

UCH-FC
Biotecnología
V494
C.I

UNIVERSIDAD DE CHILE -FACULTAD DE CIENCIAS -ESCUELA DE PREGRADO



“Escalamiento sináptico homeostático rápido en rebanadas agudas de hipocampo”

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

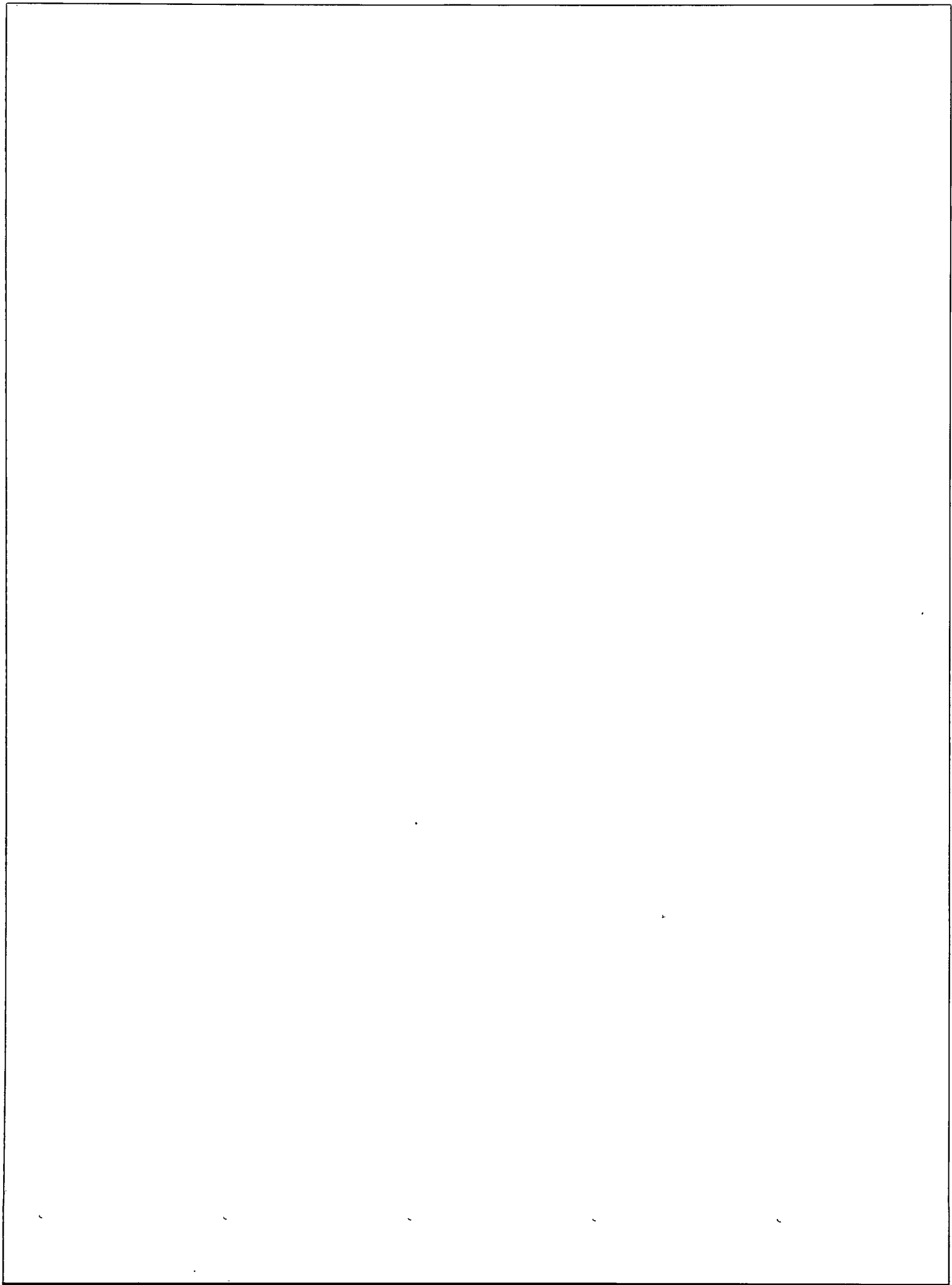
Por

PABLO ISMAEL VERGARA GARCÍA

Dra. Magdalena Sanhueza
Directora Seminario de título

Dr. Jorge Vera
Co-Director Seminario de Título

Noviembre, 2016. Santiago de Chile.





INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, que el Seminario de Título presentado por el candidato:

PABLO ISMAEL VERGARA GARCÍA

“Escalamiento sináptico homeostático rápido en rebanadas agudas de hipocampo”.

Ha sido aprobado por la Comisión evaluadora y revisora, como requisito parcial, para optar al título profesional de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Dra. Magdalena Sanhueza Tohá
Directora Seminario de Título

Firma manuscrita en azul de la Dra. Magdalena Sanhueza Tohá.

Dr. Jorge Vera Buschmann
Co-Director Seminario de Título

Firma manuscrita en azul del Dr. Jorge Vera Buschmann.

Comisión Revisora y Evaluadora

Dr. Julio Alcayaga Urbina
Presidente

Firma manuscrita en azul del Dr. Julio Alcayaga Urbina.

Dr. Juan Bacigalupo Vicuña
Integrante

Firma manuscrita en azul del Dr. Juan Bacigalupo Vicuña.



Santiago de Chile, noviembre de 2016.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mis padres, hermanas y a el galoy, por darme su apoyo incondicional y por ser los pilares centrales de mi formación.

Mis más sinceros agradecimientos a los chorros de fisioLab®, Dani Llama, Donatelo Karmelo, NachoPopWine y Beto Caves que me acompañaron en mambos y labores (y han soportado mis interrogatorios por ya casi dos años). A Gabyhey le adjudico una sección para ella sola, ya que una parte importante de este trabajo le corresponde. Además, fue quien me acompañó en esas largas noche de registrar minis, con música de Donkey Kong y clásicos de los 90's. También quiero agradecer a esos amigos de siempre, ramah, marcela, Bernarda y cony Ru.

Mi reconocimiento a los profes de fisioLab®, Juan, Julio, Cecilia, Ricardo, Daniel y Osvaldo. Las líneas que escribí en este seminario son producto de las enseñanzas que me regalaron, obsequio del cual estoy infinitamente agradecido. Por supuesto, mencionar el cariño que le tome a Don Danny y a Jeannette.

Finalmente quiero corresponder a quienes me guiaron, porque soy consciente que, para abrirse camino en las ciencias ni la inteligencia, el esfuerzo o la suerte pueden relevar a un buen guía. Es por estó que quiero referirme, particularmente, a mi profesora Magdalena y a Don Jorge.

A Don Jorge quiero agradecer por ayudarme a sacar lo mejor de mí, desde el primer día en este Lab me hizo creer que era capaz de hacer lo experimentos más sofisticados del mundo. Yo llevaba una semana y ya quería aprender lo que era el dynamic clamp. Las simulaciones de Montecarlo, el programa de los minis y todas las otras cosas ñoñas que hice son gracias a él.

A la profe Magdalena por ir en contra de la tendencia general en que la dialéctica entre alumno y profesor es cada vez menos común. Horas de discusión con ella es lo que hay detrás de este trabajo. Esta posibilidad no se da en cualquier laboratorio, mucho menos a un alumno de pregrado. Una profesora como Magdalena jamás se olvida.

1. ÍNDICE

1.1 ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. ÍNDICE	iv
1.1 ÍNDICE DE CONTENIDOS	iv
1.2 ÍNDICE DE FIGURAS	vi
2. RESUMEN.....	1
3. ABSTRACT	2
4. INTRODUCCIÓN.....	3
4.1 Hipótesis	11
4.2 Objetivos	12
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
5.1 Cuidado animal	13
5.2 Protocolo de preparación de rebanadas de hipocampo.....	13
5.3 Registros electrofisiológicos	14
5.3.1 Potencial de juntura líquido (P JL).....	15
5.4 Análisis cuántico de los eventos en miniatura	15
5.5 Análisis estadístico y tratamiento de datos	16
5.5.1 Comparación de dos distribuciones.....	16
5.5.2 Emparejamiento de distribuciones	18
6. RESULTADOS	20
6.1 Cambios en la amplitud y frecuencia de las mEPSC en función del tiempo revelan un proceso homeostático.....	20
6.2 Agrupación de mEPSC en una distribución representativa.....	22

6.3 La distribución de amplitudes aumenta siguiendo una dinámica de escalamiento sináptico.....	25
6.3.1 Determinación del factor multiplicativo por método alternativo	28
7. DISCUSIÓN.....	31
7.1 Aumento en la amplitud y frecuencia de los eventos en miniatura.....	31
7.2 Un proceso de escalamiento homeostático rápido.	33
7.3 Proyecciones.....	34
8. CONCLUSIÓN.....	36
9. BIBLIOGRAFÍA.....	37
10. ANEXO	41
10.1 Verificación de la actividad de drogas	41
10.2 Detección de los eventos en miniatura.	42
10.2.1 Suavización de los datos	42
10.2.2 Detección de eventos.....	43
10.3 Estimación de valores críticos.	46

1.2 ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. STDP en cultivo de hipocampo	4
Figura 2. Plasticidad homeostática en cultivos de neuronas corticales.	6
Figura 3. Restricciones aditivas y multiplicativas en los procesos homeostáticos	9
Figura 4. Escalamiento multiplicativo homeostático	10
Figura 5. Diseño experimental utilizado	13
Figura 6. Curvas de función de densidad de probabilidad acumulada.....	16
Figura 7. Test de Kolmogorov-Smirnov	17
Figura 8. Ejemplo de adición de puntos por interpolación lineal	18
Figura 10. Efecto de alteración de datos por interpolación y deleciones aleatorias	22
Figura 11. Minimización del error por deleciones aleatorias de eventos.....	23
Figura 12. Las distribuciones de amplitudes a tiempos tempranos y tardíos son estadísticamente distintas.....	25
Figura 13. Esquematización del sesgo causado por el umbral de detección.....	26
Figura 14. Diferencias entre la distribución temprana y tardía.....	27
Figura 15. Determinación del factor de escalamiento.....	28
Figura S1. Corroboración del efecto de TTX.....	40
Figura S2. Corroboración del efecto de PTX.....	41
Figura S3. Datos crudos vs datos suavizados.....	42
Figura S4. Ejemplo de un evento analizado	43
Figura S5. Histograma de constantes de decaimiento	44
Figura S6. CPDF de cada célula, y curva promedio para la pase temprana y tardía ...	47
Figura S7. Agrupación de las curvas de cada célula en un pool común.....	48
Figura S8. Distribución de los datos en pools aleatorios	49
Figura S9. Curva de probabilidad vs distancia máxima.....	50

1.3 LISTA DE ABREVIATURAS

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

CaMKII: Proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina tipo II.

