

UCH-FC
DOC-BMCN
K 186
C. 1



**MECANISMO DEPENDIENTE DE CALCIO EN LA
PLASTICIDAD HOMEOSTÁTICA DE LA
EXCITABILIDAD EN EL HIPOCAMPO**

Tesis

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

**Doctor en Ciencias con Mención en
Biología Molecular, Celular Y Neurociencias**

Facultad De Ciencias

Por

Daniel Karmelić Visintainer

Enero, 2017

**Director de Tesis Dra.: Magdalena Sanhueza Tohá
Co-Director de Tesis Dra.: Verónica Palma Alvarado**

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 Doctorado presentada por el candidato.

Daniel Karmelić Visintainer

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con Mención en Biología Molecular, Celular Y Neurociencias, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 17 de enero de 2017.

Director de Tesis:

Dra. Magdalena Sanhueza Tohá

Co-Director de Tesis

Dra. Verónica Palma Alvarado

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Christian González (Presidente)

Dr. Álvaro Glavic

Dr. Úrsula Wyneken

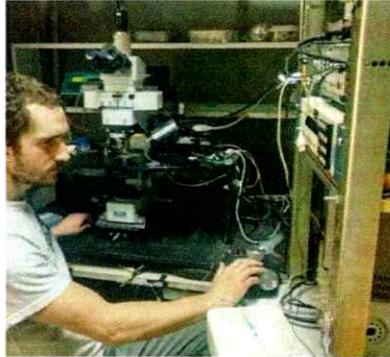
Dr. Marco Tulio Núñez



[Handwritten signatures in blue ink, including "Le Sanchez", "Verónica", "Christian", "Álvaro", "Úrsula", and "Marco"]

"Mi libertad termina donde empieza la de los demás
y se multiplica cuando colaboro con los demás"

Resumen biográfico



Nací poco antes de la media noche, con mi mamá aguantando para que el parto fuera al día siguiente mientras la televisión celebraba el cumpleaños de un general, ahora también conocido como Daniel López, en un alcance de nombres casi clarividente.

En mi infancia fui el niño que todo profesor quisiera tener como alumno. Terminaba las tareas con gran dedicación, y luego pedía más tareas. Las veces en que no me sacaba un siete eran excepciones dolorosas para mi trastorno obsesivo compulsivo. No dejaba que me sacaran la polera de dentro del pantalón ni me soltaran el último botón de la camisa, y me despertaba a las 6:30 a buscar el diario y poner la mesa para mi familia.

Pero llegó la pubertad. Y con ella las hormonas, los amores, los desamores, las pichangas, las fiestas y esas grandes amistades que duran hasta hoy. Luego vino la adolescencia, en la que mi TOC se manifestó en una infinita búsqueda del porqué del porqué que me llevó a una crisis existencial, que al pasar (medio de casualidad) de colegio católico a universidad católica se me fue olvidando en un mar de experiencias muy locas.

Con el fin de saciar al bichito del porqué del porqué, me sumergí en la neurobiología, porque tenía que empezar por entender el dispositivo que me iba a ayudar a entender. Tras casi una década dedicada a la investigación, el bichito sigue bastante hambriento, y con desafíos insospechados por delante.

Agradecimientos

Esta tesis fue un camino largo lleno de moralejas.

Y por lo largo, este agradecimiento es largo. Tengo mucho que agradecerle a muchos.

A mi tutora, la Magda –que cuando llegué al laboratorio no tenía canas–, porque fueron años difíciles en muchos sentidos y siempre me apoyó, con una confianza enorme que me permitió cursar con independencia el camino de traspies/enseñanzas que culmina con esta tesis. Y a mi co-tutora, la Vero, por el entusiasmo con que impulsa las ideas que uno propone.

A mis amig@s de la infancia, que no me creían que estaba mal en los momentos en que las cosas no salían, porque cada vez que l@s veía me ponía contento.

A mis amigos de la U(C), en especial a Cuadrado, que a la distancia me levanta el ánimo, y Tomás, que siempre está listo para actuar cuando un amigo necesita ayuda.

Esta tesis fue un camino largo lleno de moralejas.

Y por lo largo, son muchísim@s l@s amig@s que en las largas –y a ratos frustrantes– jornadas en el lab me hicieron saber que no estaba solo. Viej@s grandes amig@s que con el correr de mis años se fueron, como la Beléjem y el Nacho, y nuev@s, como doña Dani Acevedo, que llegaron llen@s de incauta alegría.

Un aspecto especialmente virtuoso de la vida en el fisiolab es la sala “del destilador”, donde con Don Danny, la Yáne, los cabros y los profes discutimos con una horizontalidad encomiable desde el último partido de fútbol hasta el orden económico mundial. Puedo afirmar, sin temor a equivocarme, que apretujado en torno a esa mesa fue donde más aprendí durante mi doctorado. Agradezco a todos los profes del fisiolab: Ceci, Julio, Ricardo, Juan y Osvaldo, por sus tremendos consejos, tanto en el rigor de la sala de seminarios como fuera de ella. Debo hacer mención aparte al Dr. Vera, que hizo posible esta tesis ocupando bastante de su infinita energía en compartir conmigo su experiencia.

Esta tesis fue un camino largo lleno de moralejas.

En mi vida llegué tarde a todo, pero llegué temprano a la repartición de familias. Son lo máximo. Mi padre, que me heredó lo mateo, mi madre, el restito que tengo de inteligencia emocional, y mis hermanas doctoras que me dan los más sabios consejos. No se los digo casi nunca, pero pucha que los quiero.

Financiamiento

- Proyecto FONDECYT Regular 1140700
- Proyecto FONDECYT Regular 1140697
- Beca CONICYT Nacional
- Beca CONICYT de Asistencia a Eventos para Estudiantes de Doctorado

Índice de contenidos

Resumen biográfico	iii
Agradecimientos	iv
Financiamiento	v
Índice de contenidos.....	vi
Índice de figuras.....	vii
Lista de abreviaturas	viii
Resumen.....	ix
Abstract	x
Introducción	1
Hipótesis.....	9
Objetivo general.....	9
Objetivos específicos	9
Metodología	10
Resultados	13
Objetivo 0: Implementar la metodología de cultivo organotípico hipocampal.....	13
Objetivo 1: Caracterizar los cambios en la excitabilidad de neuronas piramidales de CA1 en respuesta a inactividad crónica	18
Objetivo 2: Discernir si los cambios encontrados en la excitabilidad se deben a propiedades intrínsecas o sinápticas.....	27
Objetivo 3: Dilucidar el mecanismo de señalización que media los cambios en la excitabilidad producidos por inactividad crónica	35
Discusión.....	43
Conclusiones	51
Referencias.....	52

Índice de figuras

<u>Figura 1:</u>	La arquitectura del cultivo organotípico hipocampal se preserva <i>ex vivo</i>	14
<u>Figura 2:</u>	El marcaje de neuronas de CA1 confirma que se mantiene la citoarquitectura neuronal en las rebanadas cultivadas.	15
<u>Figura 3:</u>	La transmisión sináptica de neuronas de CA1 se mantiene en el cultivo organotípico hipocampal.	17
<u>Figura 4:</u>	Efecto de la aplicación aguda de TTX sobre las neuronas de CA1.	19
<u>Figura 5:</u>	La inactividad crónica aumenta la excitabilidad de las neuronas piramidales de CA1.	20
<u>Figura 6:</u>	La inactividad crónica aumenta el umbral de disparo y disminuye el umbral de corriente.	23
<u>Figura 7:</u>	El tratamiento crónico con TTX aumenta la resistencia de membrana de las neuronas de CA1.	25
<u>Figura 8:</u>	Efecto de inactividad crónica registrado en presencia de bloqueadores sinápticos.	28
<u>Figura 9:</u>	El aumento de resistencia de membrana inducido por TTX no se ve alterado en presencia de bloqueadores sinápticos.	30
<u>Figura 10:</u>	Ni la corriente h ni corrientes pasivas de potasio aparecen como responsables del aumento en la resistencia de membrana.	32
<u>Figura 11:</u>	El bloqueo crónico de canales de calcio dependientes de voltaje tipo L aumenta la excitabilidad de neuronas de CA1.	36
<u>Figura 12:</u>	La inhibición específica de CaMKII no produce cambios significativos en la excitabilidad.	38
<u>Figura 13:</u>	La inhibición farmacológica simultánea de CaMKII y CaMKIV aumenta la excitabilidad de las neuronas de CA1.	40
<u>Figura 14:</u>	Los cambios en excitabilidad provocados por la inactividad crónica y la inhibición de CaMKs no son aditivos.	42
<u>Figura 15:</u>	Esquema del mecanismo propuesto.	48

Lista de abreviaturas

AMPA	ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
CaM	Calmodulina
CaMK	Quinasa dependiente de calcio/calmodulina
Ca _v 1	Canal de calcio tipo L
CBP	proteína de unión a CREB
CNQX	6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona
CREB	proteína de unión al elemento de respuesta a cAMP
GABA	ácido γ -aminobutírico
LTP	Potenciación de largo plazo
NMDA	N-metil-D-aspartato
PTX	Picrotoxina
TTX	Tetrodotoxina

Resumen

Hay evidencia creciente de la existencia de una variedad de fenómenos de plasticidad neuronal denominados "plasticidad homeostática", que actúan en oposición a los cambios en la actividad de las neuronas con un curso temporal de días. Estos mecanismos todavía no se comprenden a cabalidad, pero pueden incluir cambios sinápticos y cambios en la excitabilidad neuronal a través de modificaciones de distintas conductancias de membrana.

En la presente investigación, se estudió la adaptación de la excitabilidad de las neuronas de CA1 de hipocampo a la inactividad crónica. Utilizando registros de tipo *whole cell*, evaluamos la excitabilidad de neuronas de CA1 de rebanadas de cultivo organotípico hipocampal de rata después de la inactividad por 3-4 días mediante bloqueo farmacológico de los impulsos nerviosos. Se encontró que las neuronas de rebanadas sometidas a inactivación crónica presentan una mayor excitabilidad que las neuronas de rebanadas control sin tratar. Este aumento de la excitabilidad involucra cambios en conductancias sinápticas, y se correlaciona con un gran aumento intrínseco de la resistencia de membrana.

En busca del mecanismo de señalización que detecta la inactividad y genera la adaptación de la excitabilidad, encontramos un posible rol los canales de calcio tipo L, capaces de permear calcio en respuesta a los impulsos nerviosos, e involucramos la acción de CaMK quinasas dependientes de calcio.

Abstract

There is increasing evidence for a set of plasticity phenomena termed "homeostatic plasticity", acting in opposition to the changes in neural activity with a time course of days. These mechanisms are not entirely understood, but can include synaptic changes and changes in intrinsic neuronal excitability through modification of different membrane conductances.

Here, we study the adaptation to chronic inactivity of the excitability of CA1 principal cells in cultured slices. Using *whole cell* recordings we evaluated the excitability of CA1 neurons in rat hippocampal organotypic cultured slices after 3-4 days of inactivity induced by a pharmacological blockage of the nerve impulses. We found that neurons from slices subjected to chronic inactivity display higher excitability than neurons from untreated control slices. This excitability increase involves changes in synaptic conductances, and is correlated with an intrinsic increase in membrane resistance.

In search of the signaling mechanism that detects inactivity and generates the excitability adaptation, we found a role for L-type calcium channels, capable of permeating calcium in response to nerve impulses, and a possible participation of certain calcium/calmodulin-dependent kinases.

Introducción

Los procesos de plasticidad sináptica basados en la correlación de actividad pre- y postsináptica (“Hebbianos”), como la potenciación de largo plazo (LTP), por su carácter de retroalimentación positiva, resultan intrínsecamente desestabilizantes en las redes neuronales. Desde la primera descripción de LTP en sinapsis hipocampales en respuesta a estimulación de alta frecuencia (Bliss y Lomo 1973), se enarboló esta forma de plasticidad sináptica de tipo Hebbiana (*sinapsis-específica* y basada en la actividad pre- y postsináptica correlacionada) como un mecanismo potencialmente subyacente al almacenamiento de información (Bliss y Collingridge 1993; Thompson 1986; Lynch y Baudry 1984; Martin y cols. 2000). Sin embargo, las sinapsis potenciadas generarán probablemente mayor descarga postsináptica, propiciando la LTP, en una retroalimentación positiva que, al ser incorporada en los modelos de redes neuronales, resulta ser un factor desestabilizante tendiente a la saturación de la potencia sináptica. Entre las restricciones teóricas que se propuso en su momento para estabilizar los modelos se encuentran la conservación del peso sináptico total y la mantención de un nivel de actividad promedio (von der Malsburg 1973; Miller 1996; Miller y MacKay 1994).

Plasticidad homeostática

Posteriormente se encontraron efectivamente formas de plasticidad que, con un curso temporal más lento, y actuando en el sentido contrario a la actividad, permiten mantener entre ciertos márgenes la tasa de disparo promedio de las neuronas. El caso

más emblemático es el del escalamiento sináptico, que se produce globalmente en las sinapsis de una neurona tras la alteración crónica (en el curso de horas o días) de su actividad. Éste es un fenómeno en el que la potencia de todas las sinapsis excitatorias de una célula, medida a través de corrientes postsinápticas excitatorias en miniatura (mEPSC, o 'minis'), se escala por un factor, aumentando o disminuyendo dependiendo de si la actividad promedio de la célula ha disminuido o aumentado, respectivamente (Turrigiano y cols. 1998). Al ser un escalamiento global y multiplicativo, se mantiene la contribución relativa de las distintas sinapsis, por lo que se no se ven mayormente alterados los procesos que dependen de la plasticidad *sinapsis-específica*.

Fenómenos compensatorios con respecto al nivel de actividad pueden ocurrir a nivel de red neuronal o inclusive a nivel celular. Es así como se ha descrito la participación de factores neurotróficos solubles como el factor de necrosis tumoral α (TNF α) (Stellwagen y Malenka 2006; Stellwagen y cols. 2005) o el factor neurotrófico derivado del cerebro BDNF (Rutherford y cols. 1998) en el escalamiento sináptico, lo que podría representar un mecanismo homeostático a nivel de grupos de células. En el otro extremo, existe a su vez regulación compensatoria a nivel de dendritas (Branco y cols. 2008) e inclusive espinas únicas, ya sea ante el silenciamiento (Hou y cols. 2008; Sutton y cols. 2006) o la activación exacerbada (Hou y cols. 2011) de terminales presinápticos específicos.

Estos mecanismos de respuesta a cambios crónicos de la actividad, denominados en su conjunto *plasticidad homeostática*, incluyen, además del escalamiento global de la potencia sináptica de los inputs de una neurona, cambios en la excitabilidad intrínseca

mediante modificaciones en distintas conductancias dependientes de voltaje (Turrigiano 1999). Es este último tipo de adaptaciones el foco de la presente tesis.

