels in action potential initiation of CA1 pyramidal neurons. *J. Neurophysiol.* 100:2361-2380.

- Sato M., Ohtomo K., Daimon T., Sugiyama T. y Iijima K. (1994) Localization of copper to afferent terminals in rat locus ceruleus, in contrast to mitochondrial copper in cerebellum. *J. Histochem. Citochem.* 42:1585-1591.
- Sayer R., Friedlander M. and Redman S. (1990) The time course and amplitude of EPSPs evoked at synapses between pairs of CA3/CA1 neurons in the hippocampal slices. *J Neurosci* 10:826-836.
- Scheiber I., Mercer J. y Dringen R. (2010) Copper accumulation by cultured astrocytes. *Neurochem. Int.* 56:451-60.
- Schlieff M. y Gitlin J. (2006) Copper homeostasis in the CNS. *Mol Neurobiol* 33: 81-90.
- Sharonova I., Vorobjev V. y Haas H. (1998) High affinity copper block of GABA(A) receptor-mediated currents in acutely isolated cerebellar Purkinje cells of the rat. *Eur J Neurophysiol* 10:522-528.
- Shepherd G. y Koch C. (1998) Introduction to synaptic circuits. En: Shepherd G. ed. *The Synaptic Organization of the Brain*. 4th ed. New York, NY: Oxford University Press, Inc. 1-36.
- Storm J (1987) Action potential repolarization and a fast after-hyperpolarization in rat hippocampal pyramidal cells. *J. Physiol.* 385:733-759.
- Stocker M., Krause M. y Pedarzani P. (1999) An apamin-sensitive Ca^{2+} -activated K1 current in hippocampal pyramidal neurons. *Neurobiology* 96:4662-4667.
- Szerdahelyi P. y Kása P. (1986) Histochemical demonstration of copper in normal rat brain and spinal cord. *Histochemistry* 85:341-347.
- Tarohda T., Yamamoto M. y Amano R. (2004) Regional distribution of manganese, iron, copper, and zinc in the rat brain during development. *Anal. Bioanal. Chem.* 380:240-246.
- Taverna S, Tkatch T, Metz AE, Martina M. (2005) Differential expression of TASK channels between horizontal interneurons and pyramidal cells of rat hippocampus. *J. Neurosci.* 25:9162-9170
- Traub R. y Miles R. (1991) *Neuronal networks of the hippocampus*. 1th ed. New York, Cambridge University Press, Inc.
- Treves A. (2009) Spatial cognition, memory capacity, and the evolution of the mammalian hippocampal networks. En: Tommasi L., Peterson M. y Nadel L. ed. *"Cognitive biology: Evolutionary and developmental perspectives on mind, brain and behavior"*. 1st ed. MIT Press Books. 41-60.
- Trombley P. y Shepherd G. (1996) Differential modulation by zinc and copper of amino acid receptors from rat olfactory bulb neurons. *J. Neurophysiol.* 76:2536-2546.
- Ventura R. y Harris K. (1999) Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes. *J. Neurosci.* 19:6897-6907.
- Vervaeke K., Hu H., Graham L. and Storm J. (2006) Contrasting effects of the persistent Na^+ current on neuronal excitability and spike timing. *Neuron* 49:257-270.
- Virginio C., Church D., North R. y Surprenant A. (1997) Effects of divalent cations, protons and calmidazolium at the rat P2X7 receptor. *Neuropharmacology.* 36:1285-1294.
- Vlachova V., Zemkova H y Vyklicky L (1996) Copper modulation of NMDA responses in mouse and rat cultures hippocampal neurons. *European Journal of Neuroscience* 8: 2257-2264.

Waggoner D., Bartnikas T. y Gitlin J. (1999) The role of copper in neurodegenerative disease. *Neurobiol. Dis.* 6:221-230.

Wang W, Yu Y, Xu TL. (2007) Modulation of acid-sensing ion channels by Cu(2+) in cultured hypothalamic neurons of the rat. *Neuroscience.* 145(2):631-41.

Weiser T. y Wienrich M. (1996) The effects of copper ions on glutamate receptors in cultured rat cortical neurons. *Brain. Res.* 742:211-218.

