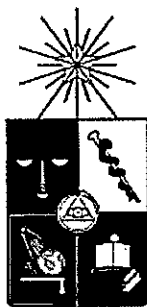


UCH-FC
MAG-B
E. 821
C. 1

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE



"DIFERENCIA EN LA MODULACIÓN POR COBRE
DE LA TASA DE DESCARGA DE POTENCIALES DE
ACCIÓN EN EL HIPOCAMPO DE RATAS DE 20 Y
60 DÍAS"

Tesis

Entregada a la

Universidad de Chile

en Cumplimiento Parcial de los Requisitos

Para Optar al Grado de

Magíster en Ciencias Biológicas

Facultad de Ciencias

Por

Daniel Andrés Estrada Scheihing

Julio, 2014

Director de Tesis: Dra. Cecilia Vergara

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

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

DANIEL ANDRÉS ESTRADA SCHEIHING

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como
requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias, en el
examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día el 28 de mayo de
2014.

Director de Tesis:

Dra.

C. Vergara M.
Cecilia Vergara



Comisión de Evaluación de la Tesis

Dra.

M. Sanhueza
Magdalanea Sanhueza

Dr.

R. Delgado
Ricardo Delgado

A Cata y Simón, porque ni se dan cuenta todo lo que me alientan

AGRADECIMIENTOS

A Cecilia Vergara por ser una excelente tutora con una capacidad empática de las que es difícil encontrar hoy en día. Muy humana y enfocada en entender los procesos de aprendizaje que pasan sus estudiantes. Además porque creo que financió este trabajo.

A Jorge Vera, por la mejor azuada de mi historia.

A Ricardo Delgado y Magdalena Sanhueza, por estar atentos al desarrollo del trabajo a pesar de ser parte de la comisión evaluadora.

A los "*Muebles*" por hacer de válvula y colchón emocional, por las palabras de aliento y haber compartido este proceso de formación.

A los estudiantes del Laboratorio de Fisiología Celular, por proveer apoyo y discusión durante el proceso.

A mis padres y hermanos, porque son una motivación moral incalculable y PORQUE LOS QUIERO.

I ÍNDICE

I.1 ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN BIOGRÁFICO	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
I. ÍNDICE	v
I.1 ÍNDICE DE CONTENIDOS	v
I.2 ÍNDICE DE TABLAS	ix
I.3 ÍNDICE DE FIGURAS	x
I.4 LISTA DE ABREVIATURAS	xi
II. RESUMEN	1
III. ABSTRACT	2
IV. INTRODUCCIÓN	3
IV.1 EL COBRE ES UN METAL TRAZA ESENCIAL PARA LA VIDA	3

IV.2 COBRE TIENE UN ROL EN ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS	4
IV.3 EVIDENCIAS DEL COBRE COMO POSIBLE MODULADOR DE LA ACTIVIDAD NEURONAL	5
IV.3.1 LIBERACIÓN DE COBRE SINÁPTICO	5
IV.3.2 CONDUCTANCIAS DE NEURONAS MODULADAS POR COBRE	6
IV.3.3 EFECTOS DE COBRE SOBRE UNA RED NEURAL	7
IV.4 DIFERENCIAS EN LA DISPONIBILIDAD DE COBRE CON LA EDAD	9
IV.5 HIPÓTESIS	9
IV.6 OBJETIVO GENERAL	9
IV.7 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
V. MATERIALES Y MÉTODOS	11
V.1 PREPARACIÓN DE REBANADA AGUDA DE HIPOCAMPO DE RATA	11
V.2 REGISTRO ELECTROFISIOLÓGICOS	13
V.3 ANÁLISIS DE LA TASA DE DESCARGA ESPONTÁNEA	15
VI RESULTADOS	17
VI.1 TASA DE DESCARGA BASAL EN CA1 DE RATAS DE 20 Y 60 DÍAS	17

VI.2 EFECTO DEL COBRE SOBRE LA TASA DE DESCARGA EN EL CA1 DE HIPOCAMPO DE RATAS DE DOS EDADES DISTINTAS	20
VI.2.1 CONTROL DE CAMBIO DE SOLUCIÓN	20
VI.2.2 VIABILIDAD DE LAS REBANADAS	24
VI.2.3 EFECTO DEL COBRE EN LA TASA DE DESCARGA DE POTENCIALES DE ACCIÓN ESPONTÁNEOS: BAJO COBRE	25
VI.2.4 EFECTO DEL COBRE EN LA TASA DE DESCARGA DE POTENCIALES DE ACCIÓN ESPONTÁNEOS: ALTO COBRE	29
VII. DISCUSIÓN	33
VII.1 CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LA PREPARACIÓN DE REBANADAS	33
VII.1.1 LA VIABILIDAD DE LA REBANADA	33
VII.1.2 PROXIMIDAD DEL ELECTRODO A LAS UNIDADES REGISTRADAS	34
VII.1.3 ESTADO HORMONAL PREVIO A LA CIRUGÍA	35
VII.1.4 RANGO DE LA TASA DE DESCARGA BASAL	35
VII.2 DESCARGA BASAL REDUCIDA EN EL GRUPO CONTROL DE CAMBIO DE RESERVORIO	36
VII.3 CONJETURAS SOBRE LA DISMINUCIÓN DE LA SENSIBILIDAD A COBRE CON LA EDAD	37

VII.3.1 PROPIEDADES INTRÍNSECAS MODULADAS POR COBRE	38
VII.3.2 PROPIEDADES SINÁPTICAS MODULADAS POR COBRE	38
VII.3.3 REDES NEURONALES MODULADAS POR COBRE	40
VII.3.4 SUPEROSICIÓN DE EFECTOS	40
VIII. CONCLUSIÓN	42
IX BIBLIOGRAFÍA	43

I.2 ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Parámetros de la tasa de descarga basal	19
Tabla 2: Resumen de parámetros del control cambio de solución	24
Tabla 3: Parámetros estadísticos del grupo experimental: CuCl_2 50 nM, en ratas de 20 y 60 días de edad	28
Tabla 4: Parámetros estadísticos del grupo experimental: CuCl_2 10 μM , en ratas de 20 y 60 días de edad	32

I.3 ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: red neural glutamatérgica del hipocampo	8
Figura 2: Trazo de registro representativo de la descarga basal en 20 y 60 días	18
Figura 3: Función de Probabilidad Acumulada para la tasa de descarga basal en rebanadas de ratas de 20 y 60 días	19
Figura 4: Trazo de registro representativo, control de cambio de solución en el CA1 de rata de 20 días	21
Figura 5: Trazo representativo, control de cambio de solución en el CA1 de rata de 60 días	22
Figura 6: Muestras pareadas y diagrama de cajas, control cambio de solución	23
Figura 7: Trazos de registro de rebanada tratada con KCl 7mM al tercer día de entrenamiento	25
Figura 8: Trazos de registro representativo, 20 días y 0,05 μ M de CuCl ₂ agregado	26
Figura 9: Trazos de registro representativo, 60 días y 0,05 μ M de CuCl ₂ agregado	27
Figura 10: Muestras pareadas y diagrama de cajas de la Tasa de descarga basal y con 0.05 μ M CuCl ₂ en el CA1 de rebanadas de hipocampo de rata de 20 y 60 días	28
Figura 11: Trazo de registro, 20 días y 10 μ M de CuCl ₂ agregado	30
Figura 12: Trazos de registro, 60 días y 10 μ M de CuCl ₂ agregado	31
Figura 13: Muestras pareadas y diagrama de cajas de la tasa de descarga basal y 10 μ M CuCl ₂ en rebanadas de rata de 20 y 60 días	32
Figura 14: Diagrama: efecto cualitativo de cobre a dos concentraciones y a dos edades	37

I.4 LISTA DE ABREVIATURAS

- ATOX1: Chaperona de cobre para las bombas ATPásicas
- ATP7A: ATPasa de cobre dependiente de protones, ATPasa de Menkes
- ATP7B: ATPasa de cobre dependiente de protones, ATPasa de Wilson
- BCS: Batocuproína sulfónica sódica
- CA1: Cornu Ammoni, región subhipocampal
- CA3: Cornu Ammoni, región subhipocampal
- CCO: Citocromo C oxidasa mitocondrial
- CCS: Chaperona de cobre para superóxido dismutasa de cobre/zinc
- COX17: Chaperona de cobre para citocromo C oxidasa mitocondrial
- CTR1: Transportador de cobre I
- DβH: Dopamina-β-hidrogenasa
- EC: Corteza entorrinal
- EC₅₀: Concentración que logra activar cierta enzima en un 50%
- GABA: Ácido γ-aminobutírico, neurotransmisor
- GABA_A-R: receptor ionotrópico (rápido) de ácido γ-aminobutírico
- GluN1: Tipo de subunidad del receptor de NMDA
- IC₅₀: Concentración que logra un 50% de inhibición de cierta enzima
- LDCV: Vesículas grandes de núcleo denso
- LPP: Via perforante, dominio lateral
- MPP: Via perforante, dominio medial
- NMDA: N-Metil-D-Aspartato, agonista
- NMDA-R: Receptor de NMDA
- PSD: Densidad postsináptica
- PrP^c: Proteína de priones celular
- RMS: Media cuadrática

SLM: Stratum lacunosum moleculare, capa subhipocampal

SO: Stratum oriens, capa subhipocampal

SOD1: Superóxido dismutasa de cobre y zinc

SOD3: Superóxido dismutasa de cobre extracelular

· SP: Stratum pyramidale, capa subhipocampal en que yacen los somas de las neuronas piramidales

SR: Stratum radiatum, capa subhipocampal en que se alinean las dendritas apicales

TREK-1: Canal de potasio de fuga

TASK-3: Canal de potasio de fuga

VGCC: Canal de calcio dependiente de potencial

II RESUMEN

Se ha propuesto al ion cobre como modulador endógeno de la actividad neuronal con base en las siguientes observaciones: el exceso y déficit del metal está relacionado a enfermedades neurodegenerativas, sus concentraciones en el cerebro son elevadas respecto al resto del organismo, existe la maquinaria bioquímica que acumula cobre en vesículas y evidencia de su liberación en terminales sinápticos dependiente de despolarización y calcio. Además, se ha reportado en diversos sistemas que el cobre modula canales de membrana y receptores ionotrópicos. Se ha visto que el cobre en concentraciones nanomolares afecta las propiedades intrínsecas de la neurona y aumenta su excitabilidad en un contexto de red neuronal.

Por otra parte, en rebanadas de hipocampo de ratas se ha detectado que el cobre débilmente ligado disminuye en algunas regiones entre los 20 y 60 días. También se ha observado que la expresión de la enzima que acumula cobre en vesículas disminuye con la edad.

En este trabajo quise establecer si la respuesta de la actividad neuronal frente al cobre agregado disminuye junto con la edad de la rata y la reducción del cobre disponible asociada. Para ello medí la tasa de descarga espontánea de potenciales de acción en la región CA1 de rebanadas agudas de hipocampo de ratas de 20 y 60 días, en ausencia y presencia de cobre. Observé que la distribución de las tasas de descargas basales no se ven afectadas por la edad del animal, que 0,05 μM de cobre induce disminución de la tasa de descarga en ratas de 60 y no en ratas de 20 días, mientras que 10 μM de cobre induce un aumento de la tasa de descarga en ratas de 20 y no en ratas de 60 días.

III ABSTRACT

Copper has been proposed as an endogenous neural activity modulator based on the following observations: excess and deficit of this metal is related to neurodegenerative diseases, brain concentration is relatively higher than the remaining organism, there exist a biochemical machinery that allows the production of copper-containing vesicles, and there's evidence of release of those vesicles in a calcium and depolarization-dependent way. Furthermore, it has been studied in diverse biological systems that copper modulate some membrane channels and ionotropic receptors. It has been seen that nanomolar copper concentration affects neuronal intrinsic properties and raise neuron excitability in a neural web context.

On the other hand, loosely bound copper has been detected in rat hippocampal slices, noticing that it decreases in some sub regions between 20 and 60 days. It has also been determined that the vesicle copper charging-enzyme decreases its expression with age.

In this work, I've tried to asses if there's a neuronal-activity copper response switch in neurons concomitant to the diminished copper levels through rat age. To asses this I've measured the spontaneous action potential rate in the CA1 region of hippocampal slices in copper absence and presence in 20 and 60 days old rats. I've observed that basal rate distribution wasn't affected by age reduction of available copper, that 0.05 μM added copper decreased the rate at 60 but not at 20 days, while 10 μM augmented the rates at 20 but not at 60 days old rats.

IV INTRODUCCIÓN

IV.1 EL COBRE ES UN METAL TRAZA ESENCIAL PARA LA VIDA

El ion cobre transita fácilmente de su estado oxidado (Cu^{2+}) al estado reducido (Cu^+) y participa en muchos procesos en los organismos aeróbicos, tales como la respiración celular mitocondrial y la protección frente a radicales libres. Varias enzimas como la citocromo C oxidasa (CCO) y la superóxido dismutasa de cobre-zinc (SOD1) contienen cobre en su núcleo reactivo. En algunos tipos celulares de mamíferos el cobre conforma un grupo prostético, como en la dopamina β -monooxigenasa (D β H) que participa en la vía sintética del neurotransmisor norepinefrina (Lutsenko y cols., 2010).

Dada su extrema reactividad, el cobre, y también el hierro, catalizan la producción del radical superóxido a partir del peróxido de hidrógeno (Uriu-Adams y Keen, 2005), este producto daña agresivamente a las proteínas, membranas y ácidos nucleicos. Esto impuso una fuerte presión selectiva sobre la evolución de mecanismos reguladores de las concentraciones de cobre y hierro, en particular, en los niveles de concentración traza del cobre. A nivel de organismo, el cobre se absorbe desde la dieta y se distribuye a través de la sangre, conjugado en proteínas como la ceruloplasmina. El exceso plasmático de cobre se incorpora en las células hepáticas y se secreta al intestino junto a las sales biliares (Zatta y Frank, 2007).