Plasticidad homeostática intrínseca

La plasticidad homeostática de la excitabilidad intrínseca se manifiesta como modificaciones en las conductancias sensibles a voltaje, lo que aumenta de manera compensatoria la probabilidad de que la célula responda a un estímulo dado (Desai y cols. 1999; Zhang y Linden 2003). Previamente a la evidencia empírica se habían propuesto mecanismos estabilizadores de la actividad promedio, en que el ion calcio que ingresa por los canales sensibles a voltaje actuaría como indicador de la tasa de disparo, y su señalización como segundo mensajero permitiría la regulación homeostática de las conductancias sensibles a voltaje (LeMasson y cols. 1993). Aunque no se ha establecido completamente el rol de los canales de calcio sensibles a voltaje, las neuronas pueden efectivamente modificar su excitabilidad intrínseca tendiendo a mantener su actividad promedio. La primera evidencia directa de este tipo de plasticidad homeostática se observó en neuronas corticales disociadas, en las que el bloqueo crónico de la actividad espontánea a través de la inhibición farmacológica de los canales de sodio activados por voltaje (tetrodotoxina, TTX, por 48 horas) produce un aumento en la excitabilidad, mediado por el aumento de las conductancias de sodio y la disminución de conductancias de potasio dependientes de voltaje, lo que se traduce en un umbral de disparo disminuido, y una mayor frecuencia de descargas ante la inyección de corriente (Desai y cols. 1999). Este tipo de plasticidad, al igual que el escalamiento sináptico, se

manifiesta en un curso temporal de horas a días, a diferencia de las modificaciones en la excitabilidad producto de la estimulación Hebbiana, que ocurren en el curso de minutos.

La plasticidad homeostática de las propiedades intrínsecas también se produce *in vivo* en respuesta a privación sensorial. El corte de bigotes produce una disminución en la I_h dendrítica en neuronas de la corteza somatosensorial, posibilitando el desarrollo de espigas de calcio que a su vez participan en un aumento de las ráfagas de potenciales de acción (Breton y Stuart 2009). Un fenómeno similar se da en la corteza visual, donde ante la privación sensorial se observa un aumento en la actividad espontánea de las neuronas piramidales de la capa 2/3, debido a una disminución en el umbral de disparo (Maffei y Turrigiano 2008).

La estimulación optogenética crónica de neuronas individuales en cultivo produce un desplazamiento hacia distal del segmento inicial del axón (en el que se concentran los canales de sodio que gatillan el potencial de acción), aumentando la corriente somática necesaria para disparar un potencial de acción (Grubb y Burrone 2010). Un protocolo similar de activación crónica de neuronas individuales, esta vez en neuronas piramidales de CA1, induce, junto con la depresión de la transmisión glutamatérgica, un aumento del umbral de disparo del potencial de acción (Goold y Nicoll 2010).

En el mismo sentido, la hiperactivación de cultivos organotípicos de hipocampo mediante el bloqueo de la transmisión inhibitoria rápida, produce una disminución en la excitabilidad intrínseca, medida como la relación entre la frecuencia de disparo y la corriente inyectada, que se correlaciona con un aumento en el umbral de disparo del potencial de acción (Karmarkar y Buonomano 2006). La inactividad crónica, a su vez,

genera un aumento de la excitabilidad en las neuronas de CA1 de rebanadas organotípicas hipocampales (Karmarkar y Buonomano 2006), pero no se ha determinado qué mecanismos moleculares median estas adaptaciones homeostáticas. En la presente tesis, se intenta dar luces sobre el mecanismo de esta compensación de la excitabilidad.

Canales de calcio dependientes de voltaje en plasticidad homeostática

Los canales de calcio dependientes de voltaje son uno de los sensores por excelencia de la actividad neuronal en la señalización celular, ya que en respuesta a despolarizaciones importantes, como la que ocurre durante los potenciales de acción, dada su localización somatodendrítica permiten el ingreso de calcio, que es, a su vez, capaz de activar diversas cascadas de señalización (Simms y Zamponi 2014).

En fenómenos de plasticidad homeostática, se ha encontrado en particular la participación de los canales de calcio tipo L. En cultivos de neuronas dissociadas, el bloqueo de la entrada de calcio por canales de calcio tipo L imita total o parcialmente fenómenos de compensación homeostática sináptica a distintos paradigmas de inactividad crónica (Ibata y cols. 2008; Thiagarajan y cols. 2005). También se ha encontrado la participación de canales de calcio tipo L en la adaptación sináptica a la hiperactividad crónica. En rebanadas organotípicas hipocampales, un protocolo de estimulación optogenética crónica que genera una disminución generalizada de la potencia sináptica glutamatérgica, no tiene efecto si se bloquean concomitantemente los canales de calcio tipo L (Goold y Nicoll 2010). Este posible rol bidireccional como sensor de actividad en fenómenos homeostáticos lo hace por ende un importante candidato de estudio para la plasticidad de la excitabilidad intrínseca.

Quinasas dependientes de calcio/calmodulina en plasticidad homeostática

Las quinasas dependientes de calcio/calmodulina (CaMKs) son reguladores fundamentales de procesos de plasticidad dependientes de actividad (Wayman y cols. 2008; Wayman y cols. 2011).

CaMKII es la proteína más abundante del sistema nervioso central, y está especialmente enriquecida en las sinapsis glutamatérgicas. Tras su activación por calcio-calmodulina, CaMKII se autofosforila, independizándose parcialmente del calcio hasta ser desfosforilada por fosfatasas de proteínas. Esta propiedad es fundamental para la LTP y el aprendizaje, ya que si se bloquea la activación o la fosforilación de CaMKII, no es posible la inducción de LTP (Malinow y cols. 1989; Giese y cols. 1998; Silva, Stevens, y cols. 1992) y se ve afectada la memoria espacial (Silva, Paylor, y cols. 1992; Giese y cols. 1998).

Debido a que la plasticidad de la excitabilidad intrínseca es un fenómeno que se ha comenzado a estudiar más recientemente que la plasticidad sináptica, es muchísimo menos lo que se sabe de la posible participación que tendría CaMKII. En neuronas piramidales de CA1 del hipocampo se requiere la activación de CaMKII para la disminución del umbral de disparo (Xu y cols. 2005) y el aumento de la sumación de potenciales sinápticos (Wang y cols. 2003) que se produce luego de estimulaciones agudas que generan LTP. Adicionalmente, CaMKII es capaz de determinar el cambio de la tasa de descarga tónica de neuronas del núcleo vestibular (Nelson y cols. 2005) fosforilando directamente el canal de potasio activado por calcio de tipo BK (van Welie

y du Lac 2011). En los anteriores ejemplos de procesos de plasticidad de la excitabilidad dependientes de CaMKII, los cambios ocurren en el curso de minutos tras la estimulación.

CaMKIV, por su parte, es un candidato muy plausible como mediador entre la actividad y la plasticidad neuronal a mediano-largo plazo, debido a su localización principalmente nuclear, su dependencia de calcio/calmodulina y su capacidad de fosforilar a la proteína de unión al elemento de respuesta a cAMP (CREB) y su coactivador, la proteína de unión a CREB (CBP), promoviendo la transcripción de sus múltiples genes blanco (Bito y cols. 1996; Impey y cols. 2002; Impey y cols. 2004; Wayman y cols. 2011).

Adicionalmente, CaMKIV se ha visto implicada directamente en fenómenos de plasticidad homeostática. En neuronas corticales disociadas, la sobreexpresión de un dominante negativo de CaMKIV es suficiente para imitar completamente el escalamiento sináptico en respuesta a inactividad crónica (Ibata y cols. 2008). En la misma línea, en rebanadas organotípicas se ha observado una disminución global de los pesos sinápticos en respuesta a hiperactividad por estimulación optogenética crónica, y dicha compensación homeostática no ocurre si se transfectan las neuronas con el dominante negativo de CaMKIV (Goold y Nicoll 2010). Sin embargo, está aún por demostrarse qué tan generalizado es este rol bidireccional de CaMKIV, y si es capaz de regular la excitabilidad.

Modelo y propuesta de estudio

Siendo las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo un modelo en que se ha realizado una caracterización bastante acabada de las conductancias, tanto sinápticas como dependientes de voltaje (Bean 2007), resultan un modelo ideal para estudiar la plasticidad homeostática de la excitabilidad. El cultivo organotípico de rebanadas hipocampales permite manipulaciones crónicas, imprescindibles para comprender fenómenos de plasticidad de largo plazo. A diferencia del cultivo de neuronas disociadas, en el que se ha hecho la mayoría de los estudios de plasticidad homeostática (Turrigiano 2008), el cultivo organotípico hipocampal posee una conectividad y organización relativamente similar a la del cerebro *in vivo*, incluyendo, por ejemplo, una correcta citoarquitectura de las células gliales, que son determinantes en los procesos de plasticidad homeostática (Stellwagen y Malenka 2006; Ibata y cols. 2008). Finalmente, el cultivo organotípico hipocampal posee una intensa actividad basal (Fig. Fig. 3c y 4b), fundamental para evaluar cambios ante la inactividad crónica.

En la presente tesis se estudió, mediante registros de tipo *whole cell*, los cambios en la excitabilidad de neuronas piramidales de CA1 de rebanadas hipocampales de rata neonata producidos en respuesta a la disminución crónica de la actividad. Una vez identificados dichos cambios se evaluó qué tanto contribuyen los cambios sinápticos con respecto a los intrínsecos, y finalmente se encontraron componentes del mecanismo de señalización que gatilla la adaptación de la excitabilidad a la inactividad crónica.

Hipótesis

En el circuito hipocampal de rata *ex vivo* existe un aumento de la excitabilidad dependiente del cierre de canales de calcio durante la inactividad crónica.

Objetivo general

Caracterizar el mecanismo de adaptación de la excitabilidad a la inactividad crónica en neuronas piramidales de CA1 de hipocampo de rata y su dependencia de calcio.

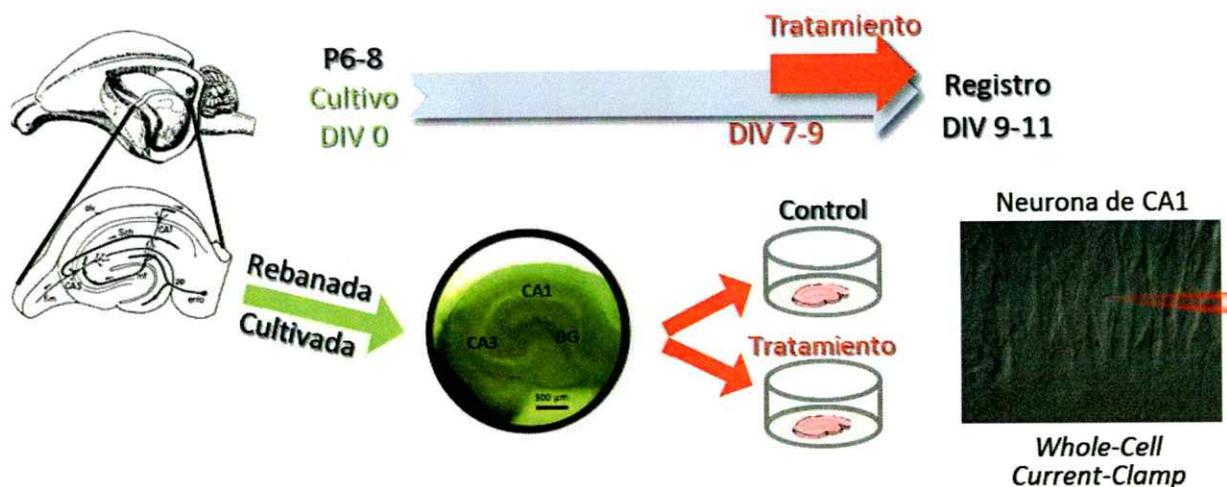
Objetivos específicos

0. Implementar la metodología de cultivo organotípico hipocampal.
1. Caracterizar los cambios en la excitabilidad de neuronas piramidales de CA1 en respuesta a inactividad crónica.
2. Discernir si los cambios encontrados en la excitabilidad se deben a propiedades intrínsecas o sinápticas.
3. Dilucidar el mecanismo de señalización que media los cambios en la excitabilidad producidos por inactividad crónica.

Metodología

Procedimiento general

Todos los experimentos realizados en el presente trabajo se apegan a las normas del comité de bioética de la Universidad de Chile. Cultivos organotípicos de rebanadas hipocampales de rata neonata fueron incubados con TTX para suprimir la actividad de manera crónica, y se registraron en modalidad *whole-cell* los cambios en la excitabilidad de las neuronas piramidales de CA1 tras el retiro del bloqueador. Para la evaluación de la función de los distintos componentes de la posible vía de señalización propuesta, se inhibió farmacológicamente cada componente durante los mismos 3-4 días que se aplicó el protocolo de inactividad crónica, y se compararon células de rebanadas con y sin el inhibidor respectivo.



Preparación de cultivo organotípico hipocampal

Las rebanadas hipocampales se obtuvieron de ratas Sprague Dawley de 6 a 8 días posnatal (P6-P8). En promedio se obtienen 12 rebanadas por animal. Se cortaron rebanadas de 400 μm en solución de disección fría (4°C) que contiene (en mM): 248 sacarosa, 3 KCl, 26 NaHCO₃, 1 NaH₂PO₄, 1 CaCl₂, 5 MgCl₂ y 20 glucosa (300–305 mOsm), burbujeada hasta saturación con 95% O₂ y 5% CO₂ (pH 7,3). Las rebanadas se depositaron sobre la membrana (0,4 μm de diámetro de poro) de un inserto de cultivo de interfaz (Falcon™ *cell culture inserts*), en medio de cultivo MEM suplementado con: 20% suero equino, 1 mM CaCl₂, 2 mM MgSO₄, 5 mM NaHCO₃, 16,5 mM D-glucosa. Las rebanadas se mantienen a 37°C, cambiando de medio cada 2 días (Sanhueza y cols. 2011; Stoppini y cols. 1991).

Tratamiento farmacológico

A los 7-8 DIV se incubó parte de las rebanadas con medio de cultivo con el tratamiento farmacológico correspondiente. Tras 2 días se cambia el medio de cultivo por medio con igual concentración del compuesto a evaluar, y al cabo de 3-4 días (10-11 DIV) se trasladan rebanadas individuales a la cámara de superfusión, donde se realiza el registro tras el lavado de los respectivos inhibidores con solución de registro.

Registros electrofisiológicos

Los registros de tipo *whole-cell* se realizaron con un amplificador de *patch clamp* EPC10 (HEKA). El electrodo intracelular se introduce en pipetas de borosilicato de 3.5-4.5 M Ω con solución de pipeta que contiene (en mM): 130 K-gluconato, 5 KCl, 2

MgCl₂, 10 HEPES, 4 Mg-ATP, 0.3 Na₃-GTP y 10 Na₂-fosfocreatina. Como medio extracelular se empleó líquido cefalorraquídeo artificial (LCRA) que contiene (en mM): 125 NaCl, 2.5 KCl, 2 MgSO₄, 2 CaCl₂, 25 NaHCO₃; 1.5 NaH₂PO₄ y 10 de glucosa (burbujeado con mezcla O₂ 95%, CO₂ 5%).

Análisis estadístico

Los registros obtenidos son graficados y analizados estadísticamente utilizando el programa IgorPro (Wavemetrics). La significancia estadística se evaluó mediante pruebas de *t* y análisis de varianza (para los experimentos con dos o más factores, o tres o más grupos), con un nivel de significancia del 5%.