CNQX: 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione.

CPDF: Función de densidad de probabilidad acumulada.

LCRA: Líquido céfalo raquídeo artificial.

LTD: Depresión de larga duración.

LTP: Potenciación de larga duración.

mEPSC: Corrientes excitatorias postsinápticas en miniatura.

mPSC: Corrientes postsinápticas en miniatura

NMDA: N-metil-D-aspartato.

PJL: Potencial de juntura líquida.

PSH: Plasticidad sináptica de tipo homeostática.

PTX: Picrotoxina.

STDP: *Spike-timing-dependent plasticity* (plasticidad dependiente de la temporalidad de las descargas)

TTX: Tetrodotoxina.

2. RESUMEN

La plasticidad sináptica de tipo homeostática (PSH) es una familia de mecanismos compensatorios que le permite a las neuronas regular su excitabilidad de acuerdo a la actividad de la red. Estos procesos han sido comúnmente observados en cultivos neuronales y organotípicos incubados por largos periodos de tiempo (días) con fármacos que incrementan o disminuyen la excitabilidad, o bien in vivo, posteriormente a tratamientos de privación sensorial. En contraste, nosotros observamos y caracterizamos un proceso de PSH generado espontáneamente tras unas cuantas horas en neuronas piramidales de rebanadas agudas de hipocampo. Éste se evidencia a través de un aumento en la frecuencia y la amplitud de las corrientes postsinápticas excitatorias en miniatura (mEPSC). El aumento en las amplitudes sigue una dinámica de escalamiento multiplicativo, lo que significa que la distribución de mEPSC aumenta en forma proporcional. Estas observaciones sugieren un proceso rápido de PSH, gatillado presuntamente por la disminución de la actividad sináptica tras la disrupción de las aferencias durante la preparación de las rebanadas. El análisis de las mEPSC sugiere que en esta forma de PSH estarían involucrados tanto mecanismos pre como postsinápticos. Según nuestro conocer esta es la primera vez que una forma rápida de escalamiento homeostático (8-12 horas) es reportada en rebanadas agudas de hipocampo sin la necesidad de tratamiento farmacológico. Estas observaciones podrían contribuir a la comprensión de procesos de reactivación rápida tras lesiones cerebrales. ✓

3. ABSTRACT

Homeostatic synaptic plasticity (HSP) is a diverse group of compensatory mechanisms allowing neurons to regulate their excitability according to network activity levels. These phenomena have mainly been observed in neuronal and organotypic cultures incubated for long periods (days) with drugs that increase or decrease network activity, or in vivo after sensory deprivation. In contrast, we here report a form of HSP developed spontaneously in a few hours in pyramidal neurons from acute hippocampal slices. We observed a rise in the frequency of miniature excitatory postsynaptic currents (mEPSC). Moreover, mEPSC amplitudes increased over time following a multiplicative upscaling rule, i.e. a proportional change in mEPSC amplitude. This suggests a fast-occurring HSP process not requiring pharmacological manipulations and presumably caused by a decrease in synaptic activity after removal of afferents during slice preparation. mEPSC analysis suggests that both pre and postsynaptic mechanisms are involved in this form of HSP. To our knowledge this is the first time that a relatively fast (8-12 h) form of homeostatic synaptic scaling is reported in acute hippocampal slices without drug treatment. These observations may contribute to the understanding of fast reactive processes taking place in the brain after injury.

4. INTRODUCCIÓN

Durante el desarrollo del sistema nervioso, millones de neuronas se conectan sinápticamente formando extensas redes neuronales capaces de generar y mantener complejos patrones de actividad (Rodier, 1980). Lo que hace a estos circuitos tan sorprendentes es que las conexiones entre neuronas no son estáticas estructural ni funcionalmente, sino que cambian dinámicamente. Estos cambios permiten a los organismos almacenar información y adaptar su comportamiento a distintos contextos (Berlucchi y Buchtel, 2009). El mecanismo más estudiado mediante el cual se modifican las conexiones entre neuronas es conocido como potenciación de larga duración (LTP, por sus siglas en inglés *long-term potentiation*), el cual consiste en un aumento en los niveles de transmisión sináptica que persiste en el tiempo y es gatillado por determinados patrones de actividad neuronal que pueden durar sólo algunos segundos (los cambios se mantienen desde horas hasta días, meses o incluso años) (Bliss y Collingridge, 1993). Los procesos de LTP modifican la transmisión sináptica de forma sinapsis-específica y siguiendo una dinámica Hebbiana (Hebb, 2005), lo que significa que las sinapsis se fortalecen o debilitan dependiendo del correlato temporal entre la actividad de la neurona pre y postsináptica (Kelso, Ganong, y Brown, 1986). Un ejemplo de esto se esquematiza en el fenómeno de *plasticidad dependiente de la temporalidad de las descargas* (STDP, por sus siglas en inglés *spike-timing dependent plasticity*) (Fig. 1). En este caso, cuando se inducen repetidamente potenciales de acción en la neurona presináptica y luego en la postsináptica, con una ventana temporal de unos 10-20 ms, se induce LTP, y en el sentido contrario, cuando el potencial de acción postsináptico precede al presináptico se induce depresión de larga duración (LTD, proceso de efecto opuesto a la LTP, en que la transmisión se deprime

persistentemente). Es decir, la dirección de la plasticidad es dependiente del correlato temporal de los potenciales de acción.

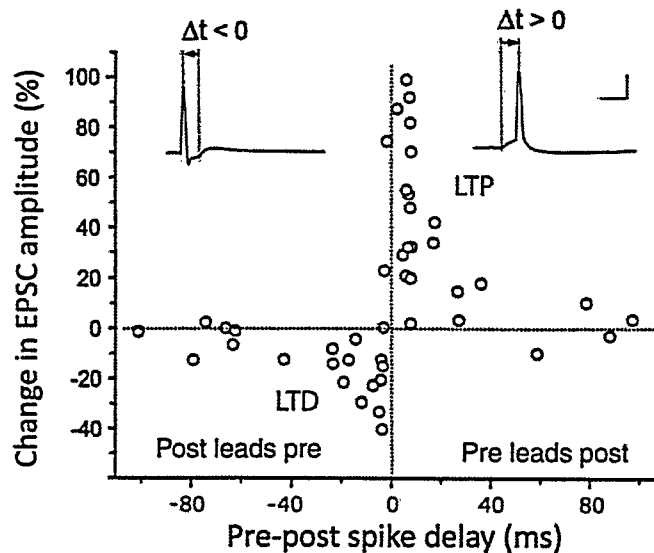


Figura 1. STDP en cultivo de hipocampo. Esta figura esquematiza el porcentaje de cambio de la transmisión sináptica en función del desfase temporal de los potenciales de acción de las neuronas pre y postsináptica (figura obtenida de Bi y Poo, 1998).

Las modificaciones Hebbianas son consideradas como un eje central en los procesos de almacenamiento de información en redes neuronales (Kelso y col., 1986), aunque los análisis *in silico* predicen que estos procesos tienden a desestabilizar las funciones neuronales (Miller y MacKay 1994). Esto es porque cuando una sinapsis es sometida a un proceso de LTP, el aumento sostenido en la transmisión incrementa la probabilidad de que la neurona postsináptica dispare, lo que promueve la generación de más LTP (Turrigiano, 2012). Por lo tanto, estas interacciones se retroalimentan positivamente, lo que lleva finalmente a la saturación (por eventos de LTP) o apagamiento total de la sinapsis (por eventos de LTD) y consiguientemente a un estado en que no ocurre plasticidad. Sin embargo, existen otros mecanismos conocidos como mecanismos de

plasticidad homeostática que actúan modificando la excitabilidad de forma contraria a los cambios crónicos en la actividad de la red generando una retroalimentación negativa. Los procesos de plasticidad homeostática ajustan dinámicamente la transmisión sináptica, canales iónicos o diversas propiedades intrínsecas de las neuronas, lo que permite mantener la excitabilidad neuronal en un rango dinámico (Turrigiano y Nelson, 2004). Esto se ha evidenciado comúnmente en cultivo de neuronas corticales, donde se ha reducido crónicamente la excitabilidad mediante la incubación con TTX (bloqueador de canales de sodio sensibles a voltaje) o CNQX (bloqueador de receptores de glutamato de tipo AMPA) (Turrigiano y Nelson, 2004). Tras dos días de inactivación, al remover las drogas, se observó que la frecuencia de los potenciales de acción había aumentado considerablemente respecto a la condición previa al tratamiento farmacológico (Fig. 2). En contraste, al hacer el tratamiento inverso y aumentar la excitabilidad bloqueando las corrientes sinápticas inhibitorias mediante bicuculina (bloqueador de receptores GABA_A), luego de dos días se recuperaba la frecuencia basal de los potenciales de acción (Fig. 2). Estos resultados indican que durante periodos prolongados de inactividad o hiperactividad ocurren cambios adaptativos que modifican la excitabilidad en sentido contrario a estas modificaciones.