A nivel celular, la regulación de cobre ocurre en una red de incorporación, conjugación, transporte y excreción imbricada. Componentes de esta red son el transportador de cobre CTR1, las metalotioneínas que son péptidos que se conjugan débilmente a los metales y las metalo-chaperonas de las que menciono tres: chaperona de cobre para la SOD1 (CCS), chaperona de cobre para la CCO (COX17) y atox1, que actúa como sensor de la concentración de cobre intracelular y que dirige al cobre hacia una bomba de cobre dependiente de ATP (ATP7A o ATP7B, dependiendo del tipo celular), la cual se ubica en la membrana de vesículas de la vía exocítica. En el lumen de estas vesículas residen otras cuproenzimas como SOD3, que es una superóxido dismutasa extracelular, peptidilglicil α -aminomonooxigenasa y D β H, ambas en la vía sintética de derivados de la tirosina (Lutsenko y cols., 2010). El cobre se transporta en un gradiente de afinidad creciente, desde que es incorporado a la célula por CTR1, hasta las cuproenzimas finales (Banci y cols., 2010). Esto revela los delicados mecanismos involucrados en la homeostasis del cobre.

De manera funcional, distinguiré entre dos tipos de cobre intracelular, el que está fuertemente unido a las cuproenzimas y el que está débilmente ligado a las metalotioneínas y metalo-chaperonas.

IV.2 COBRE TIENE UN ROL EN ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

De acuerdo a lo descrito, todas las células de mamíferos contienen cobre, pero por sobre este cobre basal, algunos órganos como el hígado, cerebro y riñones contienen concentraciones mucho más altas de este ion. En las distintas regiones del cerebro la cantidad de cobre total es heterogénea, cerebelo, hipocampo y bulbo olfatorio tienen relativamente más cobre que otras regiones y esta cantidad varía con el desarrollo (Tarohda y cols., 2004). Además, la pérdida de la homeostasis del cobre intracelular produce en humanos enfermedades con síntomas de alteraciones neurológicas.

La disfunción de la ATPasa de cobre ATP7B, que se expresa en la cara apical del epitelio de la vesícula biliar, impide la correcta secreción del cobre hacia las sales biliares, la que normalmente se

vacía en el intestino y finalmente se excreta. A causa de esto el cobre se acumula sistémicamente, particularmente en el hígado, cerebro y riñones. Al mismo tiempo aparecen síntomas parkinsonianos y retardo mental. Esta condición se llama enfermedad de Wilson

En la enfermedad de Menkes, la ATP7A, que normalmente se moviliza hacia la membrana basolateral de los enterocitos, es disfuncional, lo que reduce la absorción del cobre desde el intestino al plasma sanguíneo. Esto se traduce en una escasez de cobre en todo el organismo y los afectados mueren por daño neurodegenerativo en el periodo perinatal (Kaler, 2011).

IV.3 EVIDENCIAS DEL COBRE COMO POSIBLE MODULADOR DE LA ACTIVIDAD NEURONAL

Los niveles elevados de cobre en regiones del cerebro, sumado a las enfermedades neurodegenerativas relacionadas con la desregulación de la disponibilidad del cobre, sugieren que este metal podría ser un modulador endógeno de la actividad eléctrica del cerebro. Otras evidencias que apoyan esta hipótesis son:

IV.3.1 LIBERACIÓN DE COBRE SINÁPTICO

Hartter y Barnea (1988) y Kardos y cols. (1989) observaron un fenómeno con características de liberación sináptica de cobre. En ambos trabajos usaron cobre radiomarcado (^{67}Cu) que fué pre incubado en terminales sinápticos de hipotálamo y corteza neuronal, respectivamente y estimularon la despolarización de la membrana con aumentos de la concentración de potasio (KCl 60 y 50 mM, respectivamente).

Hopt y cols. (2003) estimaron que el cobre liberado en el espacio inter sináptico alcanza concentraciones del orden 15 μM . Para ello sintetizaron una molécula que emite fluorescencia en función de la concentración de Cu^{+2} y la utilizaron para medir liberación de cobre débilmente ligado

en una preparación de sinaptosomas de hipocampo de ratón expuesta a un pulso de potasio extracelular.

Usando inmunocitoquímica, Schlieff y cols. (2005) infirieron la existencia de vesículas con contenido de cobre débilmente ligado susceptible de ser liberado por la estimulación con glutamato, a partir de la ubicación sub-celular de la ATP7A en cultivo de rebanada de hipocampo de ratón. Observaron que relocaliza desde la red trans Golgi hacia regiones perinucleares en función de la activación del receptor de N-metil-D-Aspartato (NMDA), uno de los dos receptores ionotrópicos de la sinapsis glutamatérgica del hipocampo. Esta liberación ocurriría alrededor del soma de las neuronas.

IV.3.2 CONDUCTANCIAS DE NEURONAS MODULADAS POR COBRE

Cobre inhibe al 50% de los canales de calcio dependientes de potencial (VGCC) con una concentración (IC_{50}) de $0,92 \mu\text{M}$ en células disociadas de corteza piriforme (Castelli y cols. 2003)

Se ha reportado que canales de potasio de fuga que son modulados por cobre: el canal TREK-1 es activado en un 83% con una EC_{50} de $3,0 \mu\text{M}$ y el canal TASK-3 es casi completamente inhibido con una IC_{50} de $2,7 \mu\text{M}$ (Gruss y cols., 2004).

Adicionalmente se ha mostrado que el cobre afecta receptores ionotrópicos en neuronas. Entre ellos hay evidencia de que los receptores inotrópicos de ácido γ -aminobutírico (GABA, $GABA_A$ -R) de neuronas disociadas de cerebelo son inhibidos en un 68% con una IC_{50} de $0,035 \mu\text{M}$ (Sharonova y cols., 1998). También los receptores de glutamato tipo ácido α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol propiónico (AMPA, AMPA-R) (Weiser & Wienrich, 1996) y tipo NMDA-R (Vlachová y cols., 1996) son inhibidos con IC_{50} de $4,03 \mu\text{M}$ (observado en cultivo de neuronas corticales disociadas de rata) y $0,27 \mu\text{M}$ (observado en cultivo de neuronas hipocampales disociadas de rata), respectivamente.

En el Laboratorio de Fisiología Celular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile se estudia la hipótesis que propone que el cobre es un modulador endógeno de la actividad neuronal. Una de las primeras aproximaciones usadas ha sido estudiar la tasa de descarga de potenciales de acción espontáneos en epitelio olfatorio de *Caudiververa caudiververa* (Aedo y cols., 2007). En un epitelio sensorial carente de sinapsis, los únicos blancos moleculares del cobre posibles son los canales iónicos de sodio, de calcio y de potasio dependientes de potencial y/o de calcio. Los resultados muestran que el cobre en el rango nanomolar aumenta la tasa de disparo de potenciales de acción y en el rango micromolar disminuye la frecuencia de disparo. Comparando la cinética de las corrientes de sodio en registros de célula única y bloqueando los canales de potasio con cesio se determinó que el canal de sodio dependiente de potencial es responsable del aumento de la frecuencia de potenciales de acción.

IV.3.3 EFECTOS DE COBRE SOBRE UNA RED NEURAL

Si el cobre fuera un modulador endógeno de la actividad neuronal sería interesante dilucidar si, además de incidir en las propiedades de excitabilidad de membrana, pudiera modular las sinapsis dentro de una red neuronal. Un modelo de red neuronal clásico es la rebanada de hipocampo, que es una región del cerebro de mamíferos involucrado en la formación de memoria y la ubicación espacial. Un diagrama simplificado de la red neuronal se presenta en la Fig. 1

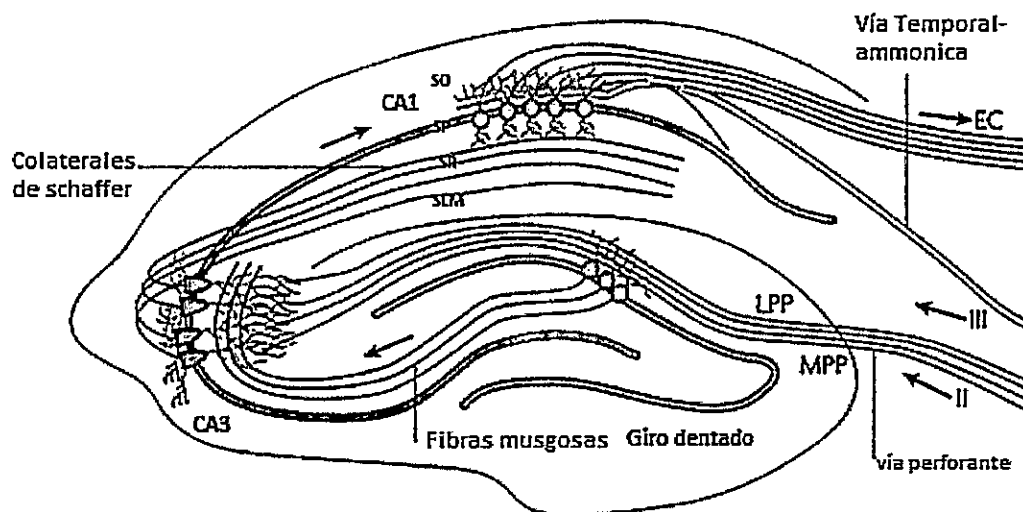


Figura 1: Red neural glutamatérgica del hipocampo (modificado de Deng y cols., 2010). La mayor cantidad de entradas sinápticas al hipocampo provienen de la capa II de la corteza entorrinal (EC) a través de la vía perforante (LPP y MPP). Las células granulares del giro dentado reciben estas sinapsis y proyectan sus axones (fibras musgosas) a las neuronas piramidales de la región CA3. A su vez, las piramidales del CA3 proyectan un axón colateral (colaterales de Schaffer) de vuelta a la corteza entorrinal y hacia las neuronas piramidales del CA1, esta sinapsis es glutamatérgica y excitatoria. La organización de las regiones CA3 y CA1 está referida a la morfología de las neuronas piramidales y se distinguen 4 capas: *stratum lacunosum moleculare* (SLM), *stratum radiatum* (SR), *stratum pyramidale* (SP) y *stratum oriens* (SO). Los somas de las neuronas piramidales yacen en el SP y reciben principalmente sinapsis inhibitorias. Las dendritas apicales se alinean en el SR y tienen una baja densidad de espinas dendríticas. La región más distal de la dendrita apical se denomina “dendrite apical tuft”, define la capa SLM y posee una alta densidad de espinas dendríticas. Las dendritas basales se ordenan en el SO, en esta capa también existen sinapsis axo-axónicas inhibitorias (Megías y cols., 2001).

Al CA1 confluyen axones desde CA3, la corteza entorrinal, el tálamo y la amígdala, además de una quincena de tipos de interneuronas locales involucradas en la modulación del rol integrador de las neuronas piramidales. Uno de los mecanismos de modulación que se ha descrito es el “feed-forward inhibitorio”, en que las interneuronas llamadas “Oriens-Lacunosum Moleculare” reciben entradas sinápticas del CA3 e inhiben por activación del receptor de GABA a la célula piramidal en el *stratum oriens* (Klausberger y Somogyi, 2008).

Usando el modelo de rebanada aguda de hipocampo, que conserva buena parte de las vías sinápticas locales del hipocampo, se ha observado que ocurre un aumento en la frecuencia de disparo de potenciales de acción espontáneos al agregar cobre nanomolar ($0,01 \mu\text{M}$) al baño (Maureira y Cols. en revisión para publicación).

IV.4 DIFERENCIAS EN LA DISPONIBILIDAD DE COBRE CON LA EDAD

Los niveles de expresión de la ATP7A en hipocampo de ratón alcanzan un máximo en el cuarto día postnatal y desde ese estado la expresión disminuye (Niciu y cols., 2006).

Se estudió los niveles de cobre en distintas subregiones del hipocampo de rata, utilizando una tinción, que permite detectar cobre débilmente ligado, se encontró que la marca de cobre es más intensa en el *stratum pyramidale* de la región CA1 en ratas de 20 días postnatal que en ratas de 60 días (Díaz, M.J., comunicación personal).

En resumen, existe evidencia que sugiere que el cobre modula la excitabilidad neuronal en un contexto de red, sin embargo, sus efectos se han estudiado principalmente en modelos de expresión heteróloga y en cultivos de células disociadas de distintas regiones cerebrales. Se ha estudiado con menos frecuencia en rebanadas aguda de hipocampo, y en general, usando animales jóvenes.

A raíz de que la cantidad de cobre débilmente ligado en el *stratum pyramidale* del CA1 de hipocampo de rata disminuye y que se ha observado que la adición de cobre en concentraciones nanomolares aumenta la tasa de descarga de potenciales de acción espontáneos en el CA1 de hipocampo de ratas de 20 días, planteo la siguiente hipótesis:

IV.5 HIPÓTESIS

El aumento de la tasa de disparo de potenciales de acción inducido por cobre exógeno que ocurre en ratas de 20 días es mayor que el aumento de la tasa de disparo inducido por cobre exógeno en ratas de 60 días.

IV.6 OBJETIVO GENERAL

Establecer si existe diferencia en la modulación de la excitabilidad por cobre en el modelo “actividad espontánea en rebanada aguda de hipocampo de rata” entre ratas de 20 y 60 días postnatal.