Resultados

Objetivo 0: Implementar la metodología de cultivo organotípico hipocampal

Verificación morfológica de la integridad de las rebanadas

El primer y más determinante paso en el desarrollo de la presente investigación fue la implementación del modelo de rebanadas organotípicas hipocampales de rata postnatal. Tras optimizar múltiples variables, como los medios de disección y cultivo o la técnica aséptica de disección y corte del tejido, se estableció un protocolo que permite la obtención de rebanadas de manera reproducible. La organización general del plano transversal del hipocampo se mantiene, pese a que con el correr de los días se produce cierta pérdida de definición de las capas debido a la dispersión lateral de las células (Fig. 1a). Dicha dispersión da lugar a un *stratum pyramidale* con el mismo grado de empaquetamiento que el de rebanadas agudas, pero unas cuatro veces más ancho en el sentido horizontal (Fig. 1b) y mucho más estrecho en el vertical (a los 11 días *in vitro*, la rebanada pasa de los 400 μm originales a medir hasta $\sim 80 \mu\text{m}$ de espesor).

Adicionalmente, se verificó la citoarquitectura de las neuronas de CA1, que representan el foco de esta investigación, utilizando trazadores morfológicos vitales (Fig. 2). En primer lugar se utilizaron inyecciones de tetrametilrodamina sobre CA1 a 11 días *in vitro* (Fig. 2a), lo que permite apreciar, por ejemplo, la separación entre cuerpos celulares en *stratum pyramidale*, y haces de axones en *stratum oriens* (Fig. 2b).



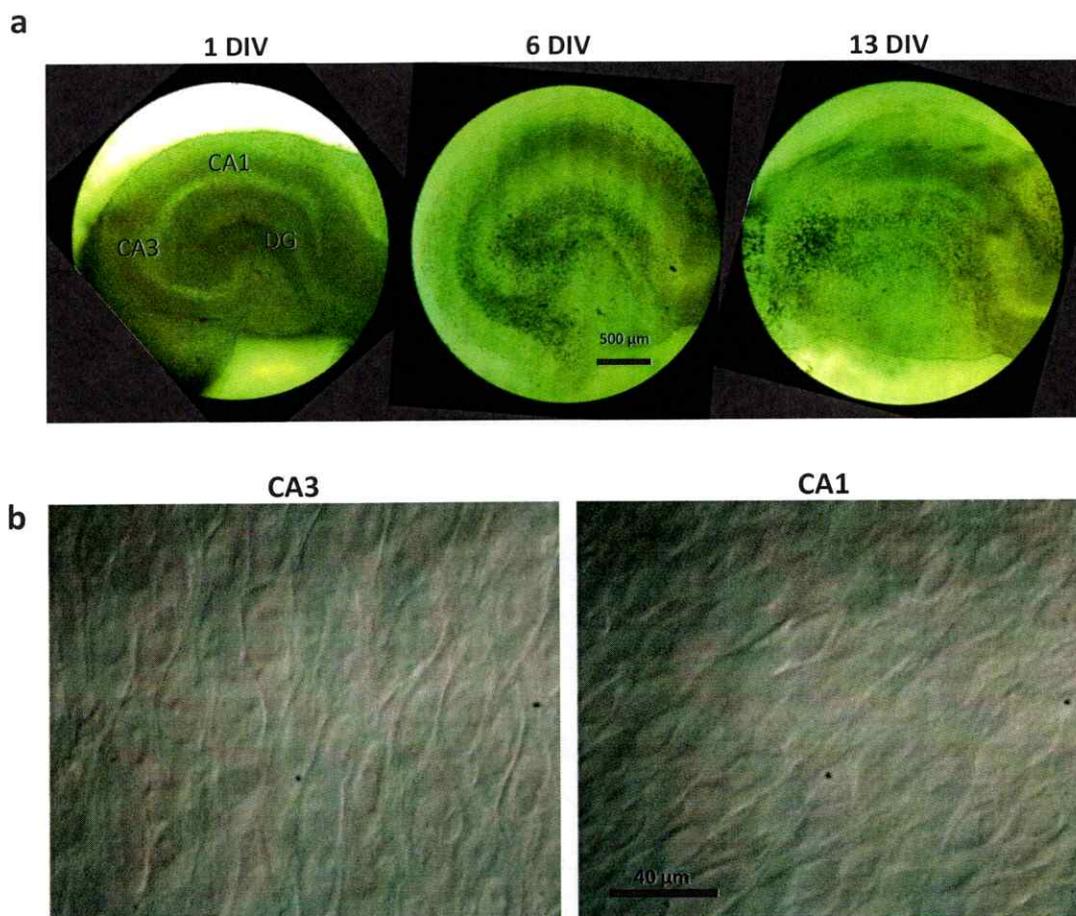


Figura 1: La arquitectura del cultivo organotípico hipocampal se preserva *ex vivo*.

a) Imágenes representativas de una misma rebanada a 1, 6 y 13 días *in vitro* (DIV) ilustrando que la morfología general se mantiene en la zona en estudio. DG, giro dentado. **b)** Imágenes representativas del *stratum pyramidale* de CA3 y CA1 en óptica Nomarski ilustrando la integridad celular al cabo de 11 DIV.

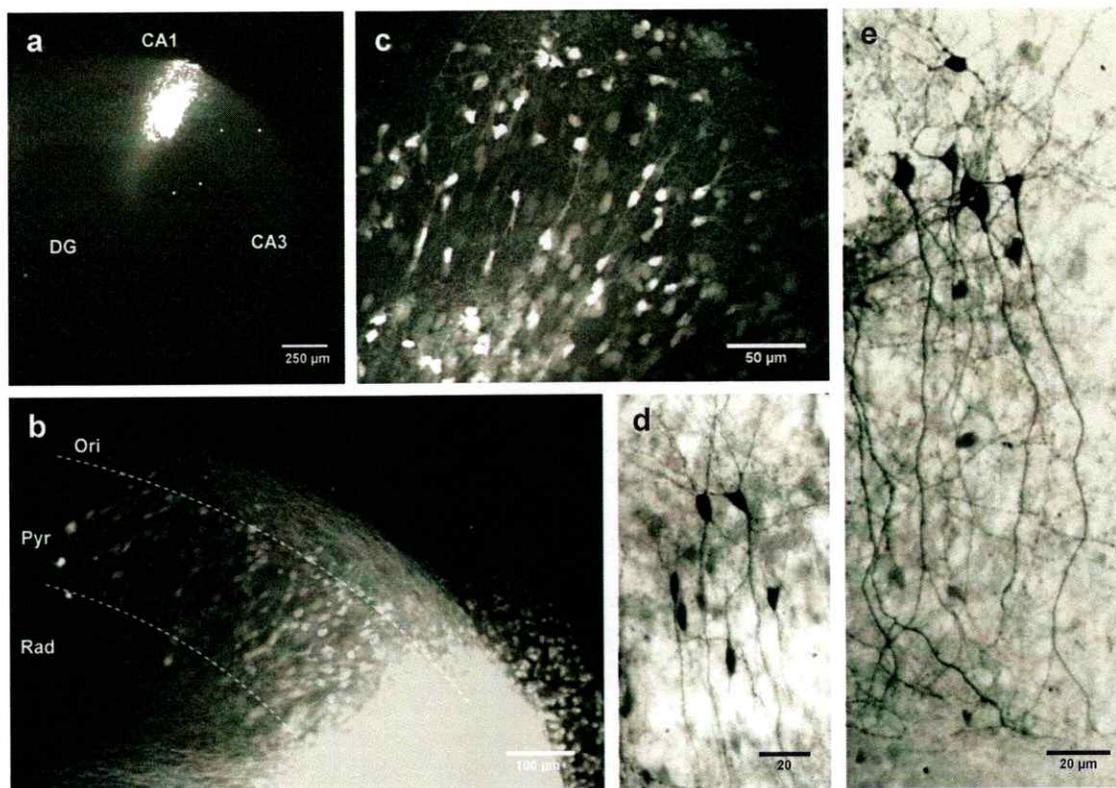


Figura 2: El marcaje de neuronas de CA1 confirma que se mantiene la citoarquitectura neuronal en las rebanadas cultivadas.

a) Se inyectó tetrametilrodamina en *stratum oriens* de CA1 de una rebanada de 11 DIV para que, luego de una incubación de 2 horas, se marque a través de los axones la región somatodendrítica de las neuronas piramidales. DG, giro dentado. **b)** Las neuronas más cercanas a la inyección presentan tanta marca que no se pueden individualizar bajo microscopía de epifluorescencia convencional, pero sí se pueden distinguir neuronas individuales marcadas retrógradamente (sus axones son visibles en *stratum oriens*) en las zonas aledañas. Ori, *stratum oriens*; Pyr, *stratum pyramidale*; Rad, *stratum radiatum*. **c)** La morfología somática de las neuronas más cercanas al sitio de inyección se puede resolver utilizando microscopía confocal. **d** y **e)** Imágenes representativas de neuronas individuales de CA1 presentes en rebanada de 11 DIV marcadas con biocitina.

Utilizando microscopía confocal se pueden distinguir células individuales, pero no es posible hacer un seguimiento completo de sus árboles dendríticos (Fig. 2c). Para esto último se utilizó como trazador cristales de biocitina ubicados en la porción distal de CA1, que a través del axón marcan retrógradamente células piramidales, logrando distinguirse arborizaciones dendríticas de células individuales (Fig. 2d y e). Con esta marcación se pueden apreciar claramente neuronas piramidales con dendritas apicales orientadas hacia *stratum radiatum*, dando cuenta de una correcta recapitulación de la citoarquitectura *in vivo*.

Verificación funcional de la transmisión sináptica en neuronas piramidales de CA1

Las características sinápticas de las neuronas son un buen indicador de la integridad del circuito hipocampal en las rebanadas organotípicas. En esta investigación el foco está en las neuronas principales de CA1, por lo que se verificó en primer lugar la funcionalidad de las sinapsis provenientes de CA3 a través de las colaterales de Schaffer, la sinapsis más estudiada en estas células (Fig. 3a y b). Estimulando en *stratum radiatum* y registrando en el *stratum pyramidale* (Fig. 3a) en modalidad *voltage clamp*, reemplazando el potasio por 130 mM de cesio en la solución de pipeta para aumentar la conductividad dendrítica y mejorar la fijación de voltaje, se obtienen corrientes postsinápticas evocadas con un curso temporal y dependencia de voltaje propios de la activación de receptores de tipo AMPA y NMDA (Fig. 3b). La razón de pulsos pareados muestra facilitación, característica de las sinapsis CA3→CA1 debido a su baja probabilidad de liberación (Fig. 3b). Adicionalmente, todas las neuronas registradas en la región CA1 de estas rebanadas presentan una profusa transmisión espontánea (Fig. 3c y d), lo que evidencia que se logra reproducir en estas rebanadas una red neuronal activa.

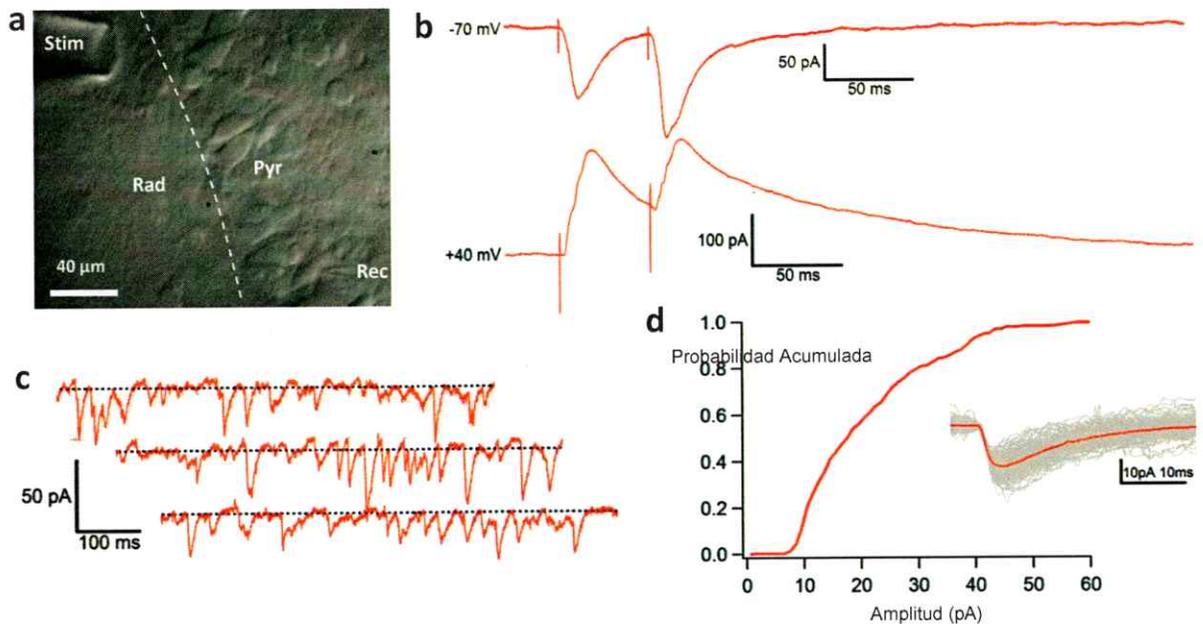


Figura 3: La transmisión sináptica de neuronas de CA1 se mantiene en el cultivo organotípico hipocampal.

a) Localización de la pipeta con el electrodo de estimulación (Stim) en *stratum radiatum* (Rad) y la pipeta de *patch clamp* (Rec) en una neurona de *stratum pyramidale* (Pyr). **b)** La transmisión sináptica evocada en modalidad *voltage clamp* permite evaluar la dependencia de voltaje de las corrientes sinápticas, obteniéndose a -70 mV una respuesta mediada principalmente por receptores de tipo AMPA, con un curso temporal más rápido, y a $+40$ mV por receptores tanto de tipo AMPA como NMDA. Estos últimos prolongan considerablemente el tiempo de caída de la respuesta. Se muestran respuestas a pulsos pareados separados por 50 ms para evaluar el componente presináptico. **c)** Ejemplo de corrientes postsinápticas espontáneas registradas a -70 mV. **d)** Función de distribución acumulada (CDF) de la amplitud de los eventos espontáneos. El inserto muestra el trazo promedio los eventos de una célula representativa.

Objetivo 1: Caracterizar los cambios en la excitabilidad de neuronas piramidales de CA1 en respuesta a inactividad crónica

Para estudiar los cambios de la excitabilidad intrínseca producidos por la inactividad crónica en neuronas de CA1 se realizaron registros de tipo *whole cell* en modalidad *current clamp*. En primer lugar, se verificó el efecto agudo que tiene la aplicación de TTX en neuronas de una red activa como la presente en el cultivo organotípico hipocampal (Fig. 4). Al aplicar TTX 1 μM al LCRA durante el registro, se puede apreciar que la neurona no sólo pierde la capacidad de generar potenciales de acción (Fig. 4a), sino que también desaparece la intensa actividad sináptica que presentan espontáneamente las neuronas, tanto a potencial de reposo como a potencial periumbral (Fig. 4b).