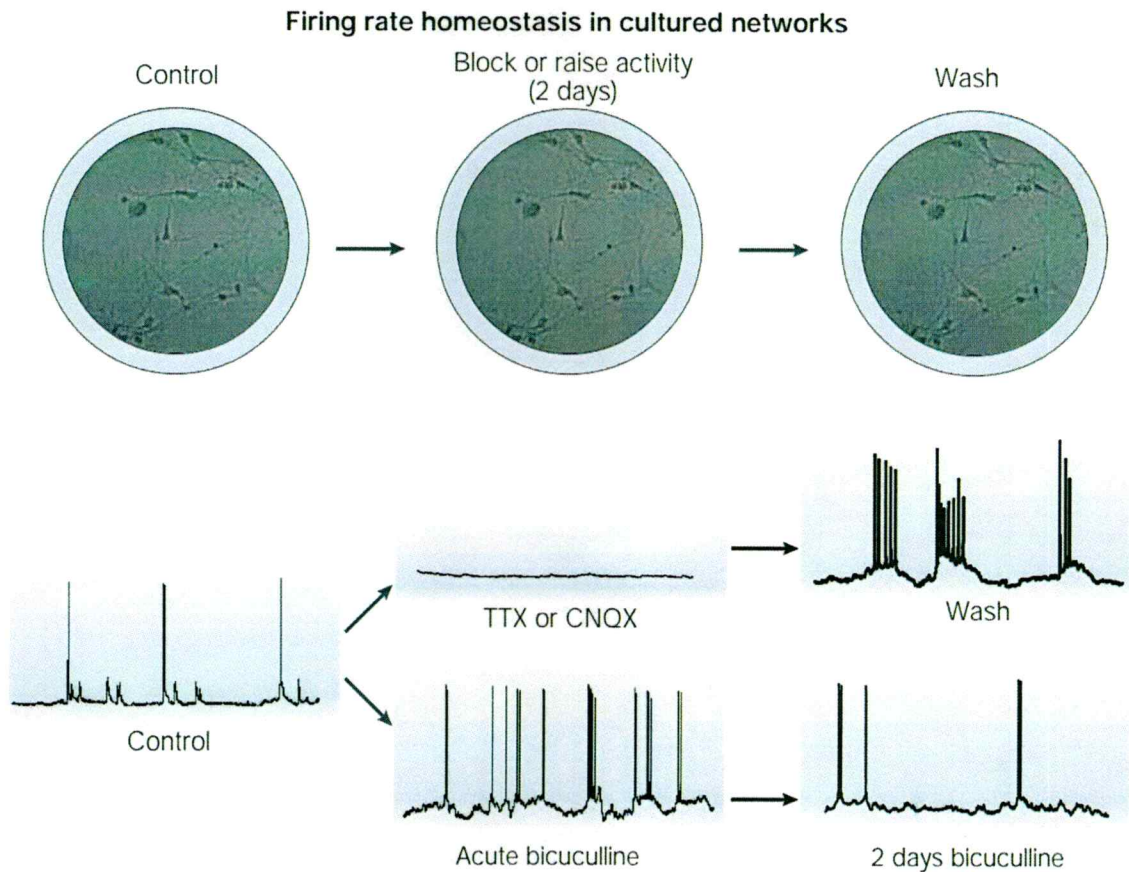


Figura 2. Plasticidad homeostática en cultivos de neuronas corticales. Al aplicar TTX o CNQX, las neuronas disminuyen rápidamente su actividad. Si el tratamiento es crónico (dos días), luego de remover la droga se observa un aumento considerable en la frecuencia de los potenciales de acción. Por otro lado, al tratar las neuronas con bicuculina se observa inmediatamente un aumento en la frecuencia de los potenciales de acción, los cuales vuelven a los niveles basales pasados dos días de incubación con la droga (Figura obtenida de Turrigiano y Nelson, 2004).

De esta forma los procesos de plasticidad sináptica se pueden clasificar en dos categorías opuestas pero complementarias: una de tipo Hebbiana, que modifica los circuitos neuronales de forma progresiva a través de modificaciones selectivas en las sinapsis (solo algunas sinapsis son afectadas) y otra, de tipo homeostática, que regula

las propiedades del circuito, estabilizando la actividad global de la red. A nivel sináptico, los procesos homeostáticos pueden afectar todas las sinapsis de una neurona.

Plasticidad sináptica homeostática (PSH): ¿Ajuste homeostático de la transmisión sináptica?

Los procesos homeostáticos pueden modular distintos dominios del circuito neuronal. En particular, se conoce como plasticidad sináptica homeostática (PSH) a aquellas modificaciones de tipo compensatorio que típicamente involucran ajustes globales en la transmisión de las sinapsis. Para estudiar los mecanismos de la PSH es necesario medir la eficiencia sináptica de un gran número de conexiones en una neurona. Esto se puede lograr midiendo las corrientes postsinápticas en miniatura (mPSC). Las mPSC son las corrientes generadas por la liberación espontánea del contenido de una vesícula de neurotransmisor, que se evidencian como pequeñas deflexiones en la corriente de mantención (~10 pA) al registrar células en la modalidad de "voltaje clamp". Cambios en la distribución de amplitudes de las mPSC revelan modificaciones en los receptores postsinápticos; por lo tanto, la medición de estos se utiliza como estrategia para estudiar cambios en la población de sinapsis de una neurona (Turrigiano, 2008). Diversos estudios han mostrado que la distribución de amplitudes de las mPSC aumenta o disminuye en respuesta a cambios en la excitabilidad de la red (O'Brien y col., 1998; Turrigiano y col., 1998; Kilman y col., 2002).

La dinámica de los cambios en la distribución de amplitudes de las mPSC durante los procesos homeostáticos no es trivial, y puede resultar fundamental en los procesos de codificación y decodificación de información en redes neuronales (Miller y MacKay, 1994). Inicialmente, modelos computacionales propusieron dos tipos de restricciones como candidatos posibles para estabilizar los modelos Hebbianos de almacenamiento de información; restricciones aditivas y multiplicativas (Miller y MacKay 1994). Estas

restricciones limitarían la excitabilidad de la red dentro de un rango dinámico. Serían aditivas (Fig. 3, izquierda), si se sustrae o adiciona la misma cantidad al peso sináptico de cada sinapsis o multiplicativas si se modifica cada sinapsis en proporción a su nivel de transmisión (Fig. 3, derecha). Si bien ambas estrategias son capaces de mantener la transmisión sináptica en un rango dinámico, los procesos aditivos alteran la proporción de los pesos sinápticos afectando mayormente las sinapsis más pequeñas, mientras que las modificaciones multiplicativas mantienen las diferencias relativas entre las sinapsis (como por ejemplo las diferencias producidas durante los eventos de LTP y LTD), esto ya que cada sinapsis es fortalecida o debilitada en proporción a su fuerza sináptica inicial (Fig. 3, porcentajes en la parte inferior). Las restricciones multiplicativas permiten mantener la eficiencia relativa de las diferentes sinapsis intactas (Turrigiano y Nelson 2004).

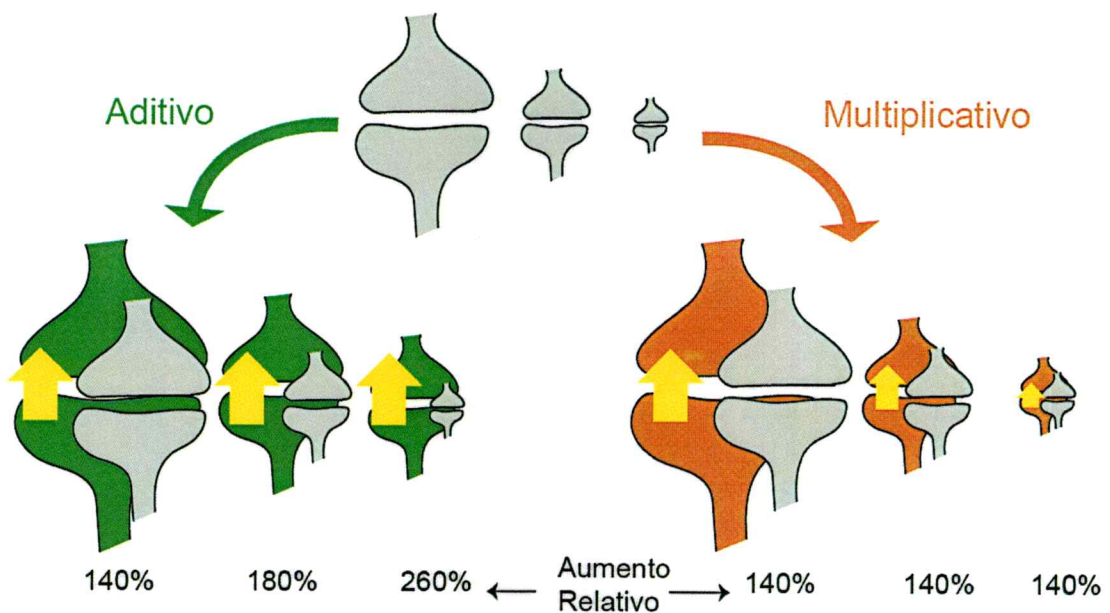


Figura 3. Restricciones aditivas y multiplicativas en los procesos homeostáticos. La transmisión promedio de la red puede ser reducida de dos formas, mediante una dinámica aditiva, si el efecto (expresado como flechas amarillas) es similar para cada

sinapsis, o de forma multiplicativa, si el efecto es proporcional al peso sináptico de cada sinapsis. Abajo se muestra el cambio relativo respecto al tamaño inicial.

La propuesta de regulaciones multiplicativas encontró su respaldo experimental por primera vez en los trabajos realizados por Turrigiano y col., (1998), donde se analizaron los cambios en la distribución de corrientes excitatorias postsinápticas en miniatura (mEPSC) tras la inactivación crónica mediante TTX de un cultivo de neuronas corticales. La Fig. 4A muestra la función de densidad de probabilidad acumulada de la distribución de amplitudes de las mEPSC (CPDF, por sus siglas en inglés *cumulative probability density function*). Para examinar la dinámica del cambio en las amplitudes se ordenaron de menor a mayor los eventos de la condición TTX y cada uno de éstos fue apareado (comparado) con su correspondiente en la secuencia obtenida sin tratamiento farmacológico (Fig. 4B). Tras realizar el apareamiento vieron que los datos se ajustaban en buena medida a una función lineal con pendiente mayor a 1 (lo que sugiere un aumento uniforme en la distribución de amplitudes). Congruentemente a esto, al transformar la distribución TTX por la función descrita según el ajuste lineal, se recuperaba la condición control (Fig. 4C). Este fenómeno corresponde a lo que se entiende como un proceso homeostático de tipo escalamiento sináptico.