IV.7 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a.- Caracterizar la tasa de descarga de potenciales de acción espontáneos en CA1 de ratas de 60 días. Compararlo con la tasa de descarga en rebanada de ratas de 20 días.

b.- Estudiar y comparar la respuesta a cobre en la tasa de descarga de potenciales de acción espontáneos en rebanadas de hipocampo obtenidas de ratas de 20 y 60 días postnatal.

V MATERIALES Y MÉTODOS

V.1 PREPARACIÓN DE REBANADA AGUDA DE HIPOCAMPO DE RATA

En esta investigación se usaron ratas Sprague-Dawley macho, divididas en dos grupos: de 18 a 23 días y de 60 a 72 días de edad. Los animales fueron obtenidos del vivero de la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Católica de Chile y mantenidas en las instalaciones de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile en un ciclo de luz y oscuridad de 12 horas y comida y agua *ad libitum*. Los procedimientos con animales han sido autorizados por la Comisión de Ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

Las rebanadas de hipocampo se obtienen usando el procedimiento descrito a continuación:

Todos los elementos quirúrgicos son enfriados previamente en una bandeja con hielo. La rata es anestesiada en una cámara con éter hasta la pérdida del tono muscular usando como criterio la cola flácida. Se sacrifica la rata por decapitación con una tijera quirúrgica. Con una segunda tijera se desuella la cabeza, desde posterior hasta la nariz y se realizan cortes diagonales del cráneo desde el remanente de espina dorsal. Usando una tijera delgada se expone el cerebro cortando a través del septum medial del cráneo. Usando una pinza de punta curva se desprende el cerebro del cráneo y se levanta el hueso parietal, primero el izquierdo, luego el derecho, trizando la fusión con el hueso frontal. Se extrae el cerebro con una espátula de bordes suavizados, separando los nervios faciales

(el bulbo olfatorio suele quedar en el cráneo). Se enfría el cerebro en un vaso precipitado de 150 ml que contiene 125 ml de solución de disección burbujeada con oxígeno/dióxido de carbono (O_2/CO_2) 95%/5%, cuya composición en mM es: sacarosa 206; bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$) 25; glucosa 10; cloruro de potasio (KCl) 2,5; sulfato de Magnesio ($MgSO_4$) 2; fosfato ácido de sodio (NaH_2PO_4) 1,25; cloruro de calcio ($CaCl_2$) 1; cloruro de magnesio ($MgCl_2$) 1, el pH de la solución se ajusta a 7,4 al ser burbujeado con esa concentración de CO_2 . Esta solución fue enfriada previamente por aproximadamente 25 min a $-20^\circ C$, quedando en una mezcla de agua-aguanieve. El tiempo ideal que toma esta operación es de 2 min. El cerebro permanece en esta solución durante un minuto, protegido del burbujeo con una cuchara plástica. Luego se traslada con la misma cuchara a una placa Petri de 35 mm de diámetro con un cuadrado de papel filtro en el fondo. Mediante un cuchillo de rebanador se realizan 4 cortes: corte coronal apartando la corteza anterior, usando como referencia una vena característica sobre el lóbulo temporal, dos cortes sagitales en el sentido septo-temporal, con un ángulo de 50° , atravesando la intersección del eje medial y el límite del cerebro con el cerebelo, primero hacia temporal izquierdo, luego hacia temporal derecho, el último corte es sagital-medial. Se manipula el cerebro con ayuda de un pincel.

Luego, el cerebro se cubre con solución de disección fría mientras se agrega el pegamento en la platina del vibrátomo. La cantidad de cianoacrilato debe ser suficiente para mantener el seso en el sitio y que no exceda el área porque se pega a la hoja del vibrátomo.

Se trasladan los hemisferios con una espátula modificada en forma de pala. Se seca la base de la pala en papel absorbente y se fijan a la platina de un vibrátomo usando cianoacrilato, orientados con el corte septo-temporal como base y el lado dorsal hacia el filo de la hoja de cortar. Luego se cubre la platina con solución de disección. El vibrátomo opera a máxima amplitud de vibración y velocidad de avance, la hoja en ángulo de 25° , se descartan la primera y segunda rebanada, luego se reduce la velocidad de avance de la hoja a un 75%. Cada corte tiene $400 \mu m$ de grosor, y es trasladado con una pipeta Pasteur de vidrio modificada a la placa Petri. Se secciona la región

cortical, ventral y medial de cada rebanada usando media hoja y una aguja hipodérmica desechable calibre 18 y luego se transfieren a una cámara de inmersión construida con anillos de tubo Falcon de 10 ml y malla de nylon. Las 8 rebanadas obtenidas permanecen en esa cámara al menos una hora en solución de registro equilibrado con mezcla oxígeno/dióxido de carbono. La composición de la solución de registro en mM es cloruro de sodio (NaCl) 124; NaHCO₃ 25; glucosa 10; KCl 2,5; CaCl₂ 2; MgSO₄ 2; NaH₂PO₄ 1,25. Los reactivos provienen de Merck y son de grado analítico.

V.2 REGISTRO ELECTROFISIOLÓGICO

Se traslada la rebanada a una cámara de registro de 0,5 ml de volumen, perfundida a 2 ml/min aproximadamente, usando una bomba de flujo peristáltico (Masterflex C/L Cole/Palmer) con solución de registro. Se entibia la solución usando una fuente de poder con corriente ajustable que calienta una resistencia de potencia de 50 k Ω adosada a la manguera de perfusión. Se mide la temperatura en el centro del baño con un termómetro digital al inicio y al final de cada registro, manteniéndola cercana a 35.0°C. Se asegura la rebanada con un alambre de acero inoxidable doblado en forma de rombo y cruzado por fibras de nylon.

Usando una lupa Leitz Wetzlar a 4x de aumento y una lámpara de luz fría se ubica la región CA1 de la rebanada y se coloca la punta de un electrodo de carbaloy de impedancia 0,3 M Ω sobre el stratum pyramidale en la región CA1 cercana al subiculum del hipocampo. Se inserta el electrodo mediante un manipulador manual con dos ejes horizontales y un eje vertical con ángulo de 35° aproximadamente. Se entierra la punta del electrodo unos pocos micrómetros dentro de la rebanada, ya que las unidades neuronales superficiales pueden estar dañadas. Como referencia, la punta del electrodo no alcanza a desaparecer del foco de la lupa. El circuito eléctrico se cierra con un electrodo de tierra de plata-cloruro de plata.

Ambos electrodos están conectados al cabezal de un amplificador operacional (A-M Systems, modelo 1800) que amplifica la señal diez mil veces y la filtra entre 300 y 1000 Hz. La señal de



salida es bifurcada a un osciloscopio que permite su visualización (Goldstar Oscilloscope OS-5020P) y a un convertidor análogo-digital (Digidata 1200). Se adquiere la señal usando el software Fetchex 6.0 (de la serie p-Clamp 6.0, Molecular Devices, LLC) en la modalidad "Gap-Free", tomando registros continuos de 10 minutos, a 5 kHz de frecuencia de muestreo y 10^{12} unidades digitales ("bits") del rango de la señal amplificada, entre -10 y + 10 mV.

Para disminuir el ruido estático del "set-up" todos los elementos de éste a excepción de la fuente de poder del calefactor, la lámpara de luz fría y la bomba de flujo peristáltico se conectan a una pieza de cobre mediante cables de tierra y ésta se conecta a la tierra del amplificador. El elemento que causa el mayor ruido es el flujo de solución a través de las mangueras de perfusión, para eliminarlo, se hace tierra con un conector tipo caimán en contacto con dos agujas de jeringa sin punta, por donde fluye la solución de registro desde y hacia la cámara. La segunda mayor fuente de ruido es la pantalla del computador que se apaga durante el registro.

Se registran 10 ó 20 minutos de actividad basal; Condición "Basal" y luego 20 minutos de la actividad mientras la cámara es perfundida con solución de registro más una de las siguientes concentraciones de cloruro de cobre (CuCl_2): 0 μM ; Condición "control de cambio de solución"; 0,05 μM Condición "Bajo Cobre"; 0,5 μM ; 5 μM y 10 μM Condición "Alto cobre". Dependiendo de la actividad y de la salud de la rebanada se continuó el registro por 20 minutos más a una concentración de 50 μM de CuCl_2 , o se finalizó el registro con 10 minutos de lavado con solución sin cobre añadido.

La solución de cobre se prepara en el momento con una alícuota seca de 0,0170g de CuCl_2 (peso molecular: 170.01g/mol) y 0,5 ml de agua bidestilada en un tubo Eppendorf. Las concentraciones de cobre necesarias se obtienen por dilución seriada.

V.3 ANÁLISIS DE LA TASA DE DESCARGA ESPONTÁNEA

Se detectan los potenciales de acción espontáneos con el software de análisis Igor Pro 6.11 (Wavemetrics, Inc.) y el paquete de rutinas Neuromatic desarrollado por Thinkrandom, usando la modalidad de detección de eventos sobre un umbral de menos 4 veces la media cuadrática ("Root Mean Square", RMS) en un segmento del registro sin eventos distinguibles, esta es una medida estadística del ruido eléctrico del registro. Se automatiza el análisis usando el lenguaje de programación de Igor Pro.

Si el registro cuenta con una basal de 20 minutos, se calcula la tasa de descarga basal como el número de eventos en 15 minutos, desde el minuto 5 al 20, considerando que al inicio del registro la rebanada se estabiliza luego de introducir el electrodo. En una serie de registros con 10 minutos de basal, se calcula la tasa de descarga en los últimos 8 minutos, es decir del minuto 2 al 10.

La tasa de descarga durante el tratamiento se calcula en los últimos 15 minutos en que la rebanada es perfundida con solución de registro adicionada de CuCl_2 para asegurar que la concentración de cobre en la cámara de registro esté equilibrada con aquella en el reservorio de perfusión.

Los cambios en la tasa de descarga de potenciales de acción entre cada par basal-tratamiento se estimaron usando la prueba de Wilcoxon el cual evalúa la hipótesis de trabajo "diferencia entre las medianas de dos muestras pareadas" contra la hipótesis nula "igualdad de medianas de dos muestras pareadas". De esta forma, cuando el valor de P resulta menor que 0,05, se rechaza que la distribución de la tasa de descarga permanezca invariable, es decir, se acepta que hay diferencia significativa. En caso que el valor de P sea mayor que 0,05, no se puede rechazar homogeneidad de las dos distribuciones, ya sea porque el efecto es numéricamente pequeño, porque el número de repeticiones es insuficiente, o porque efectivamente no hay efecto.

También se estudió si las tasas de descarga basales registradas en rebanadas de ratas de 60 días se distribuyen de forma similar a las registradas en rebanadas de ratas de 20 días. En este caso se usa la prueba de Mann-Whitney, que es una prueba estadística no paramétrica para muestras no pareadas cuya hipótesis de trabajo es “diferencia de medianas entre las dos distribuciones” y la hipótesis nula es “igualdad de medianas entre las dos distribuciones”. Si el valor de P es menor que el valor crítico: 0,05, entonces se rechaza la hipótesis nula y se acepta que las distribuciones son diferentes. Si el valor de P es mayor que 0,05, no se puede rechazar que la distribución de las medianas sea homogénea.

Se informan los valores de promedio y error estándar para cada tratamiento en cada grupo experimental.

VI RESULTADOS

VI.1 TASA DE DESCARGA BASAL EN CA1 DE RATAS DE 20 Y 60 DÍAS

Dado que, aparentemente, la cantidad de cobre débilmente ligado en la región CA1 del hipocampo disminuye entre los 20 y los 60 días, es interesante comparar las tasas de descarga de potenciales de acción espontáneos de esta región en esas dos edades. Además es necesaria esta caracterización para poder, posteriormente, comparar los efectos de cobre adicionado. Para ello agrupé las tasas de descargas basales, es decir, las señales durante los 10 ó 20 minutos previos a la aplicación de cobre exógeno, de todas las rebanadas registradas y estudié las tasas de descargas en ese intervalo en las dos edades. En la Fig. 2 muestro dos trazos representativos de descarga basal para cada edad.

Ya que las frecuencias promedio carecen de distribución normal (Test de Jarque-Bera, valor crítico: 5,99, valor estimado: 4,62 y 4,22 para 20 días y 60 días respectivamente), para comparar las tasas de descarga entre las dos edades usé una prueba estadística no pareada, no paramétrica (prueba de Mann-Whitney). Una forma visual de representar esta prueba es el gráfico "función de probabilidad acumulada", Fig. 3, en que superpongo la distribución de descargas basales para ambas edades.