La inactividad crónica aumenta la excitabilidad de las neuronas de CA1

Con el fin de evaluar el efecto que esta total inactividad tiene de manera crónica, se mantuvieron rebanadas de 7/8 días *in vitro* en inactividad por 3-4 días con TTX 1 μM , y se registraron células de CA1 de rebanadas control y rebanadas tratadas, previo lavado del bloqueador. Se evaluó en primer lugar la principal medida de excitabilidad, que corresponde a la curva de frecuencia *versus* corriente, es decir, la frecuencia de disparo en respuesta a la inyección de una serie de pulsos de corriente despolarizante de diferentes amplitudes (Fig. 5).

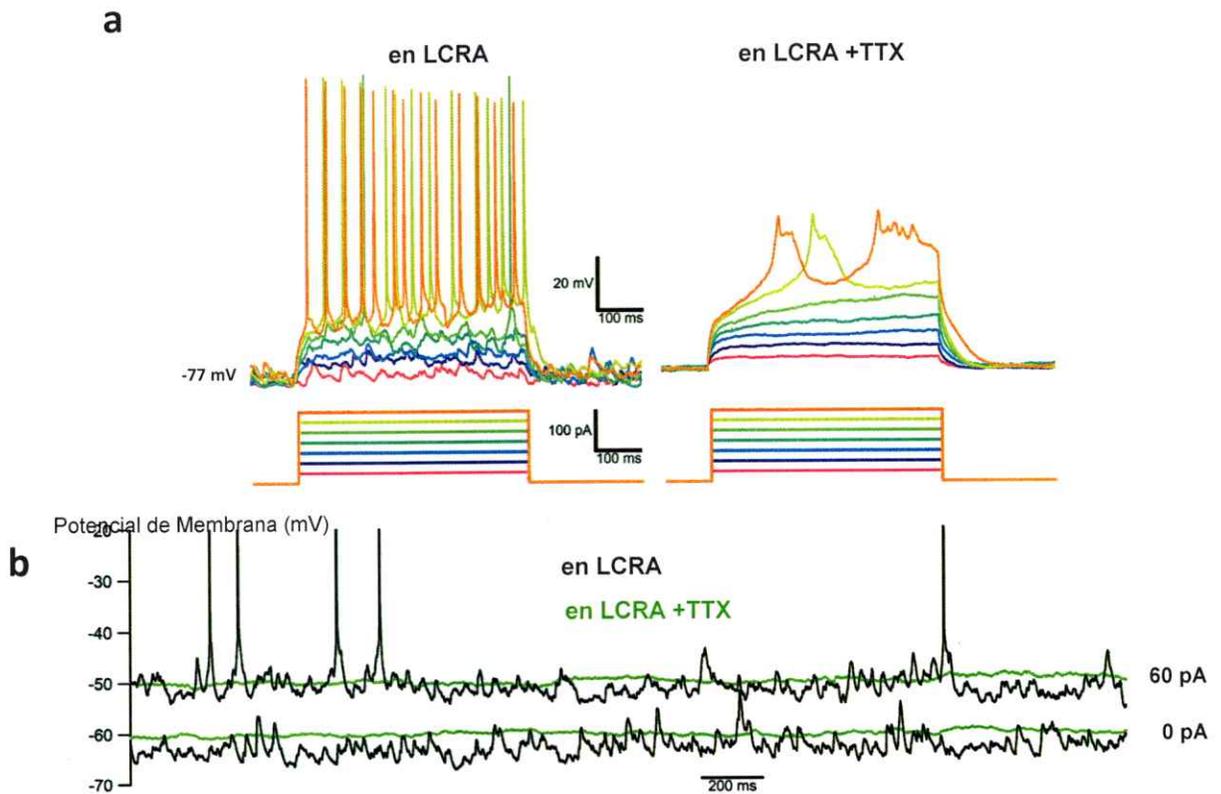


Figura 4: Efecto de la aplicación aguda de TTX sobre las neuronas de CA1.

a) Registro representativo de la respuesta del potencial de membrana de una neurona a estímulos cuadrados de corriente despolarizante antes (izquierda) y después (derecha) de la aplicación de TTX 1 μ M. El trazo de cada color es la respuesta al estímulo de corriente (abajo) del color correspondiente. **b)** Registros del potencial de membrana sin inyección de corriente (trazos inferiores) y con aplicación de una corriente despolarizante constante de 60 pA (trazos superiores) en una neurona antes (negro) y después (verde) de la aplicación de TTX 1 μ M. Los potenciales de acción se encuentran truncados a -20 mV.

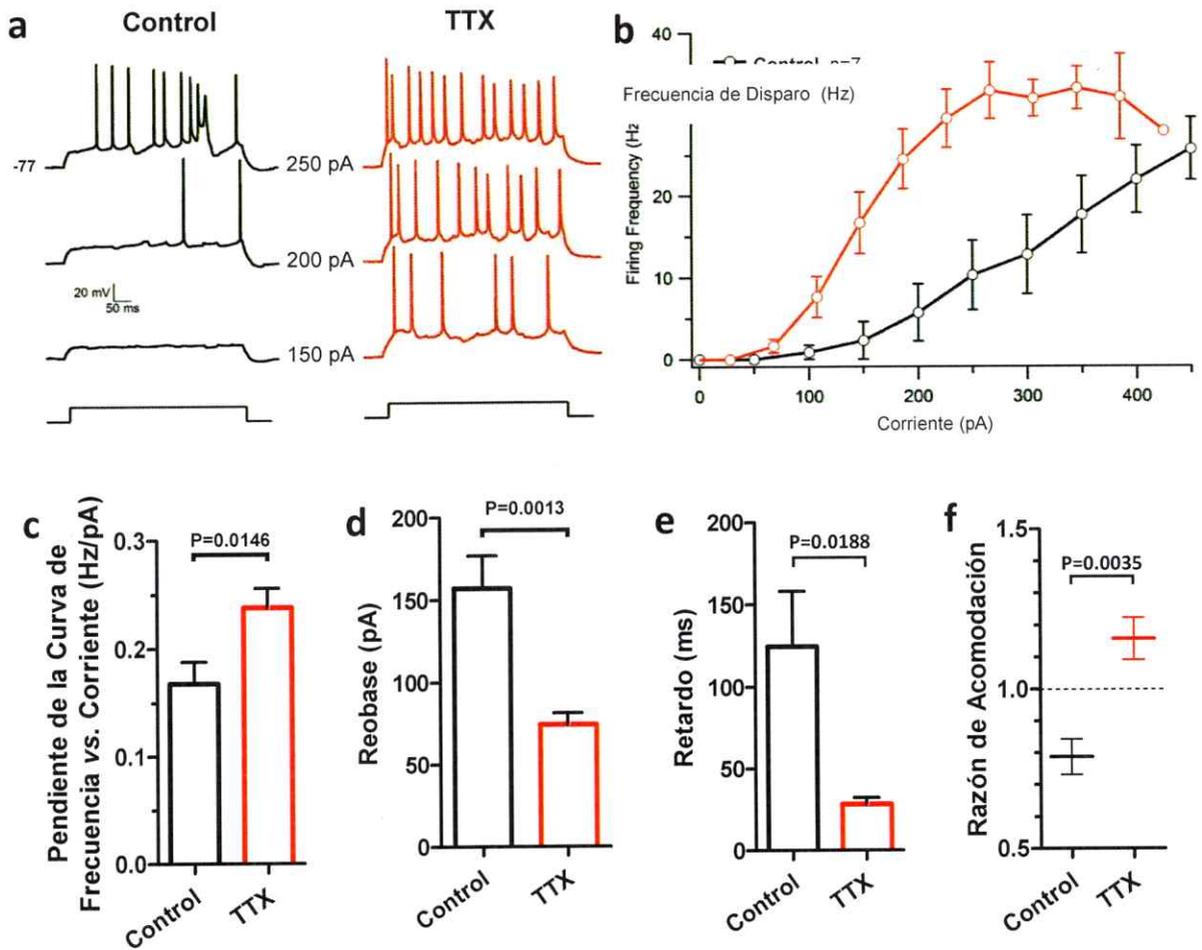


Figura 5: La inactividad crónica aumenta la excitabilidad de las neuronas piramidales de CA1.

a) Trazos representativos del patrón de disparo en respuesta a la inyección de pulsos de corriente de amplitudes crecientes. Las rebanadas tratadas con TTX fueron registradas previo lavado de la droga. **b)** Promedio de las curvas de frecuencia de disparo *versus* corriente para las distintas neuronas registradas en ambas condiciones. **c)** Resumen de los valores de las pendientes de regresiones lineales efectuadas en la porción lineal de la curva de frecuencia *vs.* corriente de cada célula. **d)** Resumen de los valores de rebase, estimados a partir de las mismas curvas como la corriente más baja capaz de provocar al menos un potencial de acción. **e)** Medición del retardo entre el inicio del pulso despolarizante de 200 pA y el primer potencial de acción. **f)** Razón de acomodación medida como la división entre la frecuencia instantánea de los primeros 4 y los últimos 4 potenciales de acción de cada ráfaga.

Las neuronas de rebanadas sometidas a inactividad crónica muestran una frecuencia de disparo mayor que las neuronas control en respuesta a corrientes de igual magnitud (Fig. 5a-b), y la pendiente de la porción lineal (previo a la saturación de la respuesta) de las curvas de frecuencia *versus* corriente aumenta significativamente con el tratamiento crónico con TTX (Fig. 5c), evidenciando un aumento en la excitabilidad. Esta mayor excitabilidad inducida por la inactividad crónica también se ve reflejada en una disminución de la reobase, medida indirectamente como la corriente despolarizante más baja a la que la neurona dispara al menos una vez (Fig. 5d). Esta modificación de la función entrada-salida implica que inmediatamente después de remover la inactividad crónica las neuronas se encuentran más propensas a disparar ante un estímulo dado, alterando su rol en el circuito.

Existen además cambios notorios en el patrón de respuesta a la estimulación despolarizante que se produce tras el tratamiento crónico con TTX. Uno es el tiempo que tarda en producirse el primer potencial de acción dentro de cada tren de disparos (Fig. 1e), lo que sugiere una disminución de conductancias de potasio dependientes de despolarización subumbral, como la I_D (Storm 1988). El otro cambio es el gran aumento que se observa en las neuronas tratadas en la razón de acomodación, medida de cómo disminuye la frecuencia de disparo a lo largo de una ráfaga de disparos. Una razón de acomodación igual a 1 indicaría que la frecuencia de disparo se mantiene constante a lo largo de la ráfaga. Las neuronas control muestran una razón de acomodación menor a 1, debido a que su tasa de disparo va aumentando a lo largo del tren, mientras que las neuronas de rebanadas sometidas a inactividad crónica muestran acomodación superior a 1, disminuyendo su frecuencia de disparo durante la ráfaga (Fig. 5f). Esto apuntaría a un

aumento, en las neuronas tratadas, de corrientes de potasio dependientes de calcio relativamente lentas, como la mediada por canales SK, o como la mediada por los canales KCNQ, activados por despolarización (Storm 1990). Cabe señalar que podría de todas maneras no haber cambio en dichas corrientes, y ser la acomodación exacerbada sólo un epifenómeno del impedimento para mantener una tasa de descarga tan grande como la que se presenta al inicio de las ráfagas de las neuronas tratadas con TTX.

La resistencia de membrana aumenta tras el tratamiento con TTX

A continuación se procedió a investigar qué cambio electrofisiológico específico subyace a este aumento de la excitabilidad inducido por la inactividad crónica. El primer paso fue estudiar el umbral de disparo del potencial de acción que, en caso de disminuir, podría explicar el aumento de la excitabilidad, como se ha observado en paradigmas de adaptación a la inactividad en cultivos de neuronas corticales disociadas (Desai y cols. 1999). Para esto, en neuronas de rebanadas mantenidas en condiciones normales o inactivadas crónicamente, se inyectó una rampa de corriente que despolariza gradualmente la célula hasta que comienza a disparar, lo que permite identificar el potencial al que se gatilla la primera espiga (en adelante referido como umbral de disparo; Fig. 6a y b), y la corriente a la cual se produce ese primer disparo (en adelante referida como corriente umbral Fig. 6a y c).

El resultado obtenido es un incremento del umbral de disparo en las neuronas de rebanadas sometidas crónicamente a TTX (Fig. 6b), por lo que no es ésta la variable que explica el aumento en la excitabilidad de dichas neuronas. La corriente umbral, en

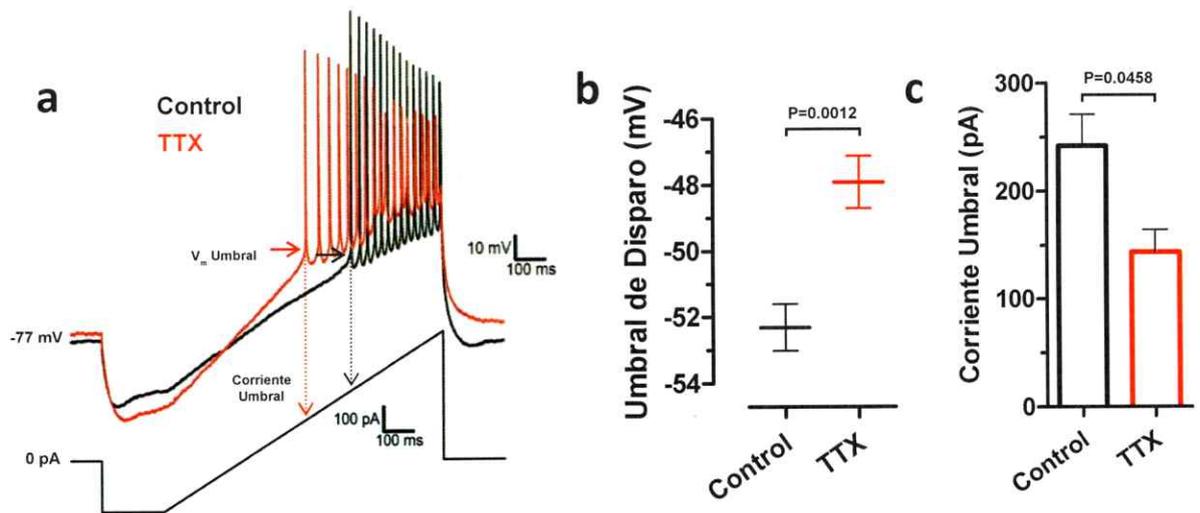


Figura 6: La inactividad crónica aumenta el umbral de disparo y disminuye el umbral de corriente.

a) Trazos representativos de la respuesta a la inyección de una rampa de corriente creciente (550 pA/s) en neuronas de rebanadas en ambas condiciones. De esta manera se puede medir el potencial al que se dispara la primera espiga. **b)** Resumen del umbral de disparo medido mediante este protocolo en rebanadas tratadas con TTX (n=9) y rebanadas control (n=7). Los valores de potencial han sido corregidos por potencial de juntura, ~12 mV dadas las soluciones empleadas. **c)** Resumen de los valores de corriente umbral medidos en ambas condiciones.

cambio, disminuye significativamente con la inactividad crónica (Fig. 6c), lo que sugiere que en el aumento de la excitabilidad hay implicada una mayor resistencia de membrana, que hace, por ley de Ohm, que un estímulo creciente de corriente se traduzca en una despolarización más pronunciada (como se puede apreciar comparando las pendientes de la respuesta de voltaje en la Fig. 6a). La disminución de la corriente umbral se condice además con menor reobase observada en rebanadas sometidas a inactividad crónica (Fig. 5e), lo que resulta también consistente con un aumento en la resistencia de membrana.