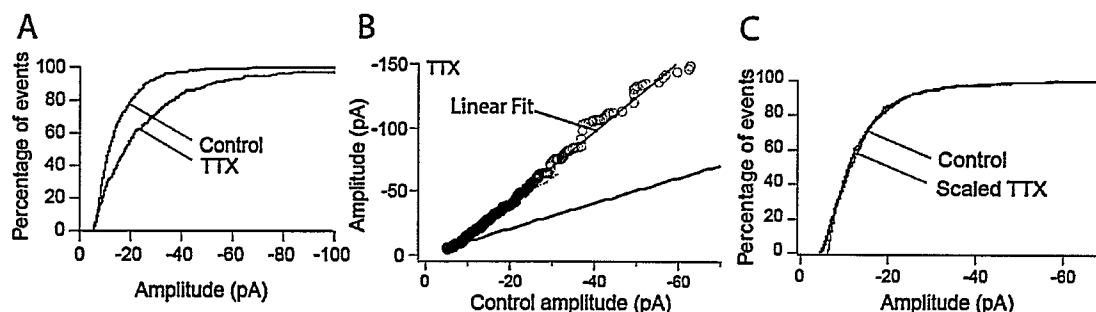


Figura 4. Escalamiento multiplicativo homeostático. A: diferencias en la función de densidad de probabilidad acumulada de la distribución de amplitudes de los mEPSC de neuronas previamente incubadas con TTX y distribución control en la cual no se incubó con el fármaco B: La distribución TTX se ordenó de menor a mayor y se apareó con la distribución control (Los círculos negros corresponden a los pares TTX/control). La línea gruesa negra representa la línea identidad, que es la línea que se obtendría si no hubiese cambio alguno en la distribución de eventos. El desplazamiento por sobre la línea identidad indica un aumento en la amplitud de los eventos. La línea fina de color negro es un ajuste lineal. C: Tras transformar la distribución de amplitudes de la condición TTX mediante la función obtenida del ajuste lineal se recupera la distribución control (Para más detalles de la metodología de este trabajo ver Materiales y Métodos) (Figura modificada de Turrigiano y col., 1998).

La gran mayoría de los estudios de escalamiento sináptico han sido descritos en cultivos neuronales u organotípicos luego del tratamiento crónico con fármacos que alteran la excitabilidad, esto principalmente porque los procesos homeostáticos se evidencian tras extensos periodos de inactividad o hiperactividad (usualmente días) lo que hace difícil la caracterización de éstos en modelos in vivo o en rebanadas agudas (Pozo y Goda, 2010). Sin embargo, existe al menos un trabajo en que estos procesos homeostáticos se han dado sin el requerimiento de fármacos que modulen la actividad; en cultivos organotípicos la disrupción de los aferentes entre la corteza entorrinal y el hipocampo es capaz de gatillar un proceso de escalamiento homeostático de las sinapsis excitatorias del giro dentado (Vlachos y col., 2012). De igual forma, también existen algunos casos en que los procesos homeostáticos se revelan en lapsos más breves (horas y no días), pero para ello se ha requerido el uso de drogas que disminuyan la actividad. Sutton y Schuman (2006) mostraron que al bloquear los

potenciales de acción y al mismo tiempo bloquear los receptores NMDA se gatilla un proceso homeostático un orden de magnitud más rápido que sólo tratando con TTX. Esto sugiere que los procesos rápidos de plasticidad homeostática involucran a los receptores de NMDA. En relación a esto, una de las diferencias de particular importancia entre los cultivos celulares y organotípicos con las rebanadas agudas de hipocampo es la diferencia en la actividad sináptica espontánea (Simoniý col., 2003; Szczot y col., 2010), siendo esta última entre 1 a 2 órdenes de magnitud menor en rebanadas agudas. Dado que durante el proceso de preparación de rebanadas agudas se cortan los aferentes sinápticos hacia el hipocampo y dada la baja actividad sináptica espontánea, en este trabajo se estudiarán los presuntos cambios adaptativos que pudiesen ocurrir en rebanadas agudas de hipocampo después del proceso de disección.

Estudiar los procesos homeostáticos en un contexto en que se mantengan una parte importante de las conexiones neuronales, y en que el sistema no se interfiera farmacológicamente supone un potencial interés para la medicina recuperativa, pues en la última década se han descrito diversas enfermedades relacionadas a procesos de PSH (Dickman y Wondolowski, 2013), entre ellas distintos tipos de autismo, algunas discapacidades intelectuales, esquizofrenia, y síndrome de X frágil. La comprensión de los procesos de PSH a un nivel celular y molecular es fundamental para el desarrollo de nuevos tratamientos médicos para estas enfermedades.

4.1 Hipótesis

Cambios de tipo homeostático ocurren a nivel sináptico en rebanadas agudas durante las 13 primeras horas post rebanado.

4.2 Objetivos

General:

En neuronas piramidales de CA1 de hipocampo, evaluar cambios en la transmisión sináptica a distintos tiempos post rebanado.

Específicos:

1. Medir cambios en la frecuencia y amplitud de las mEPSC a fin de evaluar modificaciones a nivel pre y/o postsináptico.
2. En caso de ocurrir cambios en la distribución de amplitudes de las mEPSC, evaluar si estos cambios son de tipo escalamiento sináptico.



5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Cuidado animal

Para ser anestesiadas las ratas fueron introducidas en una cámara cerrada de 25 cm³ que contenía una esfera de algodón de 15 g empapado con éter etílico. 1 minuto después de dormida la rata esta fue sacada de la cámara y sacrificada mediante decapitación. Los procedimientos con animales se realizaron de acuerdo a la directriz institucional fijada por el comité de bioética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

5.2 Protocolo de preparación de rebanadas de hipocampo.

Rebanadas transversales de hipocampo (350 μ m) provenientes de ratas entre 18 y 22 días de edad fueron preparadas utilizando un vibrátomo (1000 plus, vibratome®). Durante el procedimiento de disección el cerebro estuvo sumergido en una solución fría (4°C) que contenía (en mM): 125 NaCl, 2.6 KCl, 10 MgCl₂, 0.5 CaCl₂, 26 NaHCO₃, 1,23 NaH₂PO₄ y 10 D-glucosa (equilibrado con 95% O₂ y 5% CO₂), pH 7.3. El área de CA3 fue removida y luego las rebanadas se transfirieron a una cámara de interfaz invertida (con poros de 8 μ m de diámetro) que se encontraba en una atmósfera saturada con 95% O₂ y 5% CO₂ y a 30°C (Fig. 5). Cada una de las cámaras contenía entre 2 y 3 rebanadas bañadas con una gota de solución de líquido céfalo raquídeo artificial (LCRA) compuesto de (en mM): 125 NaCl, 26 NaHCO₃, 1 NaH₂PO₄, 2.6 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, y 10 D-glucosa. Luego de una hora de recuperación, la gota que cubría las rebanadas fue removida cuidadosamente y remplazada por LCRA fresco. Desde este punto las rebanadas estuvieron desde 3 hasta 12 horas en las cámaras de interfaz invertida.

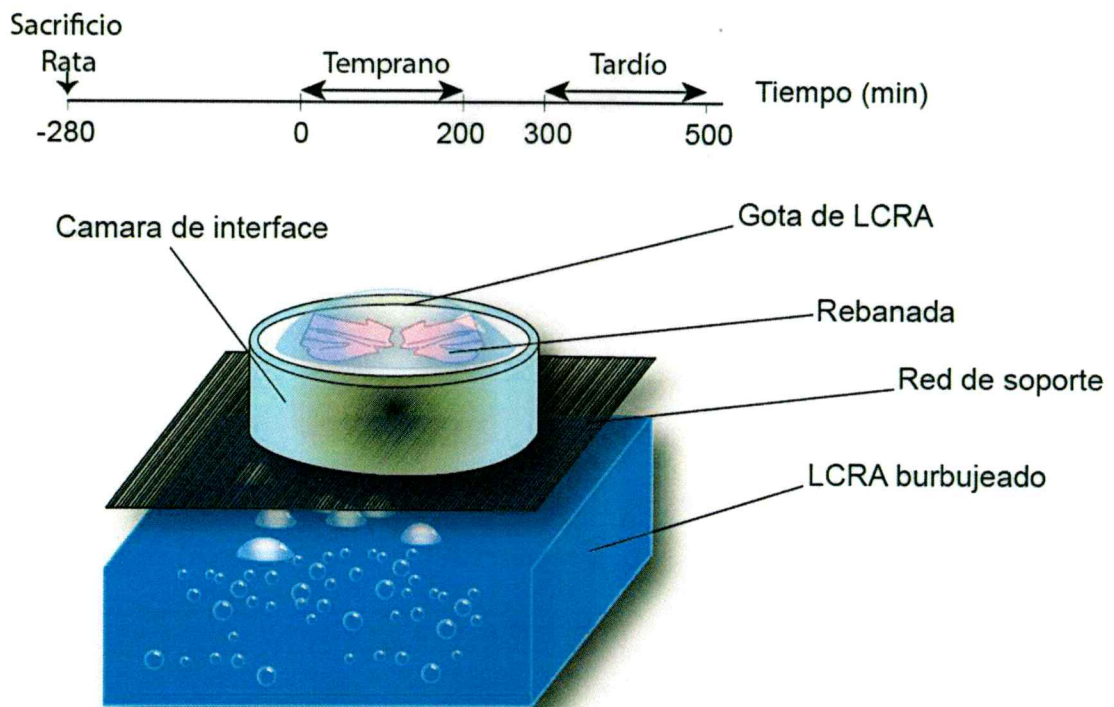


Figura 5. Diseño experimental utilizado. Las rebanadas fueron transferidas a una cámara de interfaz invertida como la que se ve en la figura. Las rebanadas reposaron al menos 280 minutos antes de comenzar los registros (periodo de recuperación). Los registros fueron realizados en los intervalos de tiempo nominados como “Temprano” y “Tardío”.