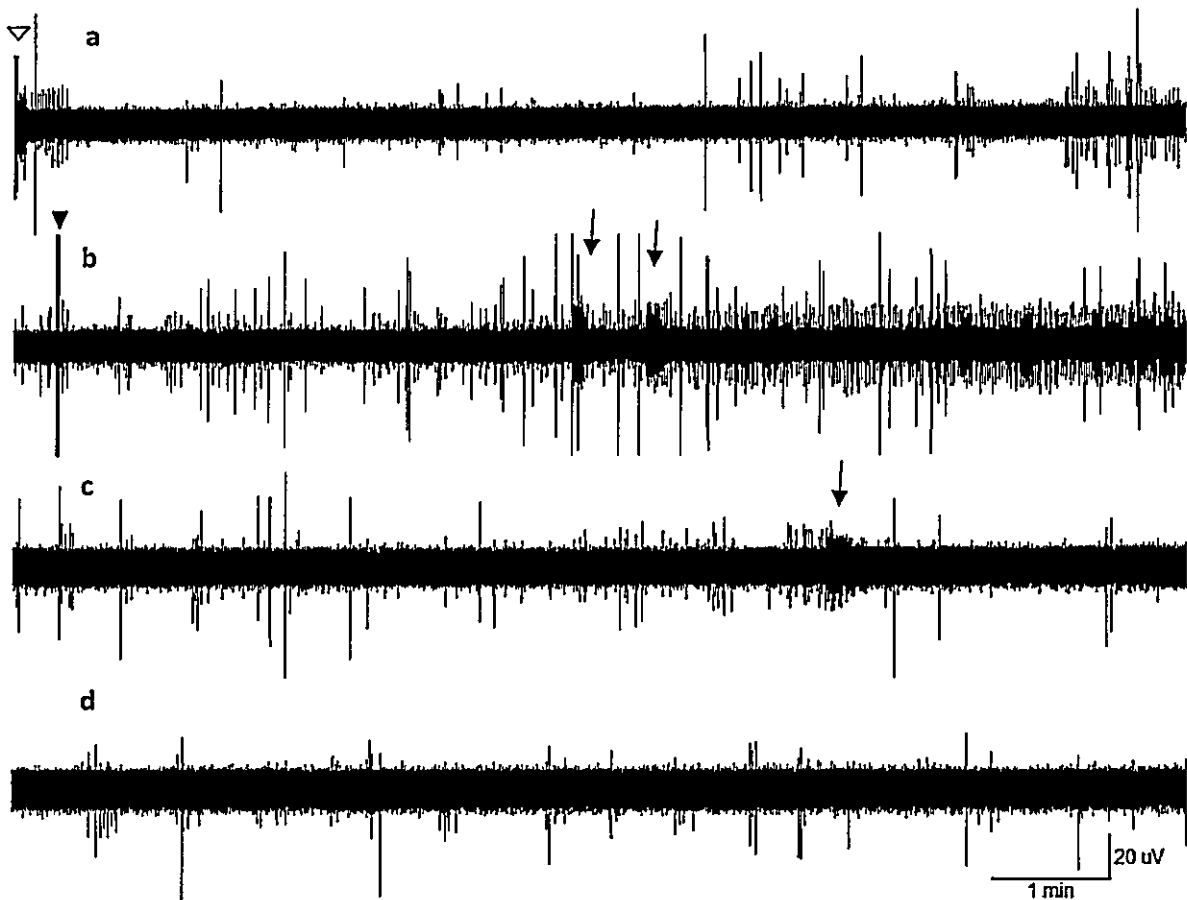


Figura 2: Trazo de registro representativo de la descarga basal en 20 y 60 días. Cada trazo tiene una duración de 10 minutos y va de -50 a $+50 \mu\text{V}$ de amplitud. Los trazos a y b son el registro de una rebanada obtenida de una rata de 20 días de edad, desde el minuto 0, cuando coloqué el electrodo de registro, al minuto 20. Los trazos c y d son los primeros 20 minutos de registro obtenido de una rebanada de rata de 60 días de edad. Los potenciales de acción, provenientes de distintas unidades neuronales captadas por el electrodo de registro, fueron caracterizados por una fase negativa seguida de una positiva, y se diferenciaron por la amplitud del evento. La cabeza de flecha vacía, en a, señala la ráfaga inicial que corresponde a la inserción del electrodo. Las flechas en b y c señalan ráfagas espontáneas de actividad que son frecuentes de encontrar entre mis registros. La cabeza de flecha rellena, en b, señala uno de los eventos cuya amplitud fue truncada en pos de la comparación entre distintos trazos. A lo largo de los trazos en a y b se observa un aumento en la frecuencia de eventos que es característico de algunos de mis resultados y forma parte de la variabilidad posible de observar en un intervalo prolongado de registro.

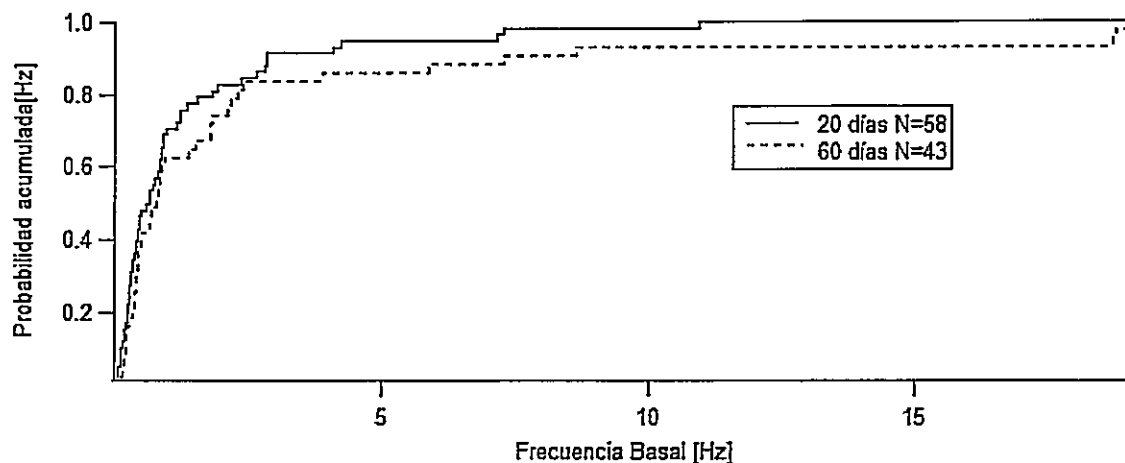


Figura 3: Función de probabilidad acumulada para la tasa de descarga basal en CA1 de ratas de 20 y 60 días. Como se puede observar por la forma de la curva, no hay distribución normal de las descargas basales. Además, ambas distribuciones se superponen. Esto se corrobora con la prueba de Mann-Whitney, cuyo valor de p es 0,10 y se rechaza que las distribuciones sean diferentes, es decir, tienen distribución similar.

Finalmente, como parte de la caracterización de las descargas basales de 20 y 60 días, resumo el valor promedio y otros parámetros de distribución en la Tabla 1.

Tabla 1: Parámetros de la tasa de descarga basal.

	Ratas 20 días	Ratas 60 días
Tasa de descarga basal	$1,31 \pm 0,26$ Hz	$2,61 \pm 0,74$ Hz
Mediana	0,63 Hz	0,78 Hz
1 ^{er} y 3 ^{er} cuartil	0,28 y 1,27 Hz	0,40 y 2,10 Hz
Rango	0,06 y 10,95 Hz	0,13 y 19,06 Hz
Número de rebanadas	57	43

VI.2 EFECTO DEL COBRE SOBRE LA TASA DE DESCARGA EN EL CA1 DE HIPOCAMPO DE RATAS DE DOS EDADES DISTINTAS

VI.2.1 CONTROL DE CAMBIO DE SOLUCIÓN

Previo a mostrar los registros con cobre exógeno, describiré este grupo experimental cuyo propósito es descartar que la manipulación de las soluciones incida en la tasa de descarga de potenciales de acción. Para ello, medí la actividad espontánea con solución de registro y luego de 20 minutos cambié a otro reservorio que contuvo una solución proveniente del mismo origen. Esto lo hice para animales de ambas edades. Presento un registro representativo del grupo experimental para cada edad en las Fig. 3 y Fig. 4.

Para analizar si la manipulación incide en la tasa de disparo, repetí este experimento e hice una prueba pareada dentro de los grupos de 20 y 60 días. Ilustro este resultado con el gráfico de muestras pareadas y diagrama de cajas de la Fig. 6.

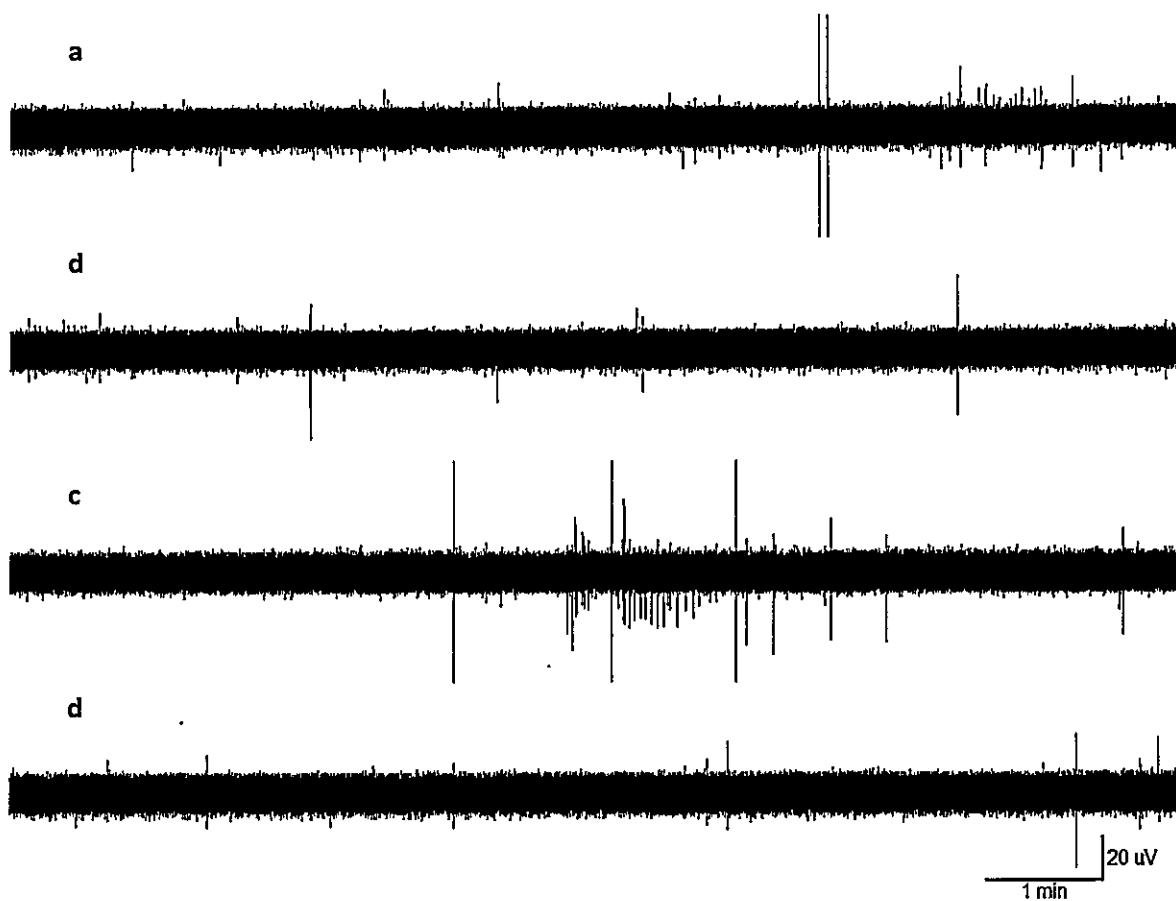


Figura 4: Trazo representativo, control de cambio de solución en el CA1 de rata de 20 días. Los trazos **a** y **b** son 10 minutos consecutivos de la descarga basal de un registro en el CA1 de hipocampo de rata de 20 días. La tasa de descarga es aparentemente baja y con eventos de mediana amplitud. Los trazos **c** y **d** corresponden a la misma rebanada una vez efectuado el cambio de solución.

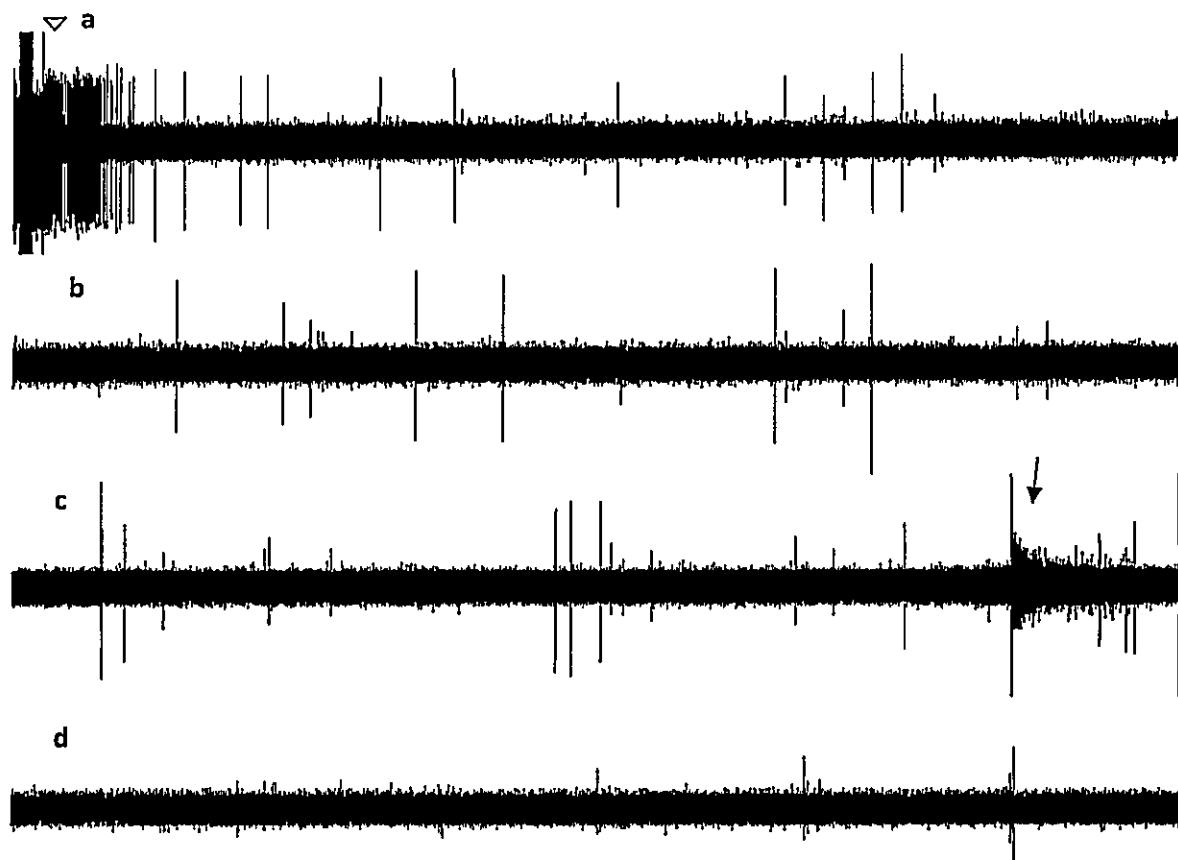


Figura 5: Trazo representativo, control de cambio de solución en el CA1 de rata de 60 días. Los trazos a y b son los primeros 20 minutos de registro de una rebanada obtenida de una rata de 60 días, los trazos c y d son los siguientes 20 minutos luego del cambio de reservorio de solución. El trazo a presenta una ráfaga inicial correspondiente a la inserción del electrodo (cabeza de flecha vacía). Señalo con una flecha un evento de ráfaga de origen espontáneo en el trazo c.