La evaluación de un posible cambio en la resistencia de membrana tras la inactividad crónica se realizó a través de la inyección de pulsos cuadrados de corriente hiperpolarizante de amplitud relativamente pequeña (para minimizar la contribución de conductancias activas), obteniendo la resistencia de membrana al dividir la amplitud de la respuesta de voltaje por el pulso de corriente (Fig. 7a). En las células de rebanadas sometidas a inactividad crónica, la resistencia de membrana aumenta un 65%, pasando de $115.3 \pm 10.46 \text{ M}\Omega$ (n=13) en rebanadas control a $190.4 \pm 12.73 \text{ M}\Omega$ (n=12) en rebanadas tratadas con TTX (Fig. 7b).

Para verificar que el aumento observado en la respuesta de voltaje en las neuronas sometidas a inactividad crónica no sea un fenómeno que se manifiesta exclusivamente en el rango de potencial de membrana en el que se realizan los pulsos, se midió la resistencia mediante otro método, en el que se aplica una rampa de corriente desde hiperpolarizante hasta despolarizante, y se divide la pendiente del tramo más lineal de la respuesta de voltaje por la pendiente de la curva de corriente, obteniéndose una medida de la resistencia (Fig. 7c).

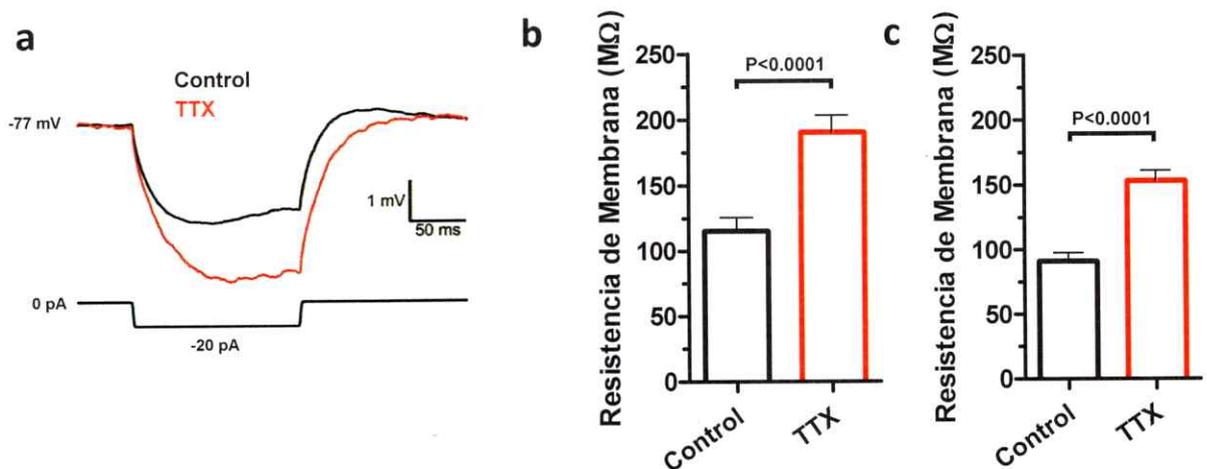


Figura 7: El tratamiento crónico con TTX aumenta la resistencia de membrana de las neuronas de CA1.

a) Trazos promedio de la respuesta a un pulso levemente hiperpolarizante en neuronas representativas de ambas condiciones. A partir de la amplitud de la respuesta de voltaje se calcula la resistencia. b) Resumen de mediciones de resistencia de membrana en rebanadas control (n=13) y rebanadas inactivadas crónicamente (n=12). c) Resumen de mediciones de resistencia de membrana calculada como la división entre la pendiente del segmento lineal de la respuesta de voltaje a una rampa de corriente y la pendiente de la corriente.

Este aumento de resistencia provoca que el cambio del potencial de membrana en respuesta a una corriente determinada sea mayor, y podría ser por ende ser el responsable del aumento de la excitabilidad que sucede a la inactividad crónica.

Objetivo 2: Discernir si los cambios encontrados en la excitabilidad se deben a propiedades intrínsecas o sinápticas

Se ha descrito que existen cambios en las sinapsis, tanto glutamatérgicas (Kim y Tsien 2008; Turrigiano y cols. 1998) como GABAérgicas (Karmarkar y Buonomano 2006; Kilman y cols. 2002) en respuesta a distintos paradigmas de inactividad crónica. Existe, entonces, la posibilidad de que el aumento en la excitabilidad y la resistencia de membrana que se detectó en las neuronas de CA1 tras ser sometidas a inactividad crónica sea producto de dichos cambios sinápticos.

Contribución de conductancias sinápticas a la hiperexcitabilidad por inactividad crónica

Con el objetivo de evaluar la contribución sináptica al aumento en la excitabilidad, se realizaron curvas de frecuencia *versus* corriente en rebanadas tratadas crónicamente con TTX y rebanadas control bloqueando, en el momento del registro, las principales sinapsis rápidas utilizando CNQX 10 μ M y PTX 100 μ M, que actúan sobre receptores glutamatérgicos de tipo AMPA y de receptores GABA_{A/C}, respectivamente (Fig. 8). En estas condiciones, las diferencias entre las curvas de rebanadas control y rebanadas crónicamente inactivas dejan de ser significativas (Fig 8), sugiriendo que las conductancias sinápticas juegan un rol en la adaptación de la excitabilidad a la inactividad.

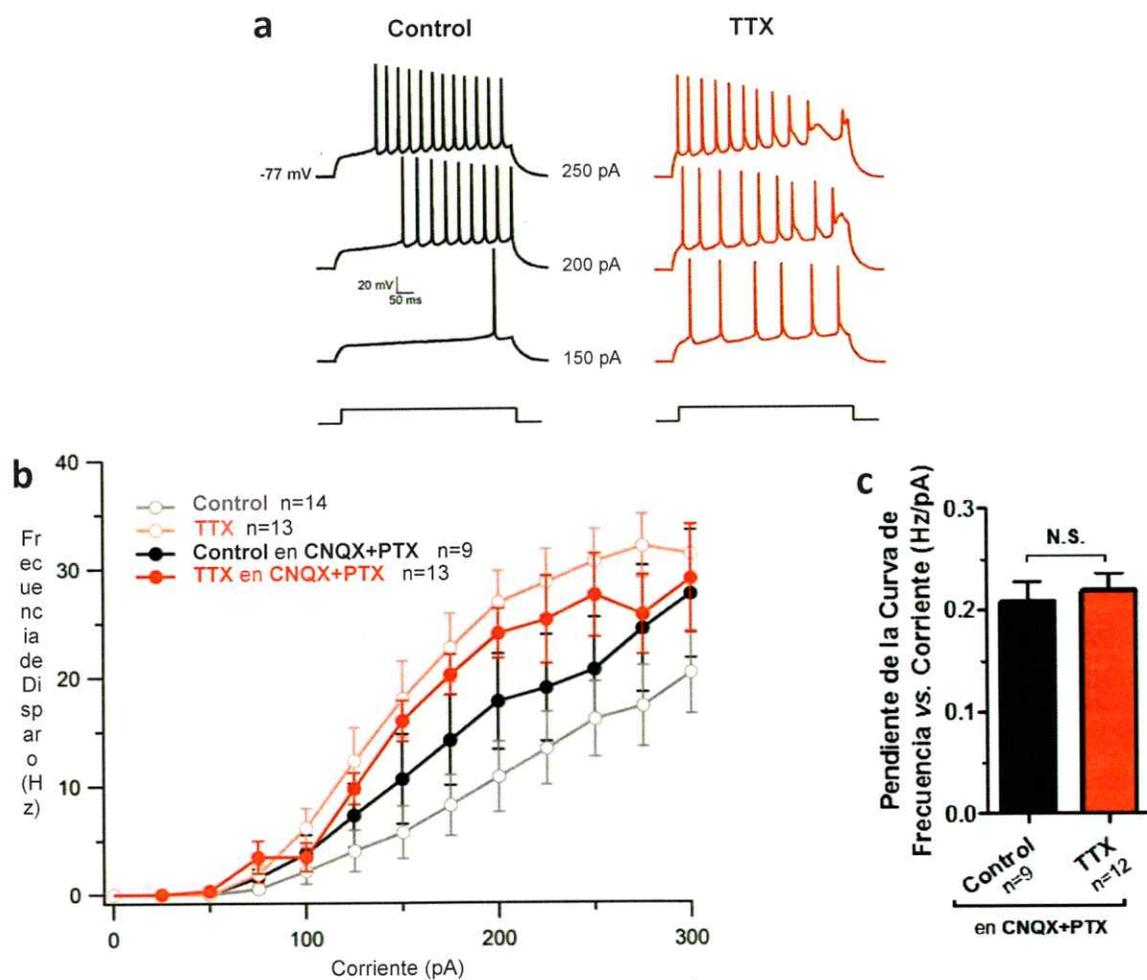


Figura 8: Efecto de inactividad crónica registrado en presencia de bloqueadores sinápticos.

a) Trazos representativos de respuesta a la inyección de pulsos de corriente de amplitudes crecientes en neuronas registradas en presencia de CNQX 10 μ M y PTX 100 μ M. **b)** Promedio de las curvas de frecuencia vs. corriente. **c)** Resumen de las pendientes de la curva de frecuencia vs. corriente de neuronas registradas en presencia de CNQX y PTX.

Aumento de resistencia tras tratamiento con TTX se debe principalmente a cambios intrínsecos

Dado que después de la inactividad crónica la resistencia de membrana medida sin bloqueadores sinápticos aumenta considerablemente (Fig. 7), una posible explicación de la atenuación que se observa en el efecto de la inactividad crónica al evaluarlo con las sinapsis bloqueadas, es que la contribución de éstas a la resistencia total de la membrana sea importante en condiciones control, y el tratamiento crónico con TTX disminuya fuertemente el tono sináptico, aumentando la resistencia de la membrana, y con ella la excitabilidad intrínseca. Se examinó, por ende, el cambio en la resistencia de membrana de las neuronas de rebanadas sometidas a inactividad crónica y rebanadas control en presencia de CNQX y PTX (Fig. 9).

Tanto en rebanadas tratadas crónicamente con TTX como en rebanadas control, las células registradas en presencia de bloqueadores sinápticos no presentan una resistencia de membrana significativamente distinta a la de las células registradas en condiciones normales (Fig. 9). Esto indica que la contribución de las conductancias sinápticas a la conductancia total de la membrana (recíproco de la resistencia) es despreciable comparada con las conductancias intrínsecas de las neuronas de CA1 de rebanadas organotípicas sometidas a tratamiento con TTX o rebanadas control. Por tanto, las conductancias sinápticas no son las responsables del aumento en la resistencia de membrana inducido por la inactividad crónica.

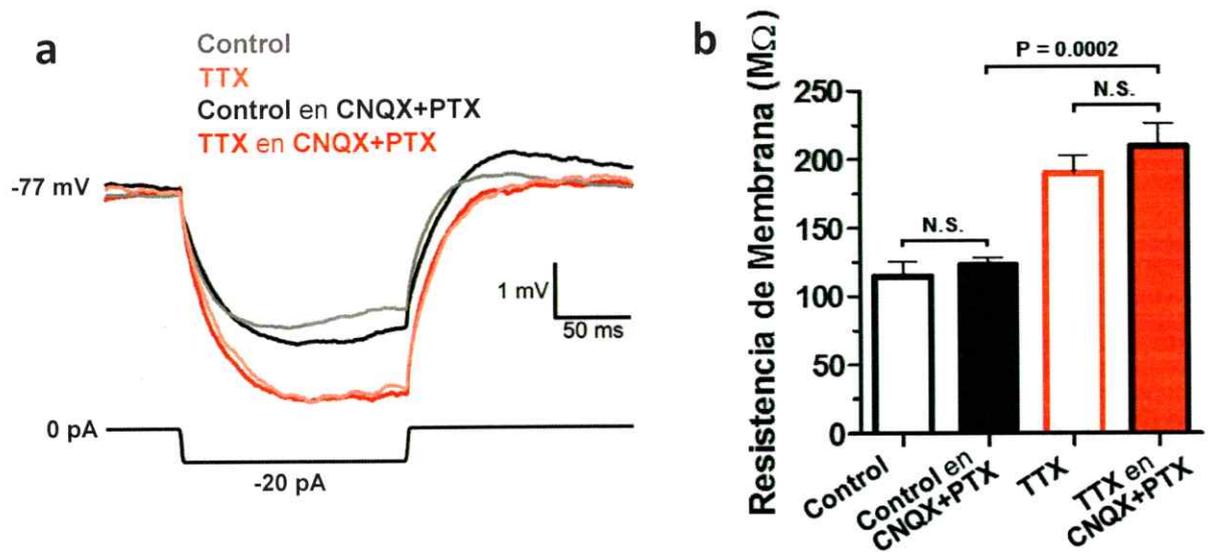


Figura 9: El aumento de resistencia de membrana inducido por TTX no se ve alterado en presencia de bloqueadores sinápticos.

a) Trazos promedio de la respuesta a un pulso hiperpolarizante en neuronas representativas. **b)** Resumen de la resistencia de membrana medida en rebanadas control sin ($n=13$) y con ($n=10$) CNQX y PTX en el LCRA, y rebanadas sometidas a inactivación crónica registradas sin ($n=12$) y con ($n=13$) bloqueadores sinápticos.

Estos resultados en su conjunto sugieren que las conductancias sinápticas contribuyen parcialmente al aumento de la excitabilidad inducido por la inactividad crónica, pero no lo hacen participando en el aumento de la resistencia de membrana. Esta y otras posibles interpretaciones serán discutidas más adelante.

Evaluación de posible rol de I_h y conductancias pasivas de potasio

En vista de que el aumento de la resistencia de membrana depende exclusivamente de factores intrínsecos, a continuación se buscó determinar las conductancias intrínsecas potencialmente responsables por el aumento de la resistencia de membrana tras la inactividad crónica. La explicación más plausible para el aumento de la resistencia debido a factores intrínsecos podría ser una disminución de las conductancias de potasio constitutivamente activas, dado que son las principales determinantes del potencial de reposo y la resistencia de membrana a dicho potencial. Para esto se midió en las neuronas de rebanadas control y rebanadas incubadas crónicamente con TTX el potencial de membrana promedio en ausencia de corriente inyectada, lo que, tal como el potencial de reposo, depende directamente de las conductancias que se encuentren espontáneamente abiertas. El potencial en ausencia de corriente se encuentra significativamente más hiperpolarizado en las neuronas sometidas a inactividad crónica (Fig. 10a). Esto puede deberse a un aumento de las conductancias de potasio constitutivamente abiertas, pero eso significaría una disminución y no un aumento de la resistencia, y por lo tanto no explica el cambio de resistencia observado tras TTX.