Yu F. y Catterall W. (2003) Overview of the voltage gated sodium channel family. *Genome Biol.* 4:207.

X. MATERIAL SUPLEMENTARIO

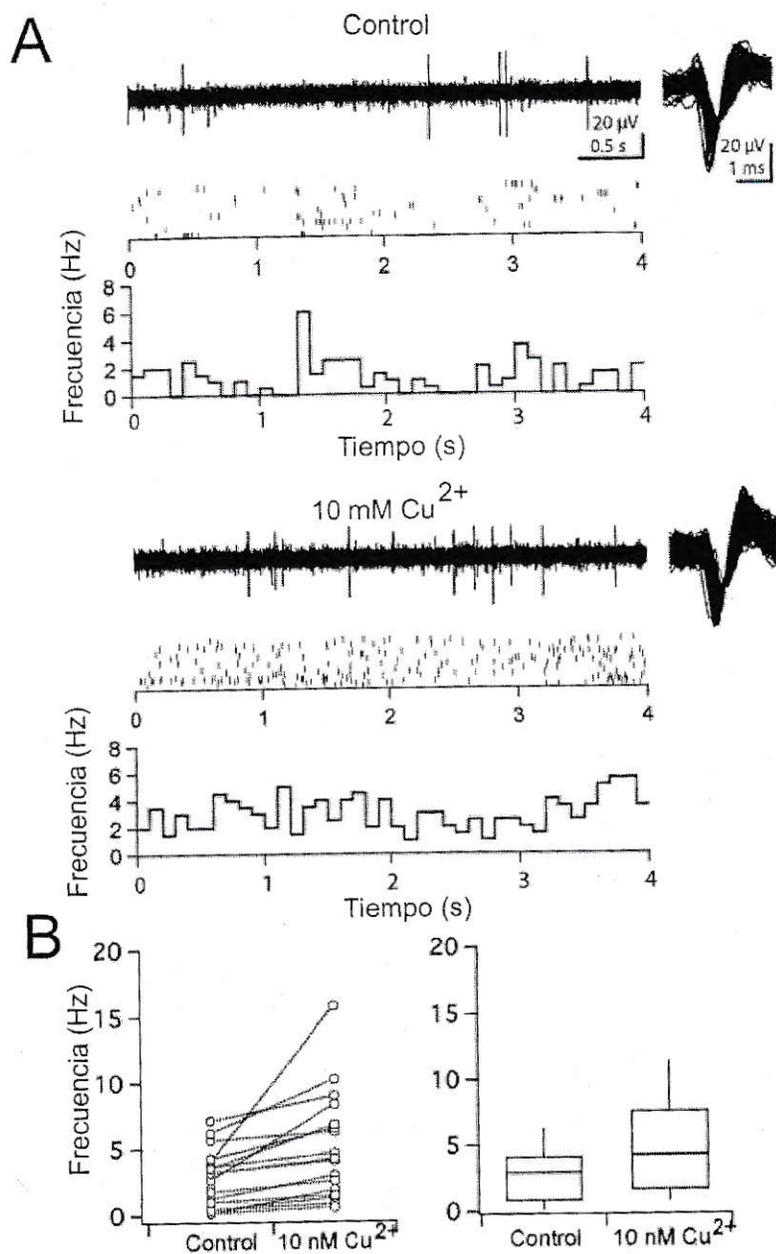


Figura S1. Cobre submicromolar aumenta la tasa de disparo de neuronas piramidales de CA1 en rebanadas transversales de hipocampo de rata. A)

Registro extracelular (con el electrodo puesto en el estratum piramidale) de CA1 que muestra el efecto del cobre sobre la tasa de disparos espontáneos. A la derecha de los registros se muestran de manera sobrepuesta las espigas registradas. Bajo el registro se muestra la actividad en forma de raster plot y más abajo se muestra la frecuencia de disparo. **B)** Aumento de la frecuencia de disparo de las neuronas piramidales en presencia de 10 nM de cobre en 17 rebanadas estudiadas (izquierda) que se traduce en un aumento desde $2,8 \pm 0,5$ Hz a $5,13 \pm 1,0$ Hz (derecha). Extraído de Maureira y col., 2010.