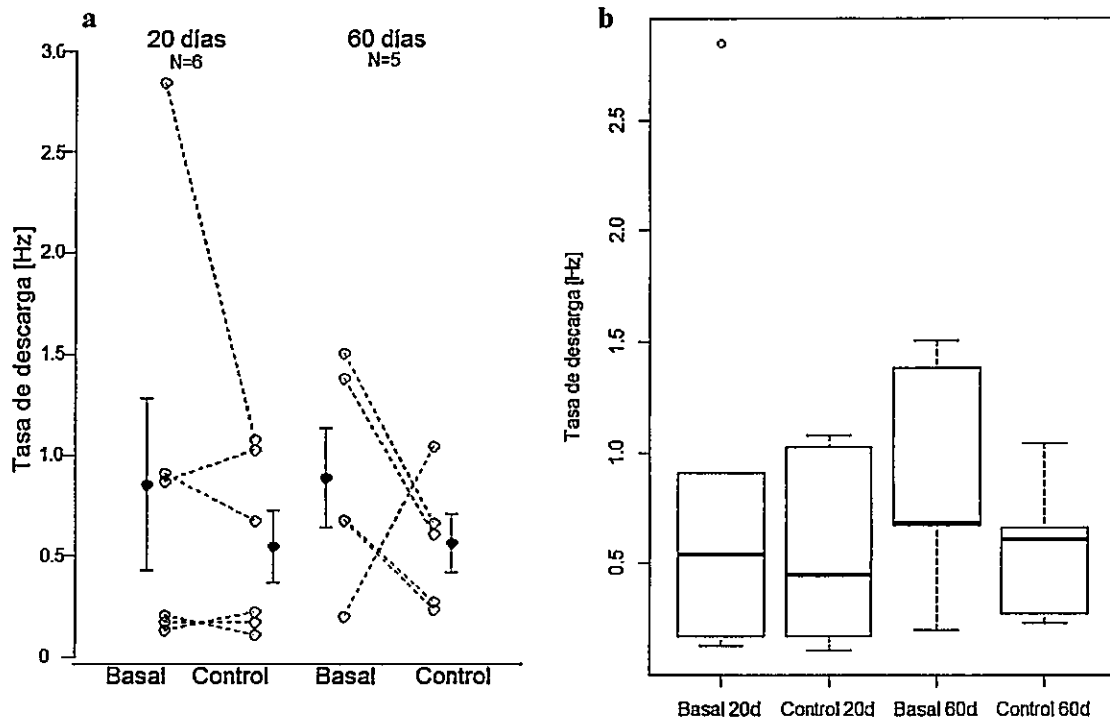


Figura 6: Muestras pareadas y diagrama de cajas, control cambio de solución. En a cada par de círculos vacíos representa la actividad promedio de una rebanada. Se observa que hay rebanadas en que la frecuencia aumenta, otras en que disminuye y otras en que se mantiene sin cambios aparente. El par de círculos rellenos es el promedio de la tasa de descarga y las barras de error representan el error estándar en cada muestra. Sin embargo, las descargas basales no siguen una distribución normal y el promedio junto al error estándar tienen menos relevancia estadística. Una figura que permite describir y entender lo que ocurre en este experimento es el diagrama de cajas, b, que muestra los parámetros de localización: *mínimo*: bigote inferior; *primer cuartil*: borde inferior de la caja; *mediana*: línea gruesa; *tercer cuartil*: borde superior de la caja; *máximo*: bigote superior; *puntos fuera de rango*: círculos vacíos. En ambos gráficos es evidente que la operación mecánica no gatilló un aumento en la frecuencia de disparo de estas rebanadas. También es notoria la actividad deprimida respecto al promedio general de las descargas basales presentadas en la sección anterior, esto se discute en la sección VII.2.

Finalmente resumo los parámetros estadísticos de estos grupos experimentales en la Tabla 2

Tabla 2: Resumen de parámetros del control cambio de solución.

	Ratas 20 días	Ratas 60 días
Descarga basal	0,86 ± 0,42 Hz	0,89 ± 0,56Hz
Control mecánico	0,55 ± 0,18 Hz	0,56 ± 0,15Hz
Valor de P, prueba de Wilcoxon	0,21	0,63
Número de rebanadas	6	5

La prueba de Wilcoxon determinó que no es posible evidenciar un efecto de la manipulación sobre las medianas de las tasas de descarga.

VI.2.2 VIABILIDAD DE LAS REBANADAS

Consideré que observar potenciales de acción espontáneos es un indicador suficiente de la viabilidad de la rebanada, y mientras hice los registros que presento en este trabajo no pensé en algún control para estimar la supervivencia de neuronas en la rebanada. Sin embargo, meses después de registrar los experimentos presentados, decidí hacer un grupo experimental en que evalué mi capacidad de recuperar la técnica de preparación de rebanadas de hipocampo. Para esto, hice registros en dos concentraciones de KCl: 2,5 y 7 mM. En los primeros dos días de hacer rebanadas no observé aumento de la tasa de descarga, pero al tercer día las condiciones experimentales volvieron a ser óptimas para registrar actividad espontánea, como muestro en la Figura 7.

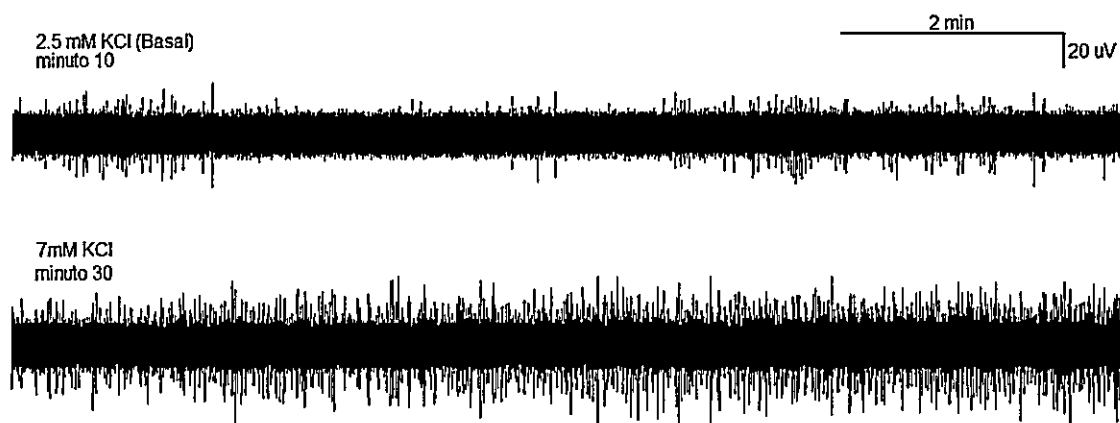


Figura 7: Trazos de registro de rebanada tratada con KCl 7 mM al tercer día de entrenamiento. En este trazo se observa el fenómeno predicho: un aumento de la tasa de descarga de potenciales de acción en una condición en que todas las células de la rebanada están levemente despolarizadas y más cercanas a su potencial de umbral de disparo.

VI.2.3 EFECTO DEL COBRE EN LA TASA DE DESCARGA DE POTENCIALES DE ACCIÓN ESPONTÁNEOS: BAJO COBRE

Para probar que la excitabilidad de la región CA1 del hipocampo responde a cobre agregué 0,05 μM de CuCl_2 a la solución que baña a la rebanada y observé que efecto produce sobre la tasa de descarga de potenciales de acción. Elegí esta concentración ya que podría ser un valor fisiológico (Stuerenburg , 2000) además de los antecedentes de nuestro laboratorio en que se ha observado aumento de la tasa de disparo con concentraciones similares de cobre. Presento un registro representativo de la descarga basal y descarga en presencia de 0,05 μM de cobre para una rata de 20 días y otra de 60 días de edad en las Fig. 8 y Fig. 9, respectivamente.

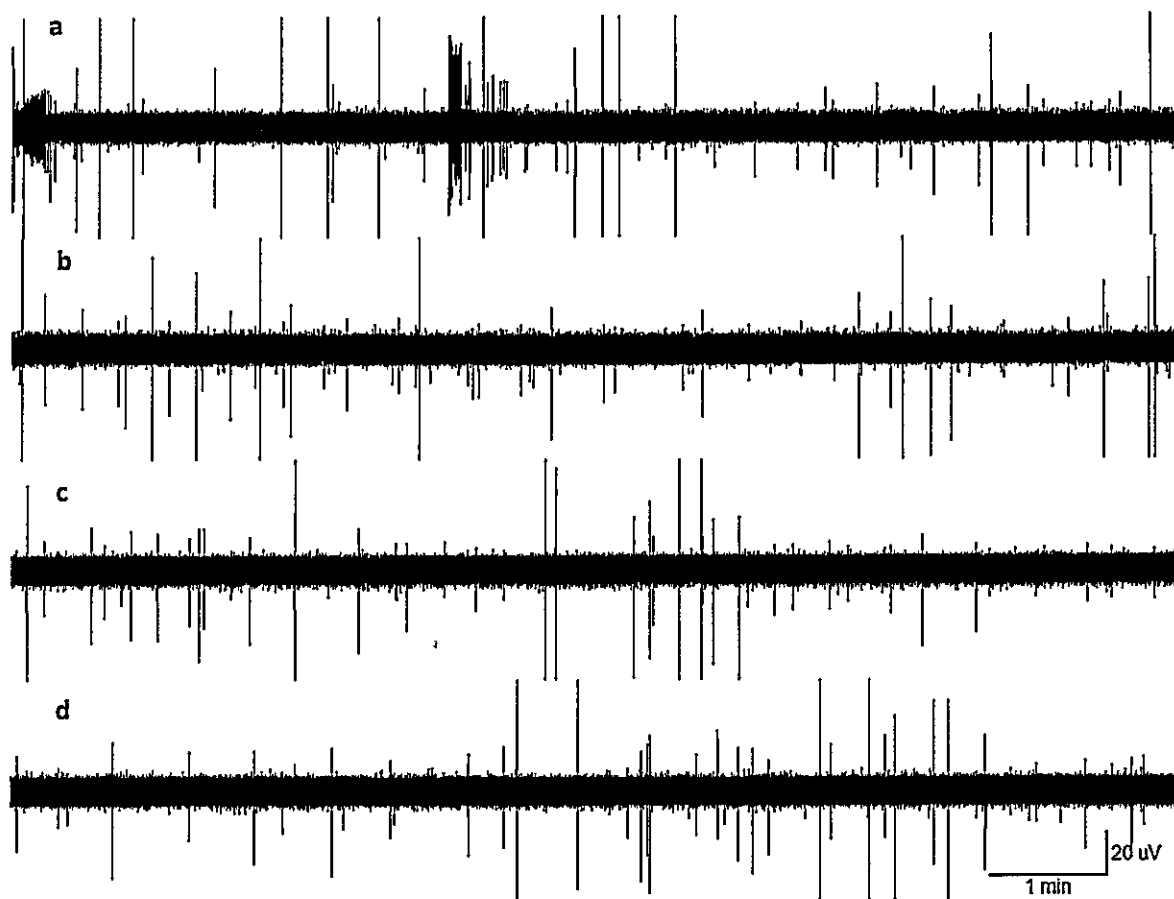


Figura 8: Trazos de registro representativo, 20 días y $0,05 \mu\text{M}$ de CuCl_2 agregado. Los trazos a y b son la descarga basal de un registro representativo de este grupo experimental. En a La ráfaga de actividad al inicio del primer trazo es la perturbación de la rebanada al colocar el electrodo de registro. La ráfaga señalada con una flecha es actividad espontánea y es representativo de varios registros realizados. Los trazos c y d son el registro de la misma rebanada durante la aplicación de $0,05 \mu\text{M}$ de cobre. No observo en cambio aparente en la tasa de descarga.