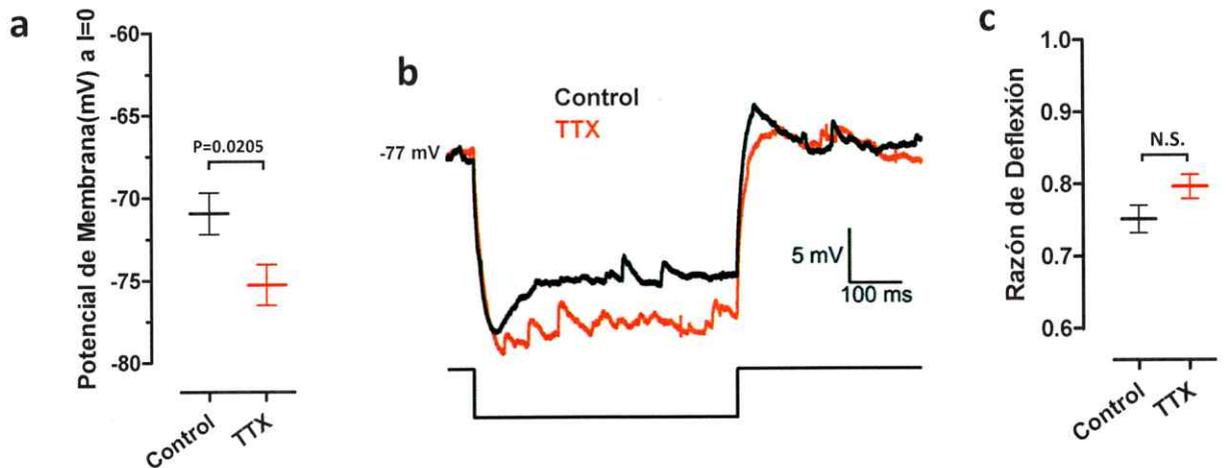


Figura 10: Ni la corriente h ni corrientes pasivas de potasio aparecen como responsables del aumento en la resistencia de membrana.

a) Resumen del potencial de membrana promedio registrado. **b)** Trazos promedio de la respuesta a un pulso hiperpolarizante (de 175 pA de amplitud en la neurona control y -100 pA en la neurona preincubada con TTX) en neuronas representativas. Nótese que la respuesta, en lugar de ser una curva exponencial propia de un circuito RC, presenta un mínimo, una deflexión y luego un estado estacionario de menor amplitud, evidencia de I_h . **c)** Resumen de los valores de razón de deflexión, medida como la razón entre la amplitud máxima de la respuesta y la amplitud en estado estacionario.



Por otra parte, el aumento de la resistencia de membrana medida a potenciales subumbral podría ser debido a una disminución, en las rebanadas tratadas crónicamente con TTX, de la corriente activada por hiperpolarización, I_h . Esta corriente catiónica monovalente tiene un potencial de reversión de aproximadamente -40 mV, y una curva de dependencia de potencial que básicamente la abre más mientras más hiperpolarizado sea el potencial (Robinson y Siegelbaum 2003). En caso de disminuir la I_h tras el tratamiento con TTX, su efecto en la medición de la resistencia mediante un pulso hiperpolarizante podría ser doble. En primer lugar, al estar presente la I_h , ésta aumenta al hiperpolarizar la membrana, y al ser una corriente despolarizante a potencial de reposo, antagoniza con la respuesta de voltaje al pulso de prueba, disminuyendo su amplitud. Adicionalmente, al aumentar la I_h , como cualquier conductancia, la resistencia de membrana disminuye.

Para evaluar si hay una expresión diferencial de I_h entre las neuronas de rebanadas control y rebanadas sometidas a inactividad crónica, se estimó indirectamente su contribución midiendo la razón de deflexión, i.e., la razón entre la respuesta máxima de voltaje a un pulso hiperpolarizante y la respuesta en estado estacionario (Fig. 10b y c). En una célula carente de I_h , al no haber corriente despolarizante en respuesta a la hiperpolarización, la respuesta máxima se produciría en el estado estacionario, y el valor de la razón de deflexión sería 1. Observamos que en las neuronas de ambas condiciones existe la deflexión característica de la I_h , y en las neuronas tratadas con TTX la razón de deflexión es levemente mayor (Fig. 10b), sugiriendo una menor contribución de la I_h , pero esta diferencia no es significativa (Fig. 10c), por lo que el aporte de una expresión

diferencial de esta corriente al aumento de la resistencia observado en respuesta a la inactividad crónica, de existir, es menor.

Una vez descartado el aporte de las conductancias sinápticas, las conductancias de potasio constitutivamente activas y la baja contribución I_h sobre la resistencia de membrana, se plantea como una alternativa que el aumento de la resistencia podría ser explicado no por cambios en una conductancia específica, sino que por una disminución en la superficie total de la membrana somática y/o somatodendrítica.

En suma, los experimentos realizados bajo el bloqueo agudo de las conductancias sinápticas indican que cambios en dichas conductancias contribuyen parcialmente al aumento de la excitabilidad tras la inactividad crónica, y que el aumento concomitante de la resistencia de membrana se debe a factores intrínsecos. En último término, el aumento en la excitabilidad podría emerger de una combinación entre el aumento intrínseco de la resistencia y los cambios sinápticos.

Objetivo 3: Dilucidar el mecanismo de señalización que media los cambios en la excitabilidad producidos por inactividad crónica

El principal mecanismo de acoplamiento que se ha descrito entre actividad neuronal y la señalización celular es la entrada de calcio por canales dependientes de voltaje (Simms y Zamponi 2014). En ese sentido, la ausencia prolongada de potenciales de acción produce una disminución de la entrada de calcio a través de canales de calcio dependientes de voltaje, ya que requieren de la despolarización de la membrana para permear calcio (Catterall 2011), y esto puede a su vez conducir a importantes cambios en la señalización dependiente de calcio.

Bloqueo crónico de canales de calcio tipo L

El principal canal de calcio dependiente de voltaje que se ha visto implicado en la plasticidad homeostática son los canales tipo L (Goold y Nicoll 2010; Ibata y cols. 2008; Thiagarajan y cols. 2005). Para verificar si el cierre crónico de canales de calcio dependientes de voltaje tipo L es por sí solo suficiente para generar el aumento en la excitabilidad que se produce tras la inactividad crónica, se registraron rebanadas incubadas durante 3 a 4 días con nifedipina, un bloqueador específico de dichos canales (Tsien y cols. 1988).

Las neuronas de rebanadas tratadas crónicamente con nifedipina 20 μ M muestran una mayor excitabilidad que las neuronas de rebanadas control (Fig. 11), reproduciendo por sí mismo el aumento de excitabilidad mostrado por las neuronas de rebanadas

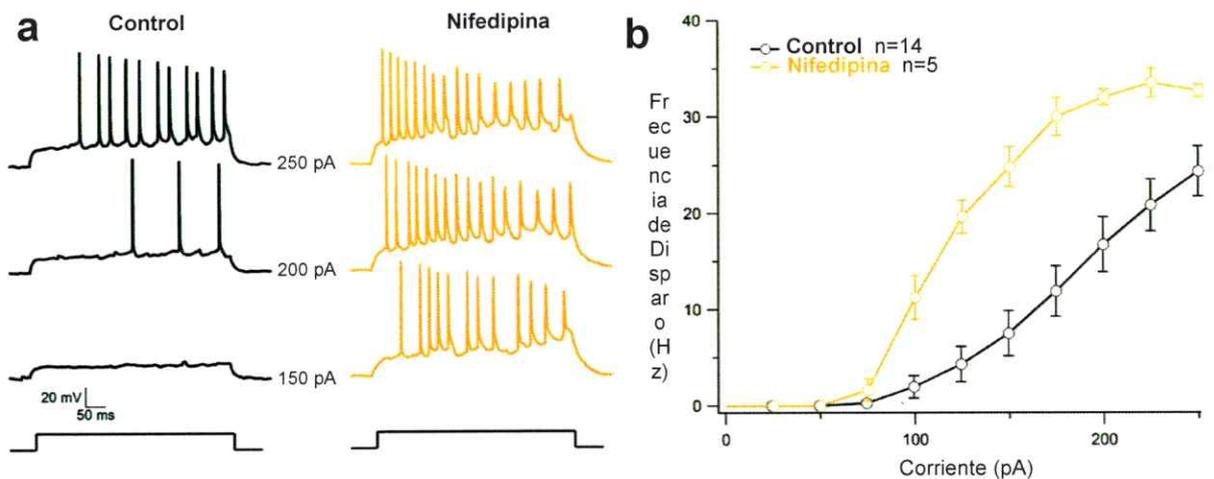


Figura 11: El bloqueo crónico de canales de calcio dependientes de voltaje tipo L aumenta la excitabilidad de neuronas de CA1.

a) Trazos representativos de la frecuencia de disparo obtenida a distintos niveles de inyección de corriente despolarizante. Las neuronas de rebanadas incubadas 3 días con nifedipina 20 μ M disparan a mayor frecuencia que las neuronas control al mismo nivel de estimulación. **b)** Gráfico resumen de la frecuencia de disparo en función de la corriente inyectada.

sometidas a inactividad crónica. Esto sugiere que la inactividad crónica podría aumentar la excitabilidad a través de la disminución de la entrada de calcio a través de los canales tipo L, y la consiguiente disminución de la activación tónica de alguna vía de señalización dependiente de calcio.

Inhibición crónica de CaMKII

Al ser capaz de unirse a los canales de calcio dependientes de voltaje tipo L (Hudmon y cols. 2005), CaMKII es un sensor privilegiado de la entrada de calcio inducida por despolarización de la membrana.

Con el fin de estudiar la posible participación de la inactivación de CaMKII en la adaptación a la inactividad, se evaluó si la inhibición farmacológica crónica de CaMKII es suficiente para aumentar la excitabilidad. Para esto se utilizó tatCN21, un péptido derivado de la proteína endógena CaMKIIN, el inhibidor más potente y selectivo de CaMKII (Chang y cols. 1998; Chang y cols. 2001). Se incubaron rebanadas 3-4 días con tatCN21 5 μ M o igual concentración de un péptido control (*scrambled*, SCR) que contiene la misma composición aminoacídica de CN21 pero en desorden, más la misma secuencia tat de incorporación a la célula. Se registraron neuronas de CA1 de rebanadas tratadas crónicamente con cada péptido, y neuronas de rebanadas control mantenidas los mismos días en medio de cultivo normal.

La excitabilidad de las neuronas de rebanadas tratadas crónicamente con CN21 no aumenta con respecto a la de las neuronas de rebanadas tratadas con SCR y rebanadas control (Fig. 12), lo que sugiere que la disminución de la actividad de CaMKII no sería parte del mecanismo de señalización que genera la adaptación a la inactividad.

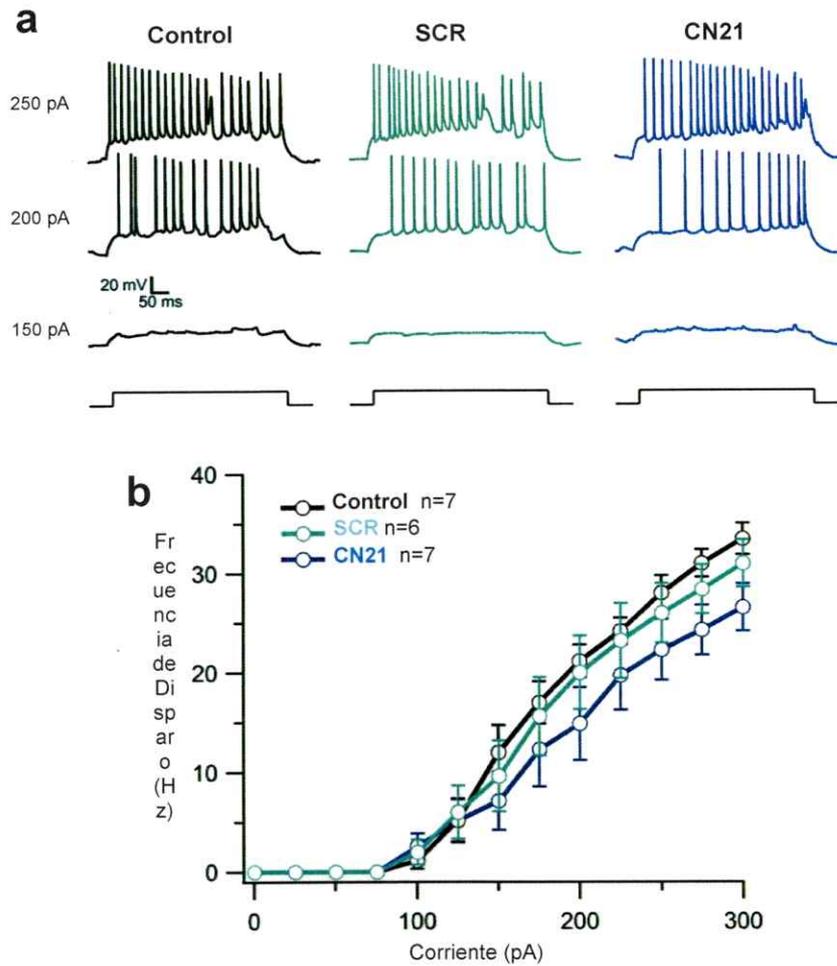


Figura 12: La inhibición específica de CaMKII no produce cambios significativos en la excitabilidad.

a) Trazos representativos de la respuesta de potencial a estímulos despolarizantes. b) Promedio de las curvas de frecuencia vs. corriente.

Rol de CaMKIV en la adaptación de la excitabilidad

CaMKIV se encuentra en gran proporción al interior del núcleo y ser capaz de responder a ondas de calcio somáticas alterando la expresión génica (Bito y cols. 1996; Wayman y cols. 2011), y con anterioridad se ha encontrado que está involucrada en otros tipos de plasticidad homeostática, como el escalamiento sináptico en respuesta a inactividad (Ibata y cols. 2008). Es por esto que CaMKIV fue el siguiente candidato que evaluamos como posible sensor de calcio en la adaptación de la excitabilidad a la inactividad.

Para estudiar la participación de CaMKIV, se registraron neuronas piramidales de CA1 de rebanadas organotípicas tras la incubación durante 3-4 días con KN-93 10 μ M, un inhibidor bien caracterizado de la activación de CaMKII y CaMKIV por calcio/calmodulina (Sumi y cols. 1991; Enslin y cols. 1994). Al no haber efecto distinguible tras la inhibición de CaMKII con un péptido específico (Fig. 12), si se detectan cambios en la excitabilidad tras la aplicación de KN-93, esa diferencia podría ser atribuible a la inhibición de CaMKIV.