5.3 Registros electrofisiológicos

Para evaluar cambios en la transmisión sináptica se realizaron registros de patch clamp de célula completa en los intervalos de tiempos anotados en la figura 5 como “temprano” y “tardío”. Las rebanadas fueron transferidas a una cámara de inmersión montada en un microscopio (Nikon E600FN o Olympus BX51WI) equipado con microscopia de contraste por interferencia diferencial (DIC). La cámara fue perfundida continuamente (2–4 mL/min) con LCRA burbujeado con 95% O₂ y 5% CO₂,

recirculando un volumen total de 100 mL. Los experimentos fueron realizados a $30\pm 1^\circ\text{C}$. Los registros de patch clamp de célula completa se realizaron utilizando electrodos ($3\text{--}5\text{ M}\Omega$) fabricados con tubos capilares de boro silicato ($0.8 - 1.10 \times 100$ mm; Kimble Glass Inc) mediante un estirador de pipetas horizontal (Flaming/Brown P-97, Sutter Instrument Co). Los registros de "voltage clamp" fueron realizados con un amplificador EPC-10 (Heka, Heidelberg, Germany) y los datos fueron adquiridos a una frecuencia de muestreo de 20KHz y filtrados a 16KHz. Todos los experimentos se realizaron en presencia de $100\ \mu\text{M}$ picrotoxina (PTX; bloqueador de receptores GABA_A) y $1\ \mu\text{M}$ tetrodotoxina (TTX; bloqueador de canales de Na^+ dependientes de voltaje) (en el Anexo 1 se explica en detalle cómo se corroboró la acción de estas drogas). La composición de la solución de pipeta fue (en mM): 115 metanosulfonato de cesio, 20 cloruro de cesio, 0,6 EGTA, 10 HEPES, 4 $\text{Na}_2\text{-ATP}$, 0,4 Na-GTP , 10 $\text{Na}_2\text{-fosfocreatina}$ y $2.5\ \text{MgCl}_2$ (293 mOsm, 7,25 pH). Se utilizó cesio en lugar de potasio a fin de mejorar la resolución de los eventos en miniatura (aumenta la resistencia de membrana y constante de espacio). Para cada célula, los registros de mEPSC tuvieron una duración de 400 segundos y fueron realizados a $-72\ \text{mV}$ (esto es después de corregir el potencial de juntura líquida, PJJ).

5.3.1 Potencial de juntura líquido (PJJ)

El PJJ fue medido entre la solución de pipeta y el LCRA ($\sim 12\ \text{mV}$) de acuerdo al procedimiento descrito por Neher, (1992).

5.4 Análisis cuántico de los eventos en miniatura

La cuantificación de los eventos en miniatura y los análisis estadísticos de este estudio se hicieron usando el software Igor Pro versión 6.37 (Wavemetrics, Inc., Lake Oswego,

OR). Los eventos fueron analizados mediante un algoritmo personalizado, el cual se describe en detalle en el anexo 2. La amplitud promedio se estimó como la media de la amplitud de los eventos unitarios. La frecuencia promedio de los eventos se estimó como el inverso del promedio de los intervalos entre eventos.

5.5 Análisis estadístico y tratamiento de datos

A continuación, se explicarán las aproximaciones estadísticas usadas, su interpretación y el tratamiento de datos que requieren.

5.5.1 Comparación de dos distribuciones

Para evaluar si dos distribuciones son significativamente diferentes se compararon las curvas de función de densidad de probabilidad acumulada. Estas curvas permiten conocer la probabilidad "P" de encontrar un evento de amplitud menor o igual a "A", donde A es cualquier amplitud en la distribución. La figura 6 explica cómo se construyen estas curvas.

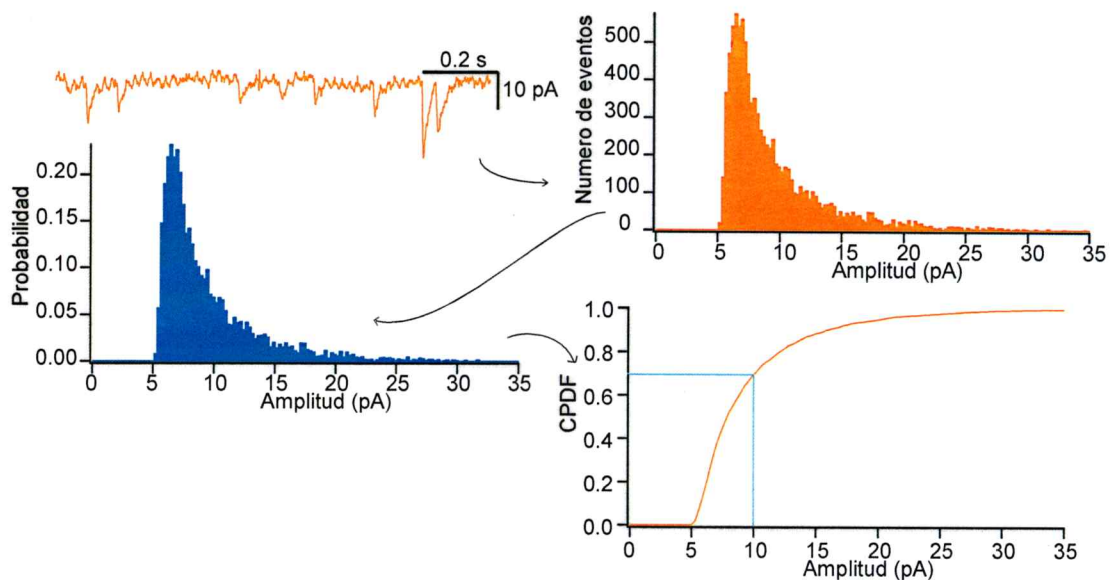


Figura 6. Curvas de función de densidad de probabilidad acumulada (CPDF). Las CPDF se construyen en tres pasos: 1) En el primer paso se crea un histograma de amplitudes a partir de los eventos registrados, 2) En el segundo paso se divide el número de observaciones de cada compartimiento del histograma por el número total de observaciones, obteniendo así el histograma de probabilidad, 3) en el tercer paso se integra el histograma de probabilidad para obtener la distribución de la probabilidad acumulada. A partir del grafico derecho inferior se puede desprender, por ejemplo, que el 75% de los eventos de la distribución son menor a 10pA (indicado por líneas celestes).

Para evaluar si dos CPDF son estadísticamente diferentes se utilizó el test de Kolmogorov-Smirnov (K-S), el cual consiste en estimar el valor máximo del estadígrafo “ D ”, el cual mide el mayor desplazamiento entre ambas curvas (Fig. 7). Posteriormente D se comparó con valores críticos obtenidos a partir de tablas o estimados mediante simulaciones de Montecarlo (la estimación y uso de los valores críticos se explica en detalle en el anexo 3).

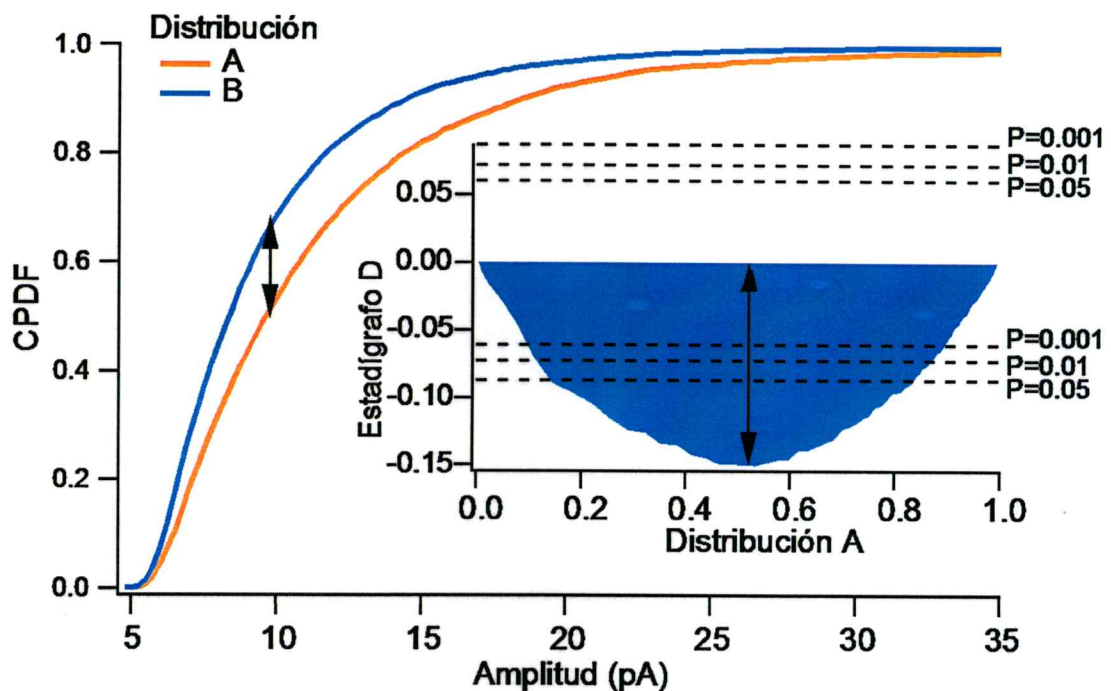


Figura 7. Test de Kolmogorov-Smirnov. Este test consiste en calcular el estadígrafo D , definido como el supremo de las distancias entre dos curvas. Por ejemplo, 10 pA ocupa la posición 0,5 en la distribución A, mientras que esta misma amplitud ocupa la posición 0,65 en la distribución B, es decir, hay un corrimiento de 0,15 (flecha negra). Al medir esta diferencia para cada una de las amplitudes se obtiene una curva como la mostrada en el inserto (Área azul: se muestra la distancia entre ambas curvas respecto a la distribución de A), de esta figura se puede determinar que la diferencia máxima alcanzada es efectivamente 0,15. Este valor se comparará con valores críticos previamente definidos (líneas achuradas) (Ver anexo 3), si D sobrepasa estos valores, las diferencias entre ambas curvas se consideran significativas.

5.5.2 Emparejamiento de distribuciones

Los procesos de escalamiento sináptico se han descrito apareando cada evento en miniatura, a partir de una condición control, con su equivalente en una distribución de prueba (Ej. Fig. 4). Para esto los datos son tratados de la siguiente forma (método usado originalmente en Turrigiano y col., 1998):

1. **Agrupación:** Para cada condición, los eventos registrados en todas las células de una condición se agrupan en un único conjunto que se utilizará para representar la distribución de dicha condición.
2. **Ranking:** Las mPSC de cada conjunto son ordenados de menor a mayor.
3. **Interpolación:** Dado a que es altamente probable que el número de eventos (n) entre los conjuntos sea distinto, no será posible emparejar todos las mPSC. Ante esto se opta por agregar datos por interpolación lineal (Fig. 8), lo cual permite aumentar el valor de n sin alterar la distribución, es decir, manteniendo los parámetros estadísticos (el promedio, la mediana, percentiles, máximos, mínimos etc...), ya que los eventos se agregan respetando los histogramas de probabilidad de las amplitudes.