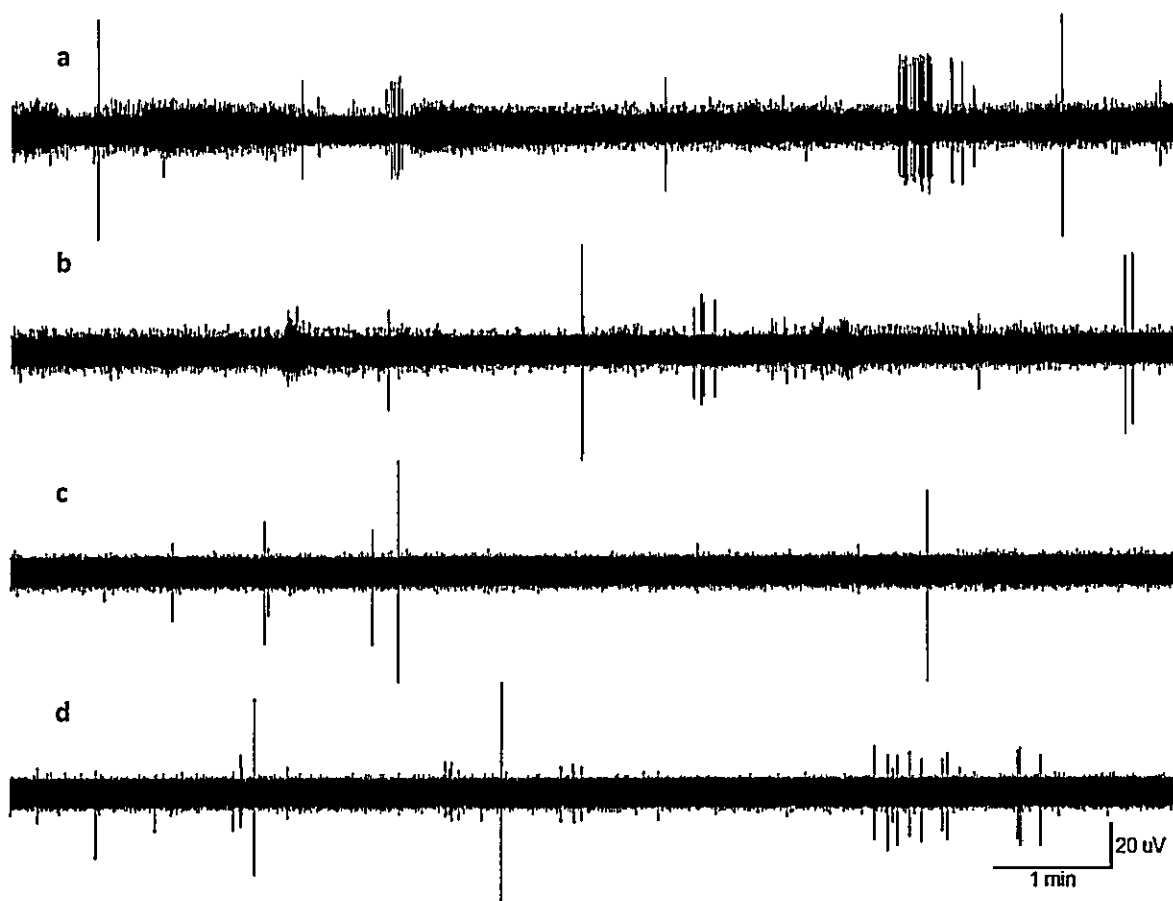


Figura 9: Trazos de registro representativo, 60 días y $0,05 \mu\text{M}$ de CuCl_2 agregado. Los trazos a y b corresponden a la tasa de descarga basal en una rebanada de rata de 60 días, c y d corresponden a la tasa de descarga de la misma rebanada en presencia de $0,05 \mu\text{M}$ de cobre. Esta rebanada presenta un tipo de potenciales de acción espontáneos de pequeña amplitud, sin embargo, su amplitud es suficiente para ser detectadas por el software de análisis. En presencia cobre adicionado (c y d) dejó de detectar ese tipo de potenciales de acción en el registro, mientras que los potenciales de acción de mayor amplitud parecen no variar en frecuencia.

Utilizando la prueba de Wilcoxon establecí que no hay diferencia estadística entre las medianas de la basal y con cobre $0,05 \mu\text{M}$ en rebanadas de ratas de 20 días. En contraste, determiné que hay disminución significativa de la frecuencia en presencia de cobre $0,05 \mu\text{M}$ respecto a la basal en ratas de 60 días. Para ofrecer una idea ilustrativa del efecto de esta concentración de cobre, en la Fig. 10 muestro los pares basal y $0,05 \mu\text{M}$ de cobre para rebanadas de ratas de 20 y 60 días de edad y el diagrama de cajas para la distribución.

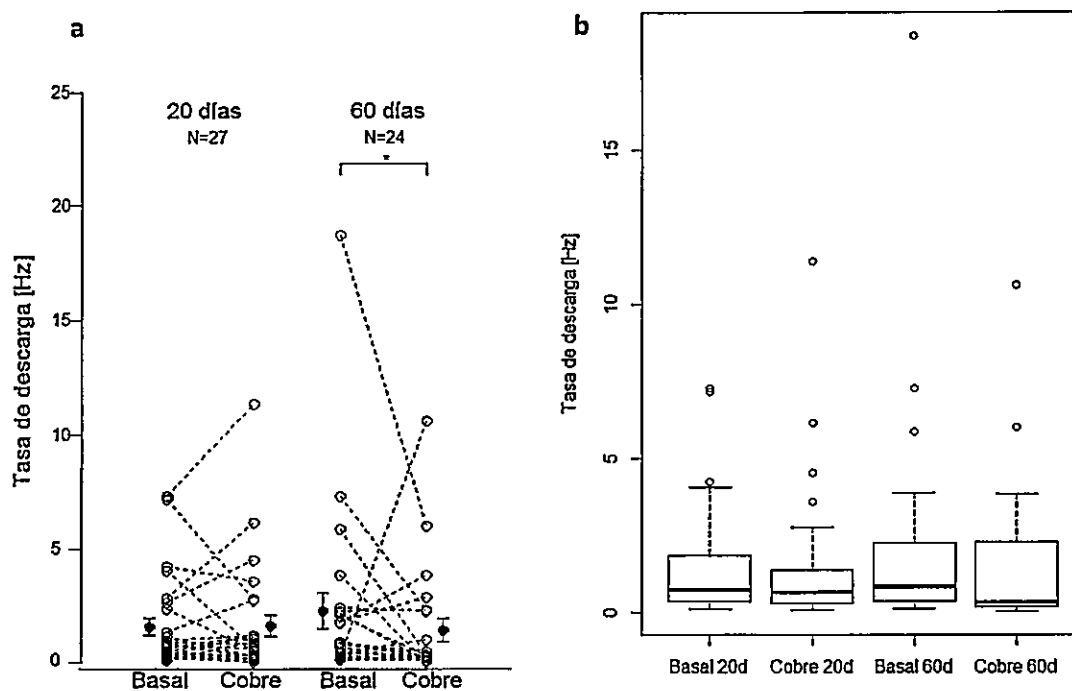


Figura 10: Muestras pareadas y diagrama de cajas de la tasa de descarga basal y con $0.05 \mu\text{M}$ CuCl_2 en rebanadas de ratas de 20 y 60 días. En a el par con círculo cerrado es el promedio y error estándar del grupo experimental. Señalo que varias rebanadas de 60 días disminuyen su tasa de descarga promedio cuando agrego cobre. b Diagrama de cajas para comprender la distribución de la muestra. En este gráfico se ve como la mediana de la tasa descarga en cobre $0,05 \mu\text{M}$, trazo grueso, de las rebanadas de ratas de 60 días está disminuido respecto de la mediana de la tasa de descarga basal.

Resumo el promedio de la tasa de descarga basal y tratamiento en el CA1 de rebanadas de hipocampo de ratas de 20 y 60 días en la Tabla 3

Tabla 3: Parámetros estadísticos del grupo experimental: CuCl_2 $0,05 \mu\text{M}$, en ratas de 20 y 60 días de edad.

	Ratas 20 días	Ratas 60 días
Tasa de descarga basal	$1,56 \pm 0,38 \text{ Hz}$	$2,28 \pm 0,81 \text{ Hz}$
Tasa de descarga en $0,05 \mu\text{M}$ CuCl_2	$1,62 \pm 0,47 \text{ Hz}$	$1,47 \pm 0,50 \text{ Hz}$
Valor de P, prueba de Wilcoxon	0,92	0,026
Número de rebanadas	27	24

VI.2.4 EFECTO DEL COBRE EN LA TASA DE DESCARGA DE POTENCIALES DE ACCIÓN ESPONTÁNEOS: ALTO COBRE

En paralelo exploré el efecto de mayores concentraciones de cobre: 0,5 μM , 5 μM y 50 μM . Pensé que con la perfusión de 50 μM de cobre obtendría un daño oxidativo que perjudicaría la salud de la rebanada y se evidenciaría como la pérdida completa de actividad espontánea. Sin embargo, observé un aumento de la actividad que llamó mi atención. Por esta razón, realicé un grupo experimental con un número de repeticiones considerable usando la misma metodología, esta vez, con una concentración de 10 μM de cobre agregado. Las Fig. 11 y Fig. 12 ilustran un registro representativo de este grupo experimental para rebanadas de ratas de 20 y 60 días de edad, respectivamente.

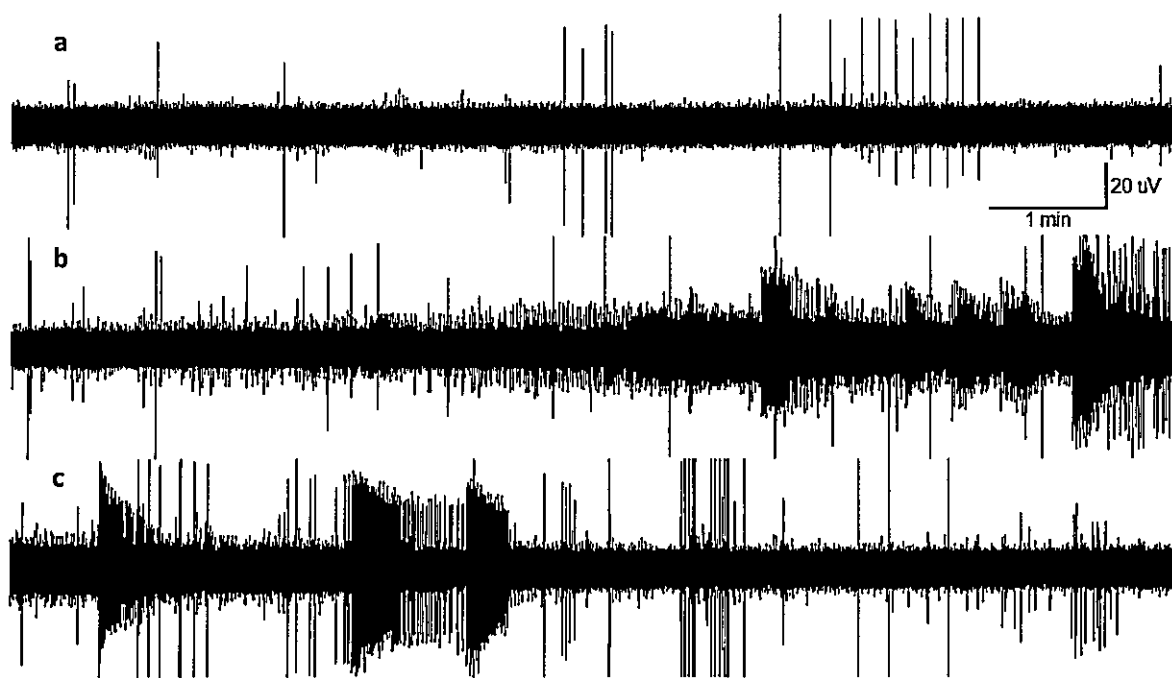


Figura 11: Trazo de registro, 20 días y $10 \mu\text{M}$ de CuCl_2 agregado. El trazo a corresponde a la tasa de descarga basal, los trazos b y c corresponden a la adición de $10 \mu\text{M}$ de cobre. Las escalas son idénticas a la fig 2 y estos registros presentan evidentes unidades cuyos potenciales de acción han sido truncados para efectos de homogeneidad de escala. La adición de $10 \mu\text{M}$ de cobre induce un aumento en la tasa de descarga de potenciales de acción de amplitud mediana, con un comportamiento de ráfagas aisladas temporalmente y un retardo en el tiempo en la activación.



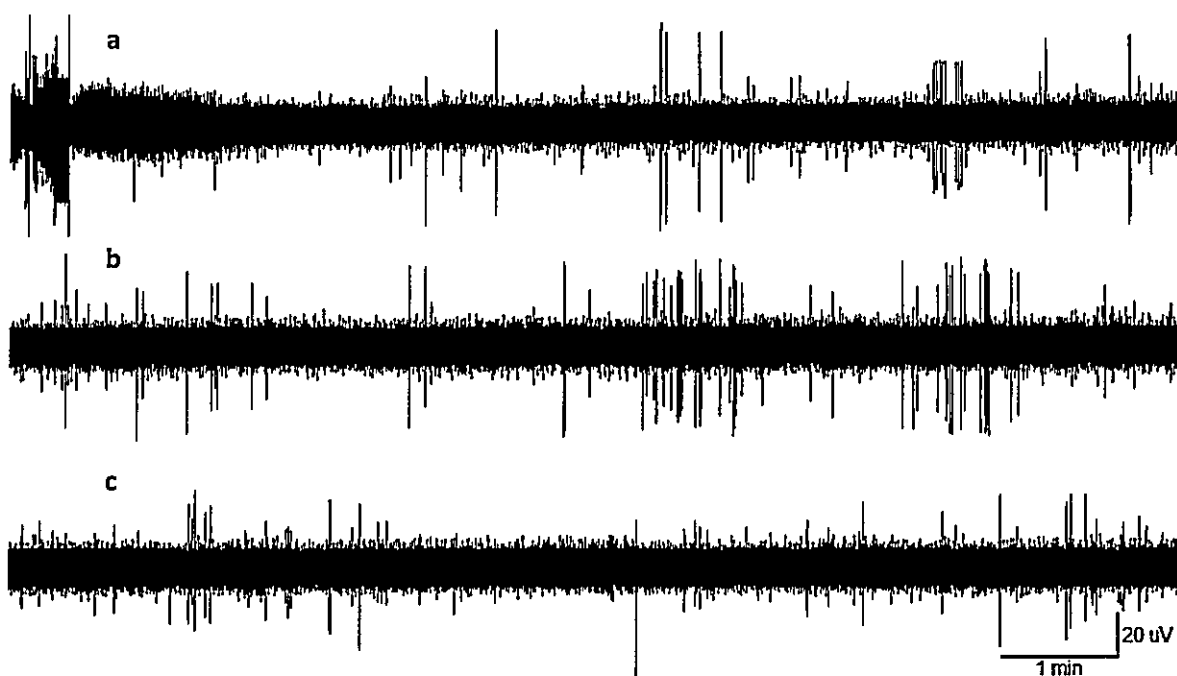


Figura 12: Trazos de registro, 60 días y $10 \mu\text{M}$ de CuCl_2 agregado. El trazo a es la descarga basal, incluida la perturbación inicial por el posicionamiento del electrodo, el trazo b y c son los registros durante la aplicación de $10 \mu\text{M}$ de cobre. La tasa de descarga parece homogénea a lo largo del trazo.