El tratamiento con KN-93 desplaza la curva de frecuencia de disparo *versus* corriente hacia mayores tasas de disparo en respuesta a las mismas intensidades de corriente (Fig. 13), de manera muy similar a lo que sucede en respuesta a la inactividad crónica. Con el propósito de verificar si el aumento de la excitabilidad generado por la inhibición farmacológica de las CaMKs con KN-93 es debido a su acción contra la activación de las enzimas, o bien debido a sus efectos inespecíficos de bloqueo de canales de potasio y calcio (Gao y cols. 2006; Li y cols. 1992), se registraron neuronas

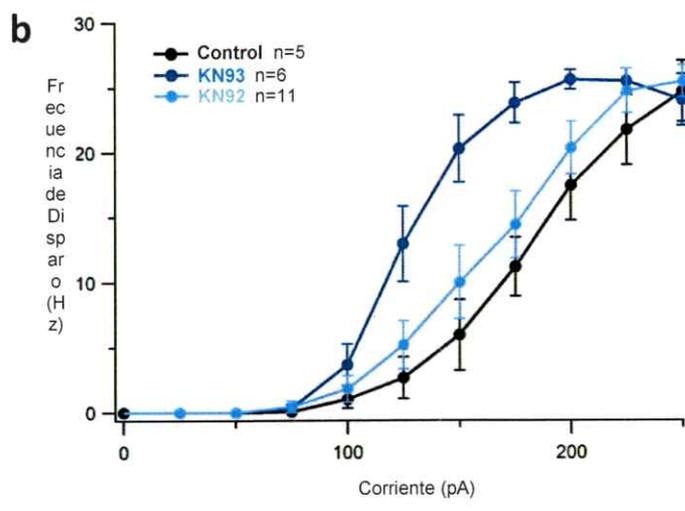
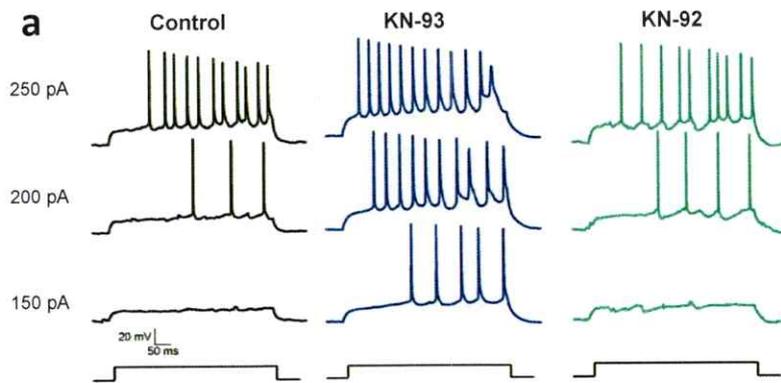


Figura 13: La inhibición farmacológica simultánea de CaMKII y CaMKIV aumenta la excitabilidad de las neuronas de CA1.

a) Trazos representativos de la frecuencia de disparo obtenida a distintos niveles de inyección de corriente despolarizante. Las neuronas de rebanadas tratadas crónicamente con 10 μ M KN-93 disparan a mayor frecuencia que las neuronas control al mismo nivel de estimulación. Las neuronas de rebanadas tratadas con 10 μ M de KN-92, en cambio, no muestran mayor alteración en su frecuencia de disparo. **b)** Gráfico resumen de la frecuencia de disparo en función de la corriente inyectada.

de rebanadas incubadas crónicamente con KN-92, un análogo estructural de KN-93 que tiene los mismo efectos inespecíficos, pero carece de actividad inhibitoria de CaMKs (Rezazadeh y cols. 2006). Se encontró que las neuronas de rebanadas sometidas al tratamiento con KN92 presentan un patrón de excitabilidad indistinguible al de las neuronas control (Fig. 13). En suma, estos resultados muestran que el solo hecho de inhibir la activación de ambas CaMKs de manera crónica produce un aumento en la excitabilidad de las neuronas de CA1, lo que, sumado a que la inhibición específica de CaMKII no tiene efecto alguno (Fig. 12), sugiere la participación de CaMKIV en la adaptación de la excitabilidad a la inactividad.

Oclusión entre la inactividad crónica y la inhibición de CaMKs

Si efectivamente la inactivación de CaMKIV se encuentra río abajo del silenciamiento de los impulsos nerviosos en el mecanismo de adaptación de la excitabilidad, el efecto de la inactividad crónica con TTX y el de la inhibición farmacológica de CaMKs deberían ocluirse. Para verificar si dicha oclusión sucede, se co-incubaron rebanadas durante 3 días con TTX y KN-93.

La frecuencia de respuesta a la inyección de corriente en las células de rebanadas có-incubadas con TTX y KN-93 es indistinguible de la de rebanadas tratadas únicamente con TTX (Fig. 14). El hecho de que la inhibición de CaMKs y la inactividad crónica tengan virtualmente el mismo efecto sobre la excitabilidad, y que la magnitud de dichos efectos no sea aditiva, apunta a una posible oclusión de los efectos debida a su participación en un mecanismo compartido.

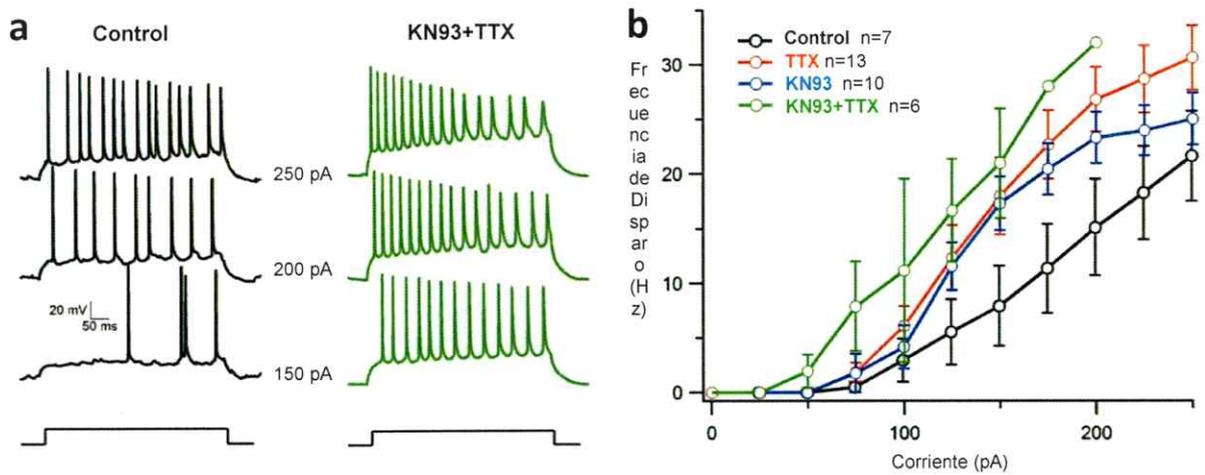


Figura 14: Los cambios en excitabilidad provocados por la inactividad crónica y la inhibición de CaMKs no son aditivos.

a) Trazos representativos de la respuesta de potencial a estímulos despolarizantes. b) Promedio de las curvas de frecuencia vs. corriente.

Discusión

Aumento de la excitabilidad tras la inactividad crónica

En la presente investigación se mostró, en primer lugar, el aumento de la excitabilidad inducido por la inactividad crónica en neuronas de CA1. Esto se condice con observaciones de investigaciones previas en cultivo organotípico hipocampal (Karmarkar y Buonomano 2006) y cultivo de neuronas corticales disociadas (Desai y cols. 1999). A diferencia de lo que sucede en neuronas corticales disociadas (Desai y cols. 1999), y en concomitancia con lo que se había encontrado previamente en cultivo organotípico hipocampal (Karmarkar y Buonomano 2006), dicho aumento de la excitabilidad no se correlaciona con una disminución en el umbral de disparo del potencial de acción, sino con un aumento en la resistencia de membrana.

Cabe destacar que en distintos modelos de circuitos neuronales se observan compensaciones homeostáticas ante la inactividad, en este caso a nivel de la excitabilidad, pero a su vez los mecanismos mediante los que se manifiesta esta adaptación pueden diferir.

Contribución sináptica a la adaptación de la excitabilidad

Al evaluar la contribución sináptica se mostró que el aumento de la resistencia de membrana inducido por la inactivación crónica es casi exclusivamente debido a cambios intrínsecos, ya que en presencia de bloqueadores sinápticos no se alteran en lo absoluto las mediciones de resistencia. A la vez se encontró que el bloqueo de las principales

sinapsis rápidas durante el registro atenúa las diferencias en excitabilidad encontradas entre el tratamiento crónico con TTX y la condición control. Esto sugiere que tanto cambios intrínsecos como sinápticos contribuirían al incremento de la excitabilidad por inactividad crónica.

Un posible mecanismo que explica el efecto sináptico en la adaptación a la inactividad es que las sinapsis inhibitorias predominen en condiciones control, interfiriendo con las ráfagas de potenciales de acción, y que en respuesta a la inactividad crónica, junto con el leve aumento de la transmisión glutamatérgica (Kim y Tsien 2008), disminuya de manera importante el tono GABAérgico, permitiendo mayores tasas de disparo. Tal posible disminución del tono inhibitorio en respuesta a la inactividad crónica se ha observado en cultivos de neuronas corticales disociadas (Kilman y cols. 2002) y en cultivo organotípico hipocampal, aunque en este último caso en respuesta a un paradigma sináptico de inactividad (Karmarkar y Buonomano 2006). Una disminución del tono GABAérgico podría explicar además la hiperpolarización del potencial de membrana que se encontró en las neuronas de rebanadas incubadas con TTX, debido a que el potencial de equilibrio del cloruro es más despolarizado que el de potasio.

Adicionalmente, entre los genes blanco del factor de transcripción CREB se encuentran el receptor de GABA tipo B y la proteína asociada al receptor de GABA tipo A (GABARP) (Impey y cols. 2004), que promueve la formación de sinapsis GABAérgicas (Leil y cols. 2004; Chen y cols. 2000). Si la inactividad crónica genera una disminución de la expresión de los genes blanco de CREB por la menor activación

de la vía Ca_v1 -calcio/CaM-CaMKIV-CREB, esto podría implicar directamente una disminución del peso GABAérgico.

Canales de calcio tipo L como principal sensor en plasticidad homeostática

En busca del mecanismo molecular que genera la adaptación de la excitabilidad a la inactividad, se mostró que el bloqueo de canales de calcio tipo L imita el aumento en la excitabilidad generado por la inactividad crónica, apuntando a la inactividad de dichos canales como el iniciador de la respuesta de señalización. Esto se condice con investigaciones previas en cultivos de neuronas disociadas que han encontrado que el bloqueo de canales de calcio tipo L imita, total o parcialmente, la adaptación de las sinapsis glutamatérgicas a la inactividad (Ibata y cols. 2008; Thiagarajan y cols. 2005). Más aun, en paradigmas de plasticidad homeostática de adaptación a la hiperactividad, se ha encontrado que la apertura de los canales de calcio tipo L es fundamental para que se produzca una disminución global de la fuerza sináptica de las neuronas (Goold y Nicoll 2010), lo que sumado a los resultados obtenidos en la presente investigación postula a los canales de calcio tipo L como el sensor maestro en lo que respecta a fenómenos de homeostasis de la actividad neuronal.

CaMKII no participa en la adaptación de la excitabilidad a la inactividad

Como candidato natural de una cascada dependiente de actividad a través de la entrada de calcio, se investigó la participación de CaM quinasas. En primer lugar, se encontró que la inhibición crónica y específica de CaMKII no genera cambios en la excitabilidad de las neuronas de CA1. Previamente, se había reportado en cultivo de

neuronas que CaMKII no participaría en la adaptación sináptica a la inactividad (Ibata y cols. 2008), lo que va en la misma línea con lo observado en la adaptación de la excitabilidad en rebanadas hipocampales organotípicas en la presente investigación.

CaMKIV como posible regulador bidireccional de la plasticidad homeostática

A continuación evaluamos la posible participación de CaMKIV. Dado que los canales de calcio tipo L son capaces de promover la entrada de calcio/CaM al núcleo (Deisseroth y cols. 1998; Ma y cols. 2014) y de esta manera activar CaMKIV, y dada la capacidad de esta última de regular la transcripción al fosforilar a CREB (Bitto y cols. 1996; Impey y cols. 2002; Wayman y cols. 2008), esta quinasa es un buen candidato como señalizador transcripcional de cambios en la actividad. Tras la aplicación crónica de un inhibidor general de CaM quinasas, se produce un aumento en la excitabilidad a niveles cercanos a los encontrados en neuronas de rebanadas sometidas a inactividad crónica. Al no haberse encontrado participación de CaMKII utilizando un inhibidor específico, se podría inferir que la inhibición crónica de CaMKIV sería suficiente para producir un aumento en la excitabilidad que imita el efecto de la inactividad. Estos resultados son compatibles con descripciones previas de que la inhibición crónica de CaMKIV mediante la sobreexpresión de un dominante negativo genera en neuronas corticales cultivadas un escalamiento sináptico similar al producido por la inactividad crónica (Ibata y cols. 2008). Si a esto se suma el hecho de que en neuronas de CA1 de rebanadas organotípicas hipocampales la depresión sináptica evocada por aumento



crónico en la actividad requiere de la actividad de CaMKIV (Goold y Nicoll 2010), se consolida la hipótesis del eje entre canales de calcio tipo L y CaMKIV como un regulador bidireccional de la homeostasis de la actividad neuronal.

En un contexto en el que en el que los fenómenos homeostáticos tienen manifestaciones y mecanismos muy diversos según el sistema neuronal estudiado y según si la adaptación es a la inactividad o la hiperactividad, resulta muy interesante encontrar en los canales de calcio tipo L y CaMKIV un mecanismo relativamente generalizado.

Modelo propuesto

El hecho de que tanto el bloqueo de canales de calcio tipo L como la inhibición farmacológica de la activación de CaMKs produzcan un efecto en el mismo sentido que la inactividad crónica, y que estos efectos no sean aditivos, abre la posibilidad de que la inactividad disminuya los niveles tónicos de actividad de CaMKs, y que la inactivación de CaMKIV genere el aumento de la excitabilidad. Lo anterior permite plantear el siguiente modelo (Fig. 15): la ausencia prolongada de potenciales de acción produce una disminución de la entrada de calcio a través de canales de calcio dependientes de voltaje, ya que requieren de la despolarización de la membrana para permear calcio. CaMKIV, en tanto, es un efector privilegiado de la señalización por calcio debido a su dependencia de calcio/CaM y su localización nuclear (Wayman y cols. 2011).

Es esperable, por ende, que la disminución de la entrada de calcio en condiciones de inactividad crónica lleve a una disminución de los niveles de activación de CaMKIV,

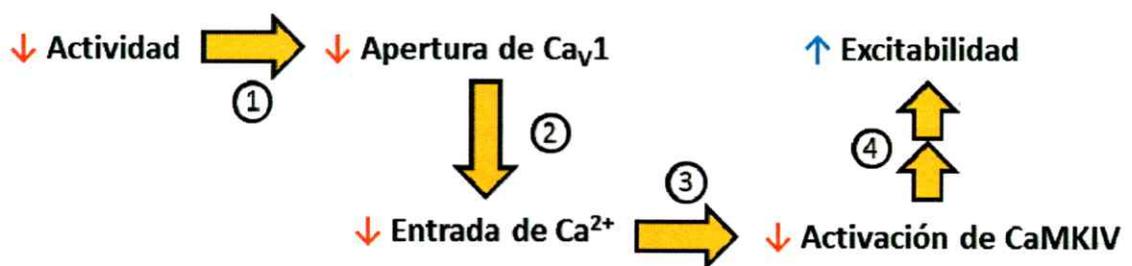


Figura 15: Esquema del mecanismo propuesto.