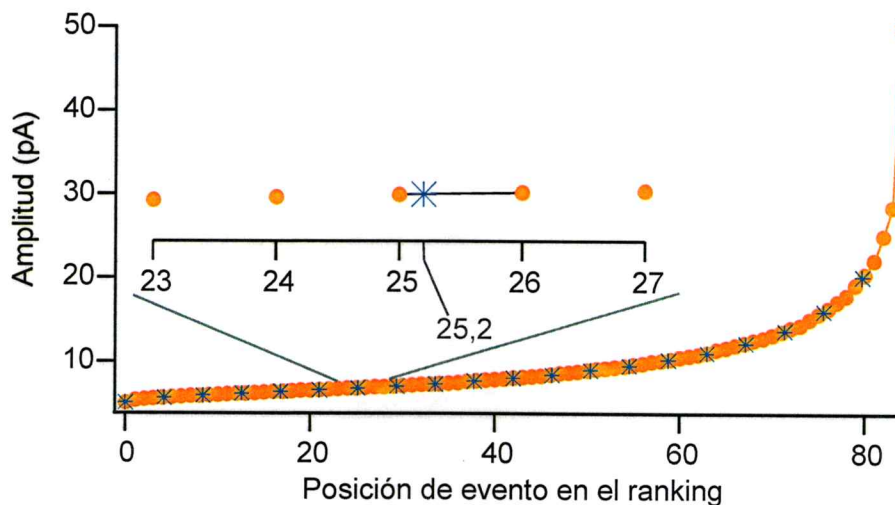


Figura 8. Ejemplo de adición de puntos por interpolación lineal. A una distribución de 85 puntos (círculos rojos) se le agregaron 21 puntos (asteriscos azules). Los puntos interpolados se distribuyen equitativamente a lo largo de la distribución, por ejemplo, el punto interpolado número 7 (mostrado a mayor escala) debería quedar en la posición 25,2 es decir entre el evento 25 y 26. Para estimar la amplitud de este punto se calculó la función lineal que pasa por los puntos 25 y 26 y se interpoló en 25,2.

6. RESULTADOS

6.1 Cambios en la amplitud y frecuencia de las mEPSC en función del tiempo revelan un proceso homeostático.

Para caracterizar las propiedades de las mEPSC post rebanado se realizaron registros de célula completa mediante la técnica de "voltage-clamp". En cada célula se estimó la frecuencia y amplitud promedio de las mEPSC. Al comparar el intervalo de tiempo temprano (0-200 min) versus el tardío (300-500 min) observamos un aumento significativo en la amplitud promedio de los eventos (temprano: $9,97 \pm 0,26$ pA, tardío: $11,41 \pm 0,37$ pA, diferencia: $14,00 \pm 4,38\%$, T de Student $P=0,003$) y en la frecuencia (temprano: $0,85 \pm 0,24$ Hz, tardío: $4,58 \pm 0,58$ Hz, diferencia: $280,40 \pm 59,34\%$, T de Student con corrección de Welch para varianzas desiguales $P=0,001$) (Fig. 9). Estos datos sugieren modificaciones pre y postsinápticas que tienen lugar algunas horas después del rebanado. La baja actividad espontánea durante las primeras horas (tiempos tempranos; registros entre 5-8 hrs después de rebanar) y el posterior aumento en la amplitud y frecuencia (9-11 hrs) es consistente con lo que se entiende como un proceso de plasticidad homeostática.

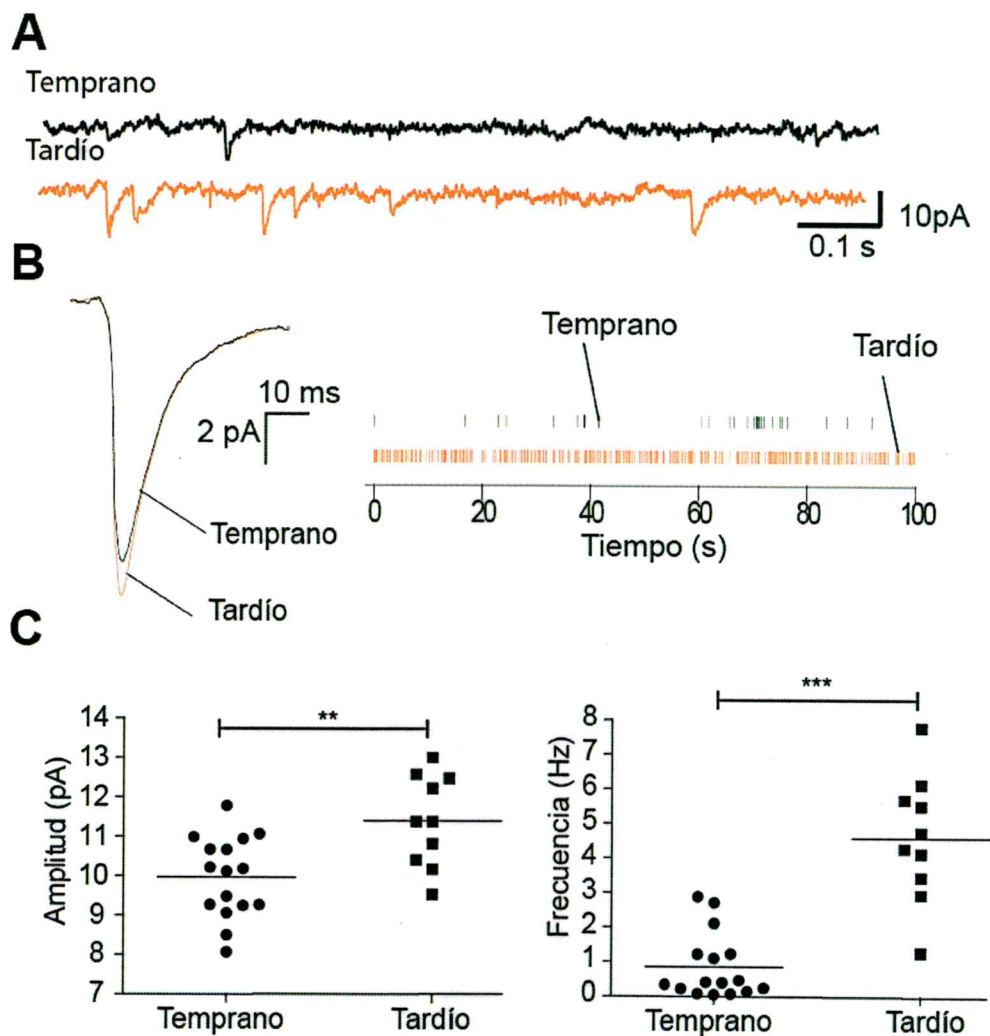


Figura 9. Aumento en la amplitud y frecuencia de las mEPSC en el tiempo. A: Registros representativos obtenidos a tiempos tempranos y tardíos. B: Izquierda: Superposición de eventos en miniatura promedio correspondientes a tiempos temprano y tardío. Derecha: Gráfico de *ráster* de eventos de dos células representativas en la fase temprana y tardía. C: Aumento en la amplitud y frecuencia promedio de las mEPSC en el tiempo (T de Student, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$. Tiempo temprano: círculos llenos $n=16$. Tiempo tardío: Cuadrados llenos, $n=10$. Para el caso de la amplitud no hay diferencias en las varianzas (F test $p=0,64$). En el caso de las frecuencias promedio, las diferencias en la varianza fueron corregidas mediante el test de Welch)

6.2 Agrupación de mEPSC en una distribución representativa.

Comúnmente para evaluar si los cambios en la amplitud entre dos condiciones siguen una dinámica de escalamiento sináptico se agrupan los minis de cada condición en una sola distribución (ver emparejamiento de distribuciones en Materiales y Métodos). No obstante, en este caso en particular, a tiempos tempranos la diferencia de frecuencia dentro de un mismo grupo puede ser mayor a un orden de magnitud (rango a tiempos tempranos: entre 0.04 y 2.87 Hz). Esto genera un sesgo importante ya que, las neuronas con mayor frecuencia ponderarán incluso 10 veces más que las neuronas con baja frecuencia.

Para solucionar este problema, en primer lugar, no se consideraron aquellas células con un número de eventos insuficientes para caracterizar una distribución, descartando aquellas con frecuencia menor a 0.2Hz (se registraron eventos durante 400 segundos, lo que equivale 80 eventos por célula). Este valor se determinó subjetivamente en base a las formas de las curvas de probabilidad acumulada de la distribución de amplitudes, las cuales con pocos datos presentan un aspecto escalonado. Según este criterio no se consideraron 5 células de un total de 16 obtenidas a tiempos tempranos. Segundo, para lograr una ponderación homogénea, se trataron los datos de forma tal que se contabilice un mismo número de eventos en cada célula. Para esto hay dos posibles alternativas, una es **eliminar datos aleatoriamente**, disminuyendo el valor de n en las células con mayor frecuencia, y otra es **agregar datos por interpolación**, aumentando el valor de n en aquellas células con menor frecuencia. Para evaluar ambas alternativas se estudió el efecto de llevar una distribución de 161 datos a 900 por interpolación y la operación inversa mediante eliminaciones aleatorias, es decir llevando una distribución de 900 datos a 161 (Fig. 10). La operación de interpolación

no altera la distribución de amplitudes (Fig. 10, izquierda). Por su parte, remover ese número de datos aleatoriamente sí altera la distribución de amplitudes (Fig. 10, derecha), esto indica que eliminar datos puede involucrar una pérdida importante en poder estadístico.