Mi observación es que en rebanadas de ratas de 20 días, $10 \mu\text{M}$ CuCl_2 induce un aumento de la tasa de descarga de potenciales de acción espontáneos. En este caso la prueba de Wilcoxon indica que la adición de $10 \mu\text{M}$ de cobre aumenta la tasa de descarga en rebanadas de ratas de 20 días, no así en rebanadas de ratas de 60 días. Muestro el análisis de estos resultados en las Fig. 13 y los parámetros estadísticos correspondientes a este grupo en la Tabla 4.

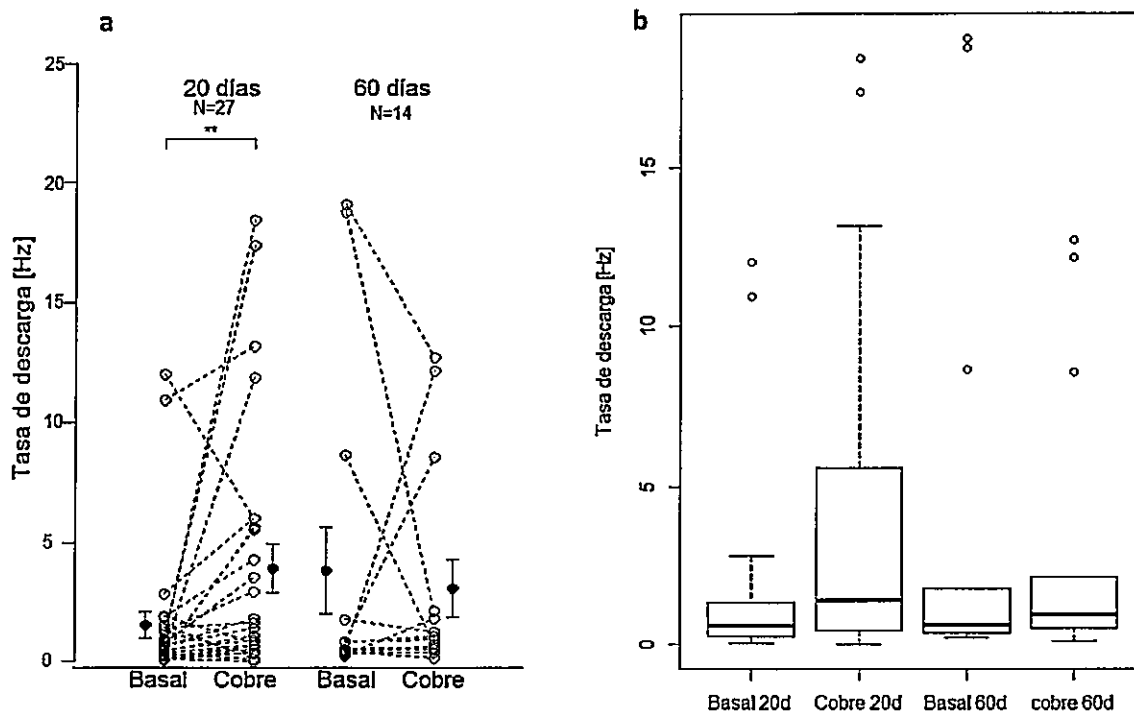


Figura 13: Muestras pareadas y diagrama de cajas de la tasa de descarga basal y con $10\mu\text{M}$ CuCl_2 en rebanadas de ratas de 20 y 60 días. En a se puede observar el aumento individual en numerosas rebanadas en ambos grupos experimentales en respuesta a la adición de cobre $10\mu\text{M}$. El círculo cerrado corresponde al promedio y error estándar. En b se muestra los parámetros de distribución de las series experimentales y el evidente aumento de la mediana y el rango de la tasa de descarga experimental en comparación a la basal en rebanadas de ratas de 20 días.

Tabla 4: Parámetros estadísticos del grupo experimental: CuCl_2 $10\mu\text{M}$, en ratas de 20 y 60 días de edad.

	Ratas 20 días	Ratas 60 días
Tasa de descarga basal	$1,56 \pm 0,57$ Hz	$3,82 \pm 1,80$ Hz
Tasa de descarga en $10\mu\text{M}$ CuCl_2	$3,92 \pm 1,02$ Hz	$3,10 \pm 1,20$ Hz
Valor de P, prueba de Wilcoxon	0,0036	1
Número de rebanadas	27	14

VII DISCUSIÓN

En este trabajo encontré que las tasas de descarga basal entre las dos edades estudiadas son estadísticamente iguales, con promedios de frecuencias de $1,31 \pm 0,26$ Hz para ratas de 20 días y $2,61 \pm 0,74$ Hz para ratas de 60 días (Prueba de Mann-Whitney, $p=0,10$). Sin embargo, la respuesta a cobre agregado es significativamente distinta entre estas dos edades. En ratas de 20 días $0,05 \mu\text{M}$ de cobre no induce un cambio en la frecuencia de potenciales de acción, pero $10 \mu\text{M}$ aumenta esta frecuencia, mientras que en ratas de 60 días $0,05 \mu\text{M}$ de cobre disminuye la frecuencia y $10 \mu\text{M}$ no tiene efecto sobre la frecuencia de potenciales de acción.

VII.1 CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LA PREPARACIÓN DE REBANADAS

Una complicación en el análisis de los resultados de este trabajo surge de la ausencia de distribución normal en la muestra de descargas basales (Prueba de Jarque-Bera y Fig. 3). Por esto, enumero 4 razones que inciden en la variabilidad de la actividad basal registrada y que acciones tomé para tener la mejor consistencia posible.

VII.1.1 LA VIABILIDAD DE LA REBANADA

La precisión y velocidad con que ejecuto la preparación de las rebanadas repercute sobre la cantidad de neuronas que sobreviven y finalmente sobre la estabilidad del registro. También, la inserción del electrodo produce una ráfaga inicial que sugiere que hay unidades neuronales que

están siendo dañadas y que potencialmente liberan material tóxico en su cercanía, causando un curso temporal de adaptación a la nueva configuración: rebanada empalada por un electrodo.

Al comenzar a registrar mis experimentos, el entrenamiento era suficiente para considerar adecuada la salud de las rebanadas. Las dos modificaciones posteriores que hice fueron disminuir el tiempo de la cirugía de 4 a 2 minutos y reducir los tiempos en que registré la basal de 20 a 10 minutos. Estadísticamente no hay diferencias en la tasa de descarga basal respecto a los experimentos previos a la reducción del tiempo de la basal ($p = 0,46$ y $0,12$ para basales de ratas de 20 y 60 días respectivamente, prueba de Mann-Whitney).

VII.1.2 PROXIMIDAD DEL ELECTRODO A LAS UNIDADES REGISTRADAS

Mientras ejecutaba los registros aquí presentados, creí que la punta del electrodo estaba excesivamente inmersa dentro de la rebanada. En una condición como esa se sumaría la difusión del cobre dentro de la rebanada como una variable experimental adicional, porque se conjuga a los péptidos en los intersticios de la rebanada, como han revisado Vlachová y cols. (1996) en relación a los aminoácidos glutamato y glicina. De esta forma se estaría creando un gradiente vertical de concentración de cobre hacia el interior de la rebanada y no se tendría certeza acerca de cuál de las concentraciones de cobre causa efecto.

Sin embargo, en concordancia con otro miembro de nuestro laboratorio (Maureira, C. comunicación personal), la profundidad del electrodo que usé no es excesiva. Además, cinco minutos de perfusión son suficientes para que se equilibre la concentración del cobre en el baño, según mi observación del aumento de la tasa de disparo en presencia de KCl 7mM.

Un control de flujo adecuado pudiera ser un colorante en el reservorio y medir la absorbancia de una muestra de la cámara de registro a intervalos de tiempo regulares. Otro control de flujo podría ser una concentración de potasio que aumente la excitabilidad y medir en rebanadas el tiempo de establecimiento de la respuesta a potasio, sin embargo, la difusión dentro del tejido es

cualitativamente distinta entre el potasio y el cobre, porque este último se conjuga con facilidad a elementos (péptidos) del intersticio.

VII.1.3 ESTADO HORMONAL PREVIO A LA CIRUGÍA

Existe evidencia de que la actividad basal y/o la respuesta a ciertos estímulos varían dependiendo de la hora en que se preparan las rebanadas de ratas (observación de Kirkwood, A., comunicación personal). Esto se debe en parte a las variaciones hormonales que ocurren relacionadas al ciclo circadiano. Hice las cirugías en un rango horario disímil: entre las 9 y las 15 horas, esto probablemente introdujo variabilidad a mis resultados.

Otro factor que podría introducir variabilidad es el tono de hormonas sexuales entre machos y hembras de rata (Smith y cols., 2002). Me limité al uso de ratas macho para controlar esta última variable.

VII.1.4 RANGO DE LA TASA DE DESCARGA BASAL

Usé un criterio de frecuencias en relación a qué rebanadas registrar, de esta forma si la tasa de descarga fue inferior a 0,05 Hz la rebanada era descartada. En el otro extremo, rebanadas con una descarga basal sobre 20 Hz (N=5) se descartaron del análisis. Finalmente, aparté del análisis a cuatro rebanadas que aumentaron la tasa de descarga por sobre los 40 Hz durante la ejecución del tratamiento (uno con 0,05 μ M de cobre y 20 días; otro con 10 μ M de cobre y 20 días y dos con 0,05 μ M de cobre y 60 días), bajo la premisa de que estas rebanadas se comportan diferente al resto y probablemente evidencian otro efecto fisiológico que aparece con menor probabilidad.

La desventaja de incluir un rango amplio de frecuencias como criterio de rebanada viable es que aumenta la variabilidad a las descargas basales. En retrospectiva, debí aumentar el límite inferior de frecuencia a 0,1 Hz y de esa forma seleccionar un tipo de comportamiento de rebanadas que fuera consistente, aunque ello implicara disminuir el número de rebanadas registradas exitosamente.

VII.2 DESCARGA BASAL REDUCIDA EN EL GRUPO CONTROL DE CAMBIO DE RESERVORIO

El promedio de la descarga basal del control de cambio de reservorio es visiblemente menor al promedio conjunto en ambas edades (Tablas 1 y 2). El promedio en este caso no es un parámetro confiable debido a la variabilidad de las tasas de descargas basales observada y el tamaño muestral del grupo experimental (N= 6 y 5 para 20 y 60 días, respectivamente). Sin embargo, si observamos otros parámetros estadísticos de las muestras como medianas y cuartiles, es posible señalar que la distribución de las tasas de descarga basales está incluida en los rangos de distribución del conjunto de basales de todos los grupos experimentales.

La prueba de Wilcoxon permite afirmar que el cambio de solución no produce un aumento de la actividad. Pero, como la descarga basal es reducida, es complejo evidenciar numéricamente si esta manipulación disminuye la frecuencia. En base a esto, llamo la atención acerca de mis experimentos, ya que podrían reflejar no sólo el efecto del tratamiento con cobre 0,05 ó 10 μM , sino la superposición de un efecto de cobre junto a una disminución de la frecuencia de potenciales de acción debida a la manipulación.

VII.3 CONJETURAS SOBRE LA MODIFICACIÓN DE LA RESPUESTA A COBRE CON LA EDAD

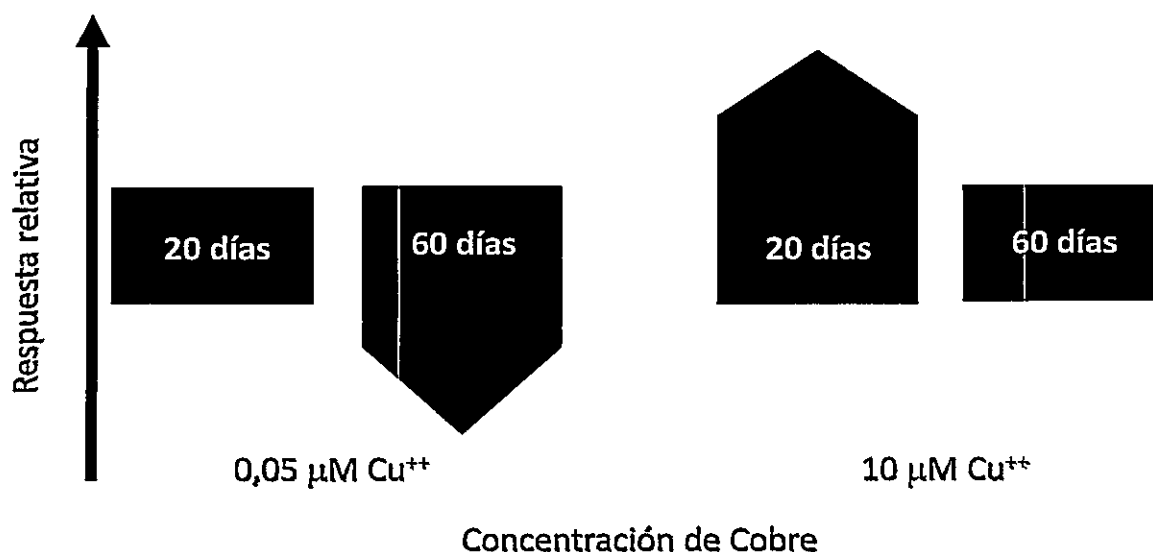


Figura 14: Diagrama: efecto cualitativo de cobre a dos concentraciones y a dos edades.