1) La ausencia de potenciales de acción evita la apertura de los canales de calcio tipo L, lo que conlleva (2) una disminución de la entrada de calcio. 3) Al disminuir la entrada de calcio, disminuye a su vez la activación de CaMKIV. 4) Se pierde la fosforilación de CREB, disminuye la transcripción de sus genes blanco, y esto genera de alguna manera un aumento en la excitabilidad de las neuronas.

y que disminuya la fosforilación de CREB y CBP (Bito y cols. 1996; Impey y cols. 2002), con la consiguiente disminución de la expresión de sus genes blanco (Impey y cols. 2004).

En este contexto se explica que la inhibición farmacológica de la activación de CaMKs durante el tratamiento de inactividad crónica no altera el resultado observado con la incubación de TTX por sí solo, debido a que se está aplicando un inhibidor a una enzima que ya se encontraría inactiva.

El modelo descrito tiene algunos puntos aún sin demostrar, pero algunos de ellos son verificables. De ser correcto el modelo, se debería poder medir una disminución en la fosforilación de CREB en las rebanadas tratadas crónicamente con TTX.

Por otra parte, si la reducción de la activación de CaMKIV es responsable del aumento en la excitabilidad inducido por el tratamiento crónico con TTX, este fenómeno debería evitarse en neuronas que sobreexpresen CaMKIV mutante constitutivamente activa, en la que se elimina el dominio autoinhibitorio, previniendo la obstrucción del dominio catalítico de la enzima (Ho y cols. 1996).

El modelo debe dar cuenta además del hecho de que, pese a alcanzar niveles de excitabilidad muy similares a los obtenidos con el tratamiento con TTX, la aplicación prolongada de KN-93 genera un aumento en la excitabilidad que resulta menor que la producida por la inactividad crónica o el bloqueo crónico de los canales de calcio tipo L. Una explicación sencilla de este fenómeno se obtiene al considerar la intensidad de los

tratamientos. Las concentraciones utilizadas de TTX eliminan completamente los potenciales de acción, por lo que el efecto de adaptación a la inactividad es máximo. La inhibición de la activación de CaMKs por KN-93 puede no ser completa, produciendo un aumento menor de la excitabilidad.

Otro aspecto a considerar es que múltiples neuronas sometidas a los distintos tratamientos en la presente investigación llegan a un mismo nivel máximo de excitabilidad, indicando que estos niveles podrían estar limitados por condicionantes de las conductancias que participan en el potencial de acción de estas neuronas.

Conclusiones

- La inactividad crónica produce un aumento de la excitabilidad de las neuronas de CA1 de rebanadas organotípicas hipocampales.
- En neuronas de rebanadas sometidas a inactividad crónica se produce un importante aumento de la resistencia de membrana, que puede contribuir al aumento de la excitabilidad, pero no lo explica por sí solo.
- Los cambios en las conductancias sinápticas en respuesta a la inactividad crónica no influyen en el aumento en la resistencia de membrana, pero pueden contribuir a la adaptación de la excitabilidad de membrana de las neuronas de CA1.
- El bloqueo crónico de canales de calcio tipo L genera un aumento en la excitabilidad comparable al inducido por la inactividad crónica, por lo que podría representar el iniciador de la señalización en la adaptación a la inactividad.
- El que la inhibición crónica específica de CaMKII no altere la excitabilidad de las neuronas de CA1, y la inhibición general de CaM quinasas la aumente, hace postular a CaMKIV como parte de la cascada de señalización de adaptación a la inactividad.
- Finalmente, el hecho de que el aumento de la excitabilidad por inactividad crónica y por inhibición farmacológica de CaMKs no sean aditivos, permite proponer que la inactivación de CaMKIV podría ser parte del mecanismo molecular de adaptación de a la inactividad.

Referencias

- Bean, B.P., 2007. The action potential in mammalian central neurons. *Nature reviews. Neuroscience*, 8(6), pp.451–65.
- Bito, H., Deisseroth, K. y Tsien, R.W., 1996. CREB phosphorylation and dephosphorylation: A Ca²⁺- and stimulus duration-dependent switch for hippocampal gene expression. *Cell*, 87(7), pp.1203–1214.
- Bliss, T. V y Collingridge, G.L., 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 361(6407), pp.31–39.
- Bliss, T. V y Lomo, T., 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of physiology*, 232(2), pp.331–56.
- Branco, T. et al., 2008. Local dendritic activity sets release probability at hippocampal synapses. *Neuron*, 59(3), pp.475–85.
- Breton, J.-D. y Stuart, G.J., 2009. Loss of sensory input increases the intrinsic excitability of layer 5 pyramidal neurons in rat barrel cortex. *The Journal of physiology*, 587(Pt 21), pp.5107–19.
- Catterall, W.A., 2011. Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(8), p.a003947.
- Chang, B.H., Mukherji, S. y Soderling, T.R., 2001. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor protein: localization of isoforms in rat brain. *Neuroscience*, 102(4), pp.767–77.
- Chang, B.H., Mukherji, S. y Soderling, T.R., 1998. Characterization of a calmodulin kinase II inhibitor protein in brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(18), pp.10890–5.
- Chen, L. et al., 2000. The gamma-aminobutyric acid type A (GABAA) receptor-associated protein (GABARAP) promotes GABAA receptor clustering and modulates the channel kinetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(21), pp.11557–62.
- Deisseroth, K., Heist, E.K. y Tsien, R.W., 1998. Translocation of calmodulin to the nucleus supports CREB phosphorylation in hippocampal neurons. *Nature*, 392(6672), pp.198–202.
- Desai, N.S., Rutherford, L.C. y Turrigiano, G.G., 1999. Plasticity in the intrinsic excitability of cortical pyramidal neurons. *Nature neuroscience*, 2(6), pp.515–20.
- Enslin, H. et al., 1994. Characterization of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV. Role in transcriptional regulation. *The Journal of biological chemistry*, 269(22), pp.15520–7.

- Gao, L., Blair, L.A.C. y Marshall, J., 2006. CaMKII-independent effects of KN93 and its inactive analog KN92: reversible inhibition of L-type calcium channels. *Biochemical and biophysical research communications*, 345(4), pp.1606–10.
- Giese, K.P. et al., 1998. Autophosphorylation at Thr286 of the alpha calcium-calmodulin kinase II in LTP and learning. *Science*, 279(5352), pp.870–3.
- Goold, C.P. y Nicoll, R.A., 2010. Single-cell optogenetic excitation drives homeostatic synaptic depression. *Neuron*, 68(3), pp.512–28.
- Grubb, M.S. y Burrone, J., 2010. Activity-dependent relocation of the axon initial segment fine-tunes neuronal excitability. *Nature*, 465(7301), pp.1070–4.
- Ho, N., Gullberg, M. y Chatila, T., 1996. Activation protein 1-dependent transcriptional activation of interleukin 2 gene by Ca²⁺/calmodulin kinase type IV/Gr. *The Journal of experimental medicine*, 184(1), pp.101–112.
- Hou, Q. et al., 2008. Homeostatic regulation of AMPA receptor expression at single hippocampal synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(2), pp.775–80.
- Hou, Q., Gilbert, J. y Man, H.-Y., 2011. Homeostatic regulation of AMPA receptor trafficking and degradation by light-controlled single-synaptic activation. *Neuron*, 72(5), pp.806–18.
- Hudmon, A. et al., 2005. CaMKII tethers to L-type Ca²⁺ channels, establishing a local and dedicated integrator of Ca²⁺ signals for facilitation. *The Journal of cell biology*, 171(3), pp.537–47.
- Ibata, K., Sun, Q. y Turrigiano, G.G., 2008. Report Rapid Synaptic Scaling Induced by Changes in Postsynaptic Firing. , pp.819–826.
- Impey, S. et al., 2004. Defining the CREB regulon: a genome-wide analysis of transcription factor regulatory regions. *Cell*, 119(7), pp.1041–54.
- Impey, S. et al., 2002. Phosphorylation of CBP mediates transcriptional activation by neural activity and CaM kinase IV. *Neuron*, 34(2), pp.235–44.
- Karmarkar, U.R. y Buonomano, D. V., 2006. Different forms of homeostatic plasticity are engaged with distinct temporal profiles. *The European journal of neuroscience*, 23(6), pp.1575–84.
- Kilman, V., Rossum, M.C.W. Van y Turrigiano, G.G., 2002. Activity Deprivation Reduces Miniature IPSC Amplitude by Decreasing the Number of Postsynaptic GABA A Receptors Clustered at Neocortical Synapses. , 22(4), pp.1328–1337.
- Kim, J. y Tsien, R.W., 2008. Synapse-specific adaptations to inactivity in hippocampal circuits achieve homeostatic gain control while dampening network reverberation. *Neuron*, 58(6), pp.925–937.
- Leil, T.A. et al., 2004. GABAA receptor-associated protein traffics GABAA receptors to the plasma membrane in neurons. *The Journal of neuroscience*, 24(50), pp.11429–38.

- LeMasson, G., Marder, E. y Abbott, L.F., 1993. Activity-dependent regulation of conductances in model neurons. *Science*, 259(5103), pp.1915–7.
- Li, G., Hidaka, H. y Wollheim, C.B., 1992. Inhibition of voltage-gated Ca²⁺ channels and insulin secretion in HIT cells by the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor KN-62: comparison with antagonists of calmodulin and L-type Ca²⁺ channels. *Molecular pharmacology*, 42(3), pp.489–8.
- Lynch, G. y Baudry, M., 1984. The biochemistry of memory: a new and specific hypothesis. *Science*, 224(4653), pp.1057–63.
- Ma, H. et al., 2014. γ CaMKII shuttles Ca²⁺/CaM to the nucleus to trigger CREB phosphorylation and gene expression. *Cell*, 159(2), pp.281–94.
- Maffei, A. y Turrigiano, G.G., 2008. Multiple modes of network homeostasis in visual cortical layer 2/3. *The Journal of neuroscience*, 28(17), pp.4377–84.
- Malinow, R., Schulman, H. y Tsien, R.W., 1989. Inhibition of postsynaptic PKC or CaMKII blocks induction but not expression of LTP. *Science*, 245(4920), pp.862–6.
- von der Malsburg, C., 1973. Self-organization of orientation sensitive cells in the striate cortex. *Kybernetik*, 14(2), pp.85–100.
- Martin, S.J., Grimwood, P.D. y Morris, R.G., 2000. Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annual review of neuroscience*, 23(Hebb 1949), pp.649–711.
- Miller, K. y MacKay, D., 1994. The role of constraints in Hebbian learning. *Neural Computation*, 126, pp.100–126.
- Miller, K.D., 1996. Synaptic economics: competition and cooperation in synaptic plasticity. *Neuron*, 17(3), pp.371–4.
- Nelson, A.B., Gittis, A.H. y du Lac, S., 2005. Decreases in CaMKII activity trigger persistent potentiation of intrinsic excitability in spontaneously firing vestibular nucleus neurons. *Neuron*, 46(4), pp.623–31.
- Rezazadeh, S., Claydon, T.W. y Fedida, D., 2006. KN-93 (2-[N-(2-hydroxyethyl)]-N-(4-methoxybenzenesulfonyl)]amino-N-(4-chlorocinnamyl)-N-methylbenzylamine), a calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor, is a direct extracellular blocker of voltage-gated potassium channels. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 317(1), pp.292–9.
- Robinson, R.B. y Siegelbaum, S.A., 2003. Hyperpolarization-activated cation currents: from molecules to physiological function. *Annual review of physiology*, 65, pp.453–80.
- Rutherford, L.C., Nelson, S.B. y Turrigiano, G.G., 1998. BDNF has opposite effects on the quantal amplitude of pyramidal neuron and interneuron excitatory synapses. *Neuron*, 21(3), pp.521–30.
- Sanhueza, M. et al., 2011. Role of the CaMKII/NMDA receptor complex in the

- maintenance of synaptic strength. *The Journal of neuroscience*, 31(25), pp.9170–8.
- Silva, a J., Stevens, C.F., et al., 1992. Deficient hippocampal long-term potentiation in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science*, 257(5067), pp.201–6.
- Silva, a J., Paylor, R., et al., 1992. Impaired spatial learning in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science*, 257(5067), pp.206–11.
- Simms, B.A. y Zamponi, G.W., 2014. Neuronal voltage-gated calcium channels: structure, function, and dysfunction. *Neuron*, 82(1), pp.24–45.
- Stellwagen, D. et al., 2005. Differential regulation of AMPA receptor and GABA receptor trafficking by tumor necrosis factor-alpha. *The Journal of neuroscience*, 25(12), pp.3219–28.
- Stellwagen, D. y Malenka, R.C., 2006. Synaptic scaling mediated by glial TNF-alpha. *Nature*, 440(7087), pp.1054–9.
- Stoppini, L., Buchs, P. a y Muller, D., 1991. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *Journal of neuroscience methods*, 37(2), pp.173–82.
- Storm, J.F., 1990. Potassium currents in hippocampal pyramidal cells. *Progress in brain research*, 83, pp.161–187.
- Storm, J.F., 1988. Temporal integration by a slowly inactivating K⁺ current in hippocampal neurons. *Nature*, 336(6197), pp.379–381.
- Sumi, M. et al., 1991. The newly synthesized selective Ca²⁺/calmodulin dependent protein kinase II inhibitor KN-93 reduces dopamine contents in PC12h cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 181(3), pp.968–75.
- Sutton, M. a et al., 2006. Miniature neurotransmission stabilizes synaptic function via tonic suppression of local dendritic protein synthesis. *Cell*, 125(4), pp.785–99.
- Thiagarajan, T.C., Lindskog, M. y Tsien, R.W., 2005. Adaptation to synaptic inactivity in hippocampal neurons. *Neuron*, 47(5), pp.725–37.
- Thompson, R.F., 1986. The neurobiology of learning and memory. *Science*, 233(4767), pp.941–7.
- Tsien, R.W. et al., 1988. Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. *Trends in neurosciences*, 11(10), pp.431–438.
- Turrigiano, G.G. et al., 1998. Activity-dependent scaling of quantal amplitude in neocortical neurons. *Nature*, 391(6670), pp.892–6.
- Turrigiano, G.G., 1999. Homeostatic plasticity in neuronal networks: the more things change, the more they stay the same. *Trends in neurosciences*, 22(5), pp.221–7.
- Turrigiano, G.G., 2008. The self-tuning neuron: synaptic scaling of excitatory synapses. *Cell*, 135(3), pp.422–35.
- Wang, Z. et al., 2003. Bidirectional changes in spatial dendritic integration accompanying long-term synaptic modifications. *Neuron*, 37(3), pp.463–72.

- Wayman, G.A. et al., 2011. Analysis of CaM-kinase signaling in cells. *Cell calcium*, 50(1), pp.1–8.
- Wayman, G.A. et al., 2008. Calmodulin-kinases: modulators of neuronal development and plasticity. *Neuron*, 59(6), pp.914–31.
- van Welie, I. y du Lac, S., 2011. Bidirectional control of BK channel open probability by CAMKII and PKC in medial vestibular nucleus neurons. *Journal of neurophysiology*, 105(4), pp.1651–9.
- Xu, J. et al., 2005. Activity-dependent long-term potentiation of intrinsic excitability in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *The Journal of neuroscience*, 25(7), pp.1750–60.
- Zhang, W. y Linden, D.J., 2003. The other side of the engram: experience-driven changes in neuronal intrinsic excitability. *Nature reviews. Neuroscience*, 4(11), pp.885–900.