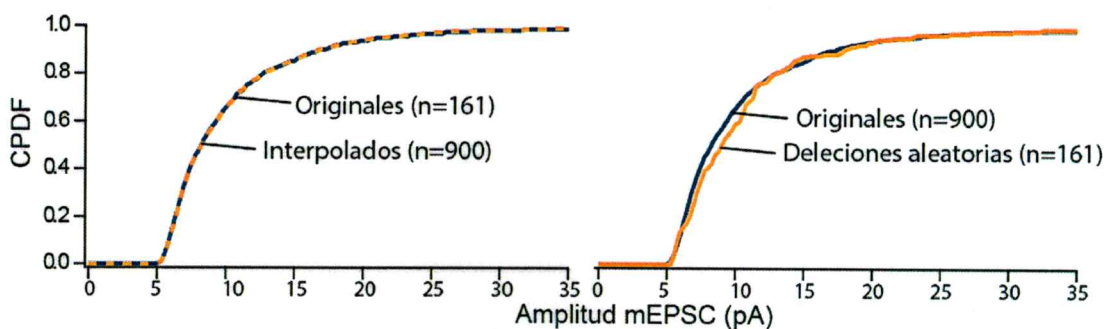


Figura 10. Efecto de la interpolación y remoción aleatorias. Cuadro de la izquierda: Agregar datos por interpolación no altera la distribución (K-S Distancia Max. =0,0043). Cuadro de la derecha: eliminar datos de forma aleatoria produce cambios en la distribución (K-S Distancia Max. =0,074).

Dado que es deseable mantener la proporción máxima de datos originales, se estimó el número máximo de datos que se pueden eliminar aleatoriamente sin producir alteraciones significativas en la distribución.

Para esto se tomó como muestra de prueba la célula con mayor número de eventos (3115 eventos), a ésta se le removieron datos aleatoriamente y se estimó el corrimiento máximo entre las CPDF antes y después de la delección de datos (Fig 11. A). Este procedimiento se repitió 10.000 veces, con lo cual se construyó una curva de probabilidades para el valor D (Fig. 11, B). A partir de esto se concluyó que llevar una distribución de 3115 eventos a 900 datos es razonable para no producir diferencias significativas en la distribución.

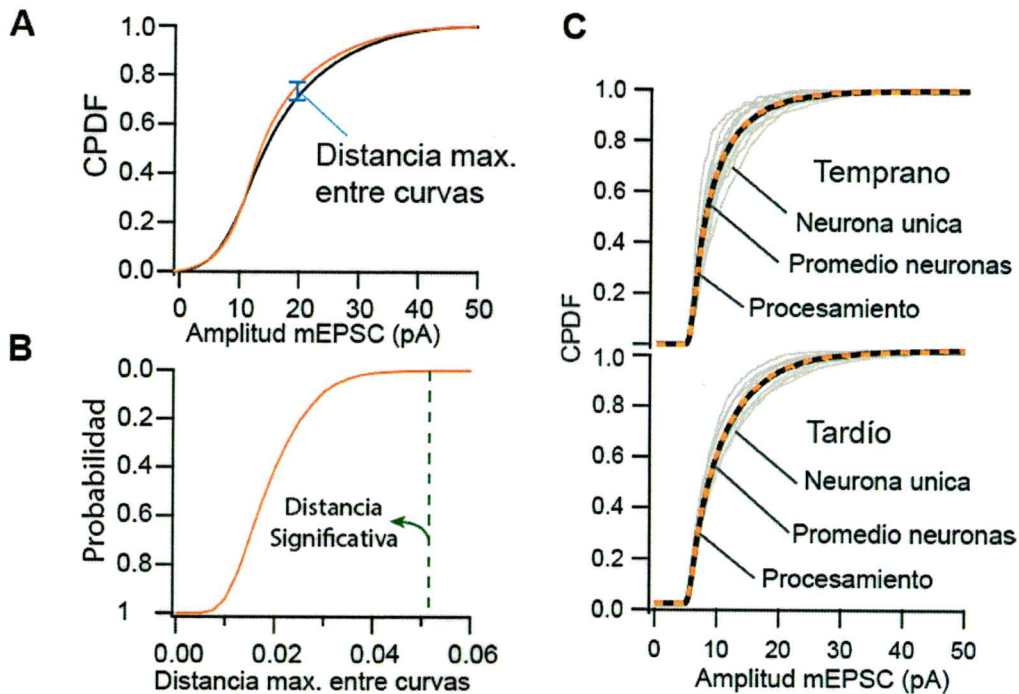


Figura 11. Minimización del error por eliminación aleatoria de eventos. A: Se llevó una distribución de 3115 a 900 eventos (línea roja y negra respectivamente). B: Este procedimiento se repitió 10.000 veces con lo cual se construyó una curva de probabilidad de las distancias máximas calculadas. La línea verde punteada corresponde a la distancia máxima equivalente a un $P = 0.05$ según las tablas de valores críticos para el test de K-S (distancia crítica). El panel B predice que la probabilidad de obtener una distancia mayor a la distancia crítica es de 6×10^{-4} , por lo tanto, remover datos hasta 900 eventos no altera la distribución. C: Gráfico de la CPDF de la amplitud de minis de neuronas individuales (gris), curva promedio (negro) generada a partir de las curvas individuales originales y curva generada después del procesamiento de datos aquí descrito (punteada roja). La curva obtenida luego del procesamiento es virtualmente idéntica a la curva promedio (K-S $p \sim 1$).

Del mismo modo se trataron los datos de cada célula con el fin de tener 900 eventos, ya sea interpolando o eliminando datos (el protocolo se realizó tanto a tiempos tempranos como tardíos). Una vez realizado esto, se continuó con los pasos usuales para emparejar distribuciones (ver Materiales y Métodos), con lo que se obtuvieron dos bloques de datos, cada uno con 9900 eventos. Para evaluar la fidelidad de la distribución obtenida se comparó la CPDF de ésta con la curva obtenida al promediar

cada una de las CPDF de las células individuales (Fig. 11, C), con lo que se obtuvieron dos curvas que se superponen casi completamente. Esto demuestra que el procesamiento de datos aquí realizado representa fidedignamente a las poblaciones tempranas y tardías.

6.3 La distribución de amplitudes aumenta siguiendo una dinámica de escalamiento sináptico.

A continuación, se buscó determinar cuál es la dinámica que gobierna este aumento en la amplitud de los minis, en particular, evaluar si este aumento sigue una regla de escalamiento sináptico. Como es de esperar, las distribuciones de datos agrupados a tiempos tempranos y tardíos son significativamente distintas (Simulaciones de Montecarlo $P=0.0148$) (Fig.12). Ahora, si los minis aumentan siguiendo una dinámica de escalamiento sináptico, debiese existir un factor "e" que al multiplicar una de las distribuciones haga estas diferencias no significativas. Es decir, para una distribución B que es la forma escalada de A, se cumpla que $B = A \cdot e$. No obstante, es necesario discutir primero un punto relevante sobre la medición experimental del escalamiento. Debido a la resolución de la técnica utilizada no es posible acceder al total de eventos de la distribución de amplitudes, ya que eventos menores a 5 pA quedan bajo el umbral de detección. Esto causa que, en situaciones en las que efectivamente hay un escalamiento sináptico, la igualdad $B = A \cdot e$ no se cumpla exactamente, sino que debe ser corregida agregando una constante aditiva. Para esquematizar esta problemática se realizó una simulación en que se escaló una distribución ficticia por el factor 1,5 (Fig. 13). Si suponemos acceso total a la distribución, una función del tipo $B = A \cdot e$ describiría precisamente el fenómeno (Fig. 13, izquierda), no obstante, si consideramos estas mismas distribuciones tomando en cuenta un umbral de detección, ocurre un

error en el emparejamiento de eventos que conduce a que el fenómeno sea pobremente descrito por una función del tipo $B = A \cdot e$ (Fig. 13, derecha). Sin embargo, independientemente del sesgo causado por el umbral de detección el emparejamiento conserva la linealidad, ajustándose esta vez a una función del tipo $B = A \cdot e^* + n$ (la recta de escalamiento no pasa exactamente por el origen y la pendiente "e" que anteriormente representaba el factor multiplicativo se cambia por la pendiente e'). Acorde a esta lógica, los procesos de escalamiento sináptico se han descrito en base a un ajuste de tipo $B = A \cdot e^* + n$ en lugar de $B = A \cdot e$ (Turrigiano y col., 1998, la primera publicación de escalamiento sináptico) (nótese que esta aproximación solo permite evaluar la posibilidad de un proceso de escalamiento sináptico sin determinar un factor de escalamiento "e". Como se determina el factor de escalamiento "e" se discute mas adelante).

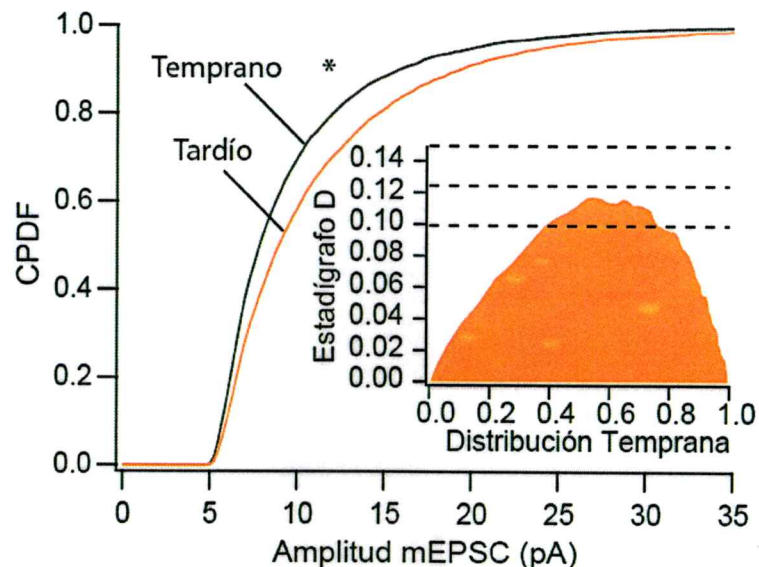


Figura 12. Las distribuciones de amplitud a tiempos tempranos y tardíos son estadísticamente distintas. La figura muestra las CPDF de ambas condiciones (Gris: tiempo temprano, Rojo: tiempo tardío). Simulaciones de Montecarlo revela diferencias significativas entre ambas distribuciones ($P = 0.0148$). Inserto: Distancias entre las

CPDF, la línea punteada representa los valores críticos para P igual a 0,05; 0,01 y 0,001 respectivamente.