10 µM de cobre tiene un marcado efecto activador sobre las rebanadas de ratas de 20 días y no sobre las rebanadas de 60 días. Una aproximación reduccionista mínima supondría que, a los 20 días hay un único elemento, ya sea un canal o un receptor, que se activa (o inactiva) en presencia de cobre a una concentración micromolar. Mientras que a los 60 días ese elemento ya no es equivalente, ha cambiado su nivel de expresión, se expresa una isoforma o ha ocurrido una modificación post-traducciona que confluye en la pérdida de reacción ante el cobre micromolar.

En una lógica similar, 0,05 µM de cobre disminuye la excitabilidad de la rebanada en 60 días y no en 20 días y podría ser que elementos que no responden al cobre en concentración nanomolar a los 20 días estén alterados y sí reaccionen ante el cobre a los 60 días.

VII.3.1 PROPIEDADES INTRÍNSECAS MODULADAS POR COBRE

En el trabajo de Delgado y cols. (2006) se demostró que la cinética de apertura de la corriente de sodio dependiente de potencial que se expresa en el epitelio olfativo de sapo se acelera con concentraciones de cobre en el rango nanomolar. Lo que aumenta la excitabilidad en esas neuronas. Sin embargo, suponiendo que esa corriente de sodio conserva esas características en las neuronas del CA1 de hipocampo, mi observación muestra que, en ratas de 60 días, una concentración nanomolar de cobre exógeno disminuye la excitabilidad. Entonces, esta respuesta de la corriente de sodio, por sí sola, no puede explicar mi observación.

En el trabajo de Gruss y cols. (2004) se demostró que la corriente de fuga del canal TASK-3, expresado en oocito de rana y registrado en condición "whole-cell, voltage-clamp", se inhibe con concentraciones micromolares de cobre. Si una neurona que expresara ese tipo de canal es expuesta a cobre exógeno, disminuirá un componente de la diversidad de corrientes de salida de potasio y, dependiendo del balance de corrientes, el potencial de transmembrana se despolarizará, acercándose al umbral de disparo del potencial de acción, es decir, esta neurona aumenta su excitabilidad. Esto puede explicar mi observación en ratas de 20 días y 10 μM de cobre agregado, siempre que ese tipo de canal de fuga se exprese en algún tipo neuronal del CA1 de hipocampo. En el mismo trabajo se demostró la activación de la corriente de fuga debida al canal TREK-1 con concentraciones de cobre micromolar, en este caso aumenta un componente de corriente de salida en la neurona que exprese este tipo de canal. Esto finalmente incide en la disminución de la excitabilidad y no puede por sí sola explicar mi observación.

VII.3.2 PROPIEDADES SINÁPTICAS MODULADAS POR COBRE

Los receptores de glutamato tipo AMPA y NMDA son inhibidos con concentraciones de cobre micromolar y están presentes en las neuronas piramidales del CA1 de hipocampo (Vlachová y cols., 1996; Weiser y Wienrich, 1996). La reducción de la corriente de entrada de Na^+ (o de Na^+-Ca^+)

disminuye la excitabilidad de las neuronas que expresan estos canales y por sí sola no explica mi observación, puesto que una concentración similar de cobre (en orden de magnitud) aumentó la excitabilidad de la rebanada a los 20 días.

En un párrafo anterior, mencioné la existencia de moléculas capaces de unir reversiblemente el cobre y que tienen la capacidad de actuar como quelante de cobre. Entre ellas se encuentra la proteína de priones celular (PrP^c) (con dominio de anclaje extracelular), que en su estado natural, posee cinco sitios de unión a cobre de afinidades variables desde el orden picomolar hasta el micromolar. Interesantemente, se ha reportado que, al conjugarse con el cobre, PrP^c se une a la subunidad GluN1 del receptor de NMDA. Esta interacción disminuye la afinidad del receptor por glicina (un co-agonista) y en consecuencia aumenta la desensibilización del receptor. (Davies, y cols., 2011; Khosravani y cols., 2008; You y cols., 2012). El cobre exógeno podría desplazar el equilibrio hacia la interacción de PrP^c con NMDA-R disminuyendo la corriente de estado estacionario y por lo tanto disminuir la excitabilidad. Esta cascada por sí sola no explica el aumento de excitabilidad de 10 μ M de cobre a los 20 días.

Por otro lado, el receptor ionotrópico de GABA (GABA_A) se inhibe con concentraciones de cobre del orden de decenas de nanomolar (Sharonova, y cols., 1998). Al activarse permea una corriente de cloruro que en hipocampo es de salida (entran aniones de Cl⁻) y su activación aleja el potencial de membrana del umbral de disparo. La inhibición de este canal suprime el tono inhibitorio sináptico en la neurona piramidal del CA1, aumentándole su excitabilidad. Por lo tanto, esta evidencia aislada tampoco explica por qué disminuye la excitabilidad con concentraciones de cobre 0,05 μ M en rebanadas de ratas de 60 días.

Un canal de calcio dependiente de potencial expresado en neuronas de corteza piriforme es inhibido por cobre en el orden micromolar (Castelli y cols., 2003). Si este tipo de canal es aquel que se encuentra en el botón presináptico, su inhibición disminuye la entrada de calcio luego de la llegada de un potencial de acción, reduce la probabilidad de fusión de membrana de vesículas que

contienen neurotransmisores y reduce la efectividad de esa sinapsis. Si suponemos que la sinapsis principal CA3-CA1 es la que está siendo afectada, implicaría una disminución de la excitabilidad de esa transmisión. Esta suposición no explicaría el aumento de excitabilidad de la región CA1 a los 20 días y con cobre 10 μM agregado.

VII.3.3 REDES NEURONALES MODULADAS POR COBRE

La red local de interneuronas del CA1 del hipocampo esculpen la codificación temporal denominada “onda theta”, observada *in vivo* en registros de campo, mediante el bombardeo en fase de distintos tipos celulares en distintas regiones del árbol dendrítico de la neurona piramidal y a través de distintos neurotransmisores (Klausberger y Somogyi, 2008). Si alguno de estos tipos neuronales responde a cobre, ya sea con un cambio en su excitabilidad intrínseca o una alteración en la transmisión sináptica, puede ocurrir que la integración de la actividad excitatoria e inhibitoria en la neurona piramidal del CA1 incida en un aumento o disminución de la excitabilidad que sea concordante con lo que he podido observar en mi trabajo.

Con el modelo experimental utilizado no es posible indicar que mecanismo afecta la excitabilidad, pero el análisis del registro multiunitario, mediante parametrización y clasificación de los tipos de potenciales de acción, podría indicar si se sustraen o se suman unidades, lo que sugeriría la activación de neuronas en relación a la situación basal.

VII.3.4 SUPERPOSICIÓN DE EFECTOS

La superposición de más de un elemento que responde al cobre podría dar cuenta de mi observación. Por ejemplo, el aumento de la excitabilidad que observé al agregar 10 μM de cobre a los 20 días podría ser explicado por la inhibición del canal de potasio TASK-3, suponiendo que ese tipo de canal de fuga es el que se expresa en CA1. La ausencia de aumento en la excitabilidad a los 60 días podría deberse a que a esta edad se expresan tanto TASK-3 como TREK-1 y la activación del canal TREK-1 contrarresta el aumento de la excitabilidad producido por TASK-3.

Considerando todos los elementos mencionados, este trabajo muestra que las células piramidales de CA1 responden diferencialmente a cobre en distintas edades pese a no poder precisar aun el mecanismo subyacente. Para esto se necesitaría finalmente estudios a nivel de células individuales.

VIII CONCLUSIÓN

- Con mis experimentos y metodología de análisis, pongo en evidencia que el cobre exógeno aplicado modula la frecuencia de disparo de potenciales de acción en la región CA1 del hipocampo de rata y que esta modulación es diferente según la concentración de cobre y la edad del animal del que se obtuvo la rebanada.

IX BIBLIOGRAFÍA

- Aedo, F., Delgado, R., Wolff, D., & Vergara, C. (2007). Copper and zinc as modulators of neuronal excitability in a physiologically significant concentration range. *Neurochemistry International*, 50(4), 591–600.
- Banci, L., Bertini, I., Ciofi-Baffoni, S., Kozyreva, T., Zovo, K., & Palumaa, P. (2010). Affinity gradients drive copper to cellular destinations. supplementary. *Nature*, 465(7298), 645–8.
- Castelli, L., Tanzi, F., Taglietti, V., & 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, 136, 121–136.
- Davies, P., McHugh, P. C., Hammond, V. J., Marken, F., & Brown, D. R. (2011). Contribution of individual histidines to prion protein copper binding. *Biochemistry*, 50(50), 10781–91.
- Delgado, R., Vergara, C., & Wolff, D. (2006). Divalent cations as modulators of neuronal excitability: emphasis on copper and zinc. *Biological Research*, 39(1), 173–182.
- Deng, W., Aimone, J. B., & Gage, F. H. (2010). New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nature Reviews. Neuroscience*, 11(5), 339–50.
- Gruss, M., Mathie, A., Lieb, W. R., & Franks, N. P. (2004). The two-pore-domain K^{+} channels TREK-1 and TASK-3 are differentially modulated by copper and zinc. *Molecular Pharmacology*, 66(3), 530–537.
- Hartter, D. E., & Barnea, a. (1988). Evidence for release of copper in the brain: depolarization-induced release of newly taken-up ^{67}Cu . *Synapse New York Ny*, 2(4), 412–415.
- Hopt, A., Korte, S., Fink, H., Panne, U., Niessner, R., Jahn, R., ... Herms, J. (2003). Methods for studying synaptosomal copper release. *Journal of Neuroscience Methods*, 128(1-2), 159–172.

- Kaler, S. G. (2011). ATP7A-related copper transport diseases-emerging concepts and future trends. *Nature Reviews. Neurology*, 7(1), 15–29.
- Kardos, J., Kovács, I., Hajós, F., Kálmán, M., & Simonyi, M. (1989). Nerve endings from rat brain tissue release copper upon depolarization. A possible role in regulating neuronal excitability. *Neuroscience Letters*, 103(2), 139–144.
- Khosravani, H., Zhang, Y., Tsutsui, S., Hameed, S., Altier, C., Hamid, J., ... Zamponi, G. W. (2008). Prion protein attenuates excitotoxicity by inhibiting NMDA receptors. *The Journal of Cell Biology*, 181(3), 551–65.
- Klausberger, T., & Somogyi, P. (2008). Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. *Science*, 321(5885), 53–57.
- Lutsenko, S., Bhattacharjee, A., & Hubbard, A. L. (2010). Copper handling machinery of the brain. *Metallomics : Integrated Biometal Science*, 2(9), 596–608.
- Megfás, M., Emri, Z., Freund, T. F., & Gulyás, A. I. (2001). Total number and distribution of inhibitory and excitatory synapses on hippocampal CA1 pyramidal cells. *Neuroscience*, 102(3), 527–540.
- Niciu, M. J., Ma, X.-M., El Meskini, R., Ronnett, G. V, Mains, R. E., & Eipper, B. a. (2006). Developmental changes in the expression of ATP7A during a critical period in postnatal neurodevelopment. *Neuroscience*, 139(3), 947–64.
- Schlief, M. L., Craig, A. M., & Gitlin, J. D. (2005). NMDA receptor activation mediates copper homeostasis in hippocampal neurons. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 25(1), 239–46.
- Sharonova, I. N., Vorobjev, V. S., & Haas, H. L. (1998). High-affinity copper block of GABA(A) receptor-mediated currents in acutely isolated cerebellar Purkinje cells of the rat. *European Journal of Neuroscience*, 10(2), 522–528.
- Smith, M. D., Jones, L. S., & Wilson, M. a. (2002). Sex differences in hippocampal slice excitability: role of testosterone. *Neuroscience*, 109(3), 517–30.
- Stuerenburg, H. J. (2000). CSF copper concentrations, blood-brain barrier function, and caeruloplasmin synthesis during the treatment of Wilson's disease. *Journal of Neural Transmission*, 107(3), 321–329.
- Tarohda, T., Yamamoto, M., & Amamo, R. (2004). Regional distribution of manganese, iron, copper, and zinc in the rat brain during development. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 380(2), 240–6.
- Uriu-Adams, J. Y., & Keen, C. L. (2005). Copper, oxidative stress, and human health. *Molecular Aspects of Medicine*, 26(4-5), 268–98.

- Vlachová, V., Zemková, H., & Vyklický, L. (1996). Copper modulation of NMDA responses in mouse and rat cultured hippocampal neurons. *European Journal of Neuroscience*, 8(11), 2257–2264.
- Weiser, T., & Wienrich, M. (1996). The effects of copper ions on glutamate receptors in cultured rat cortical neurons. *Brain Research*, 742(1-2), 211–8.
- You, H., Tsutsui, S., Hameed, S., Kannanayakal, T. J., Chen, L., & Xia, P. (2012). A β neurotoxicity depends on interactions between copper ions, prion protein, and N-methyl-D-aspartate receptors. *109*(5), 1737–1742.
- Zatta, P., & Frank, A. (2007). Copper deficiency and neurological disorders in man and animals. *Brain Research Reviews*, 54(1), 19–33.