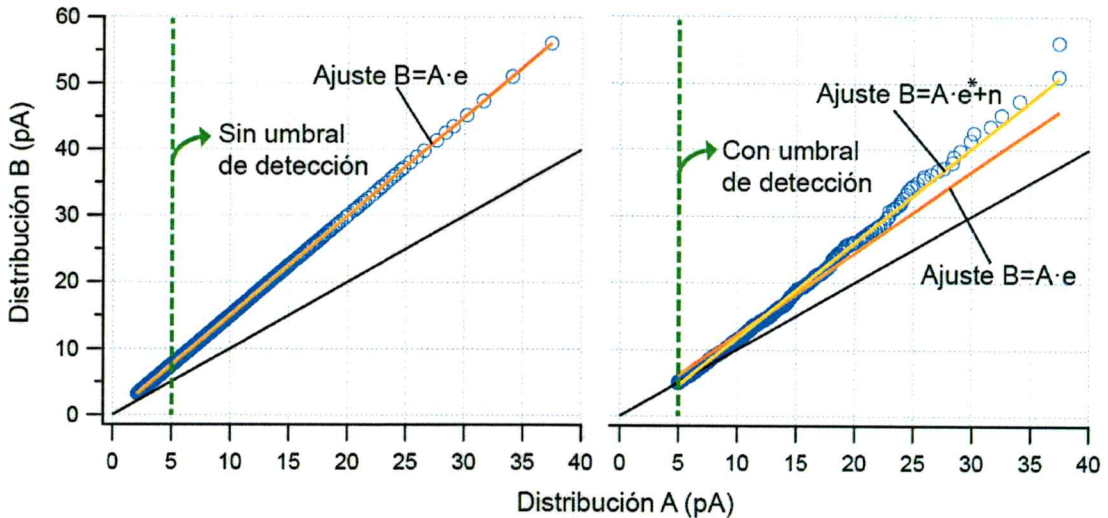


Figura 13. Esquematación del sesgo causado por el umbral de detección. Izquierda: Se realizó una simulación en la cual una distribución ficticia (distribución A) fue escalada por el factor 1.5, dando origen a la distribución B. En rojo se muestra el correspondiente ajuste lineal que intercepta al eje Y en 0. Derecha: En este caso se consideró un umbral, por ende, parte de los eventos no fueron considerados. En estas condiciones un ajuste lineal (línea roja) del tipo $B=A \cdot e$ representa pobremente a los datos. No obstante, la relación entre los datos sigue siendo lineal (línea amarilla).

Conforme a esto, para estudiar la dinámica del cambio de amplitudes de los minis se ordenaron los eventos de menor a mayor y se realizó un pareamiento (comparación punto a punto) de la distribución del intervalo de tiempo tardío con el temprano. En base al set de puntos obtenido se realizó un ajuste lineal, el cual refleja con fidelidad la relación entre los datos de ambas condiciones ($R^2=0.999$) (Fig. 14A). Para comprobar si este ajuste representa efectivamente la diferencia entre ambas distribuciones, se transformó la distribución temprano según la ecuación descrita por la función lineal. Tras realizar esta transformación las diferencias entre la distribución del intervalo de tiempo temprano y tardío se hacen no significativas (Fig. 14B). Esto sugiere fuertemente un proceso de escalamiento sináptico.

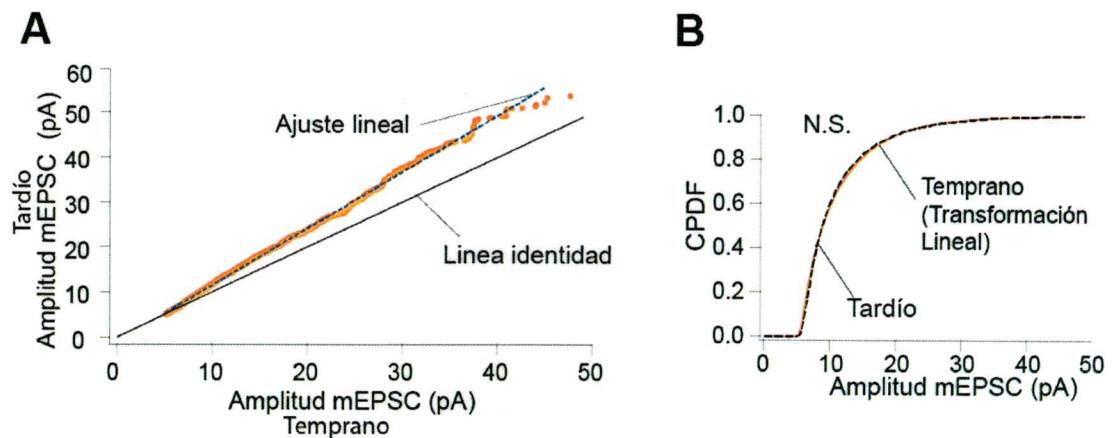


Figura 14. El pareamiento de las amplitudes de las mEPSC a intervalos de tiempo temprano y tardío apunta a un proceso de escalamiento sináptico . A: Gráfico de pareamiento de las amplitudes ordenadas me menor a mayor. La línea negra es la línea identidad, que corresponde a lo que se obtendría si no hubiese cambios en la distribución. Valores por sobre esta línea indican un crecimiento de las amplitudes, mientras que valores por debajo indican una disminución. La línea azul es la función lineal que mejor se ajusta a la distribución ($y= 1.28 *x -1.19$ (pA), x: temprano, y: tardío; $R^2= 0.999$). B: Comparación de la CPDF tardía con la curva obtenida a partir de la transformación lineal de la distribución temprana. Ambas curvas se sobrepone, confirmando un proceso de escalamiento sináptico. No hay diferencias significativas según análisis mediante simulaciones de Montecarlo ($P= 0.49$).

6.3.1 Determinación del factor multiplicativo por método alternativo

Habiendo determinado la linealidad en el pareamiento de las distribuciones, es posible determinar un factor de escalamiento empírico en base a la aproximación de Kim y col., (2012). Ésta consiste en encontrar el factor multiplicativo que mejor recapitula el cambio en la distribución (aquel que produce un menor estadígrafo D entre las CPDF). Para esto se realizan cientos a miles de simulaciones en donde se prueban distintos factores multiplicativos a modo de estimar empíricamente el factor multiplicativo que produce la menor distancia máxima entre las curvas de CPDF (Fig. 15A). La ventaja de este método es que es inmune a los problemas asociados al umbral de detección, ya que se escala en la dirección tiempo tardío \rightarrow temprano (es decir, dividiendo la

distribución del intervalo de tiempo tardío en vez de multiplicar el temprano), esto permite descartar aquellos eventos que caigan por debajo del umbral de detección.

Al realizar esta aproximación se estimó que la función que mejor predice el cambio entre la distribución del intervalo de tiempo tardío al temprano es aquella que se obtiene por la transformación $x = 0,914 * y$ (Fig. 15B). Al multiplicar la distribución de amplitudes de cada una de las células del intervalo de tiempo tardío por este factor las diferencias entre los intervalos de tiempo temprano y tardío se vuelven no significativamente distintas (simulaciones de Montecarlo $P=0.312$).

Esto indica que las diferencias de amplitud entre los intervalos de tiempo temprano y tardío se pueden describir por una dinámica de escalamiento sináptico, en el cual cada una de las mEPSC aumenta un 9% relativo a su magnitud a tiempos tempranos.

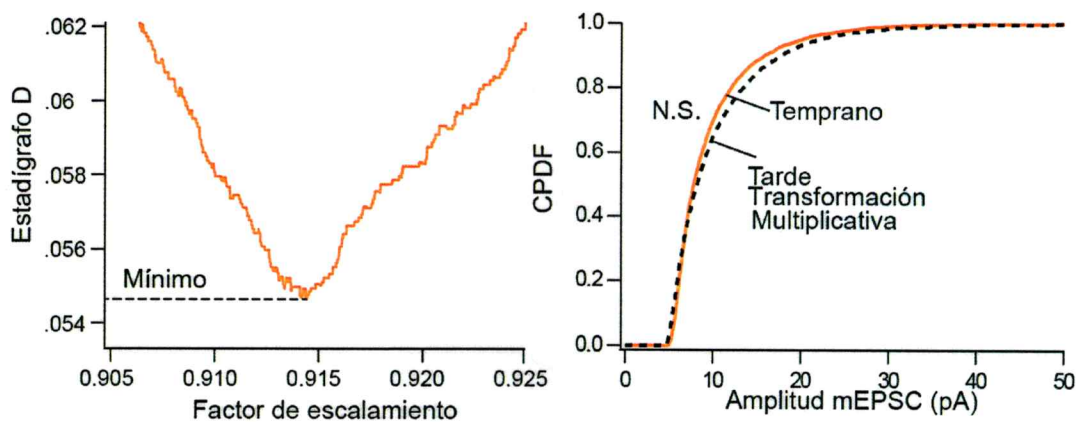


Figura 15. Determinación del factor de escalamiento. Izquierda: Multiplicando la distribución del intervalo de tiempo tardío por distintos factores se puede encontrar el factor que minimiza el valor del estadígrafo D respecto a la CPDF a tiempos tempranos. Se estimó que el factor 0,9144 es el que mejor representa el cambio entre ambas distribuciones. Derecha: Luego de escalar por este factor, la CPDF a tiempo tardíos se sobreponen en buena medida con la CPDF a tiempos tempranos, confirmando que la transformación recopila el efecto observado en el tiempo (simulaciones de Montecarlo $P= 0.312$).

Estos resultados muestran la existencia de un proceso comparativamente rápido de plasticidad homeostática en rebanadas agudas de hipocampo que se desencadena sin necesidad de tratamiento farmacológico.

7. DISCUSIÓN

Los procesos homeostáticos sinápticos son complejos, pueden o no ser de tipo multiplicativo, varían ampliamente en su fenomenología y mecanismos subyacentes, dependiendo de las distintas regiones estudiadas y condiciones experimentales (cultivos celulares, organotípicos, *in vivo*, etc; Turrigiano, 2008; Turrigiano y col., 2012), aunque se han propuesto algunos agentes moleculares que serían comunes en estos procesos. En esta sección se discutirá cuáles de estos agentes moleculares podrían dar cuenta de los resultados aquí obtenidos.

7.1 Aumento en la amplitud y frecuencia de los eventos en miniatura.

Nuestros resultados muestran que tanto la amplitud y frecuencia promedio de las mEPSC aumenta entre los intervalos de tiempo temprano y tardío. Esto sugiere dos formas distintas de plasticidad homeostática actuando simultáneamente, pues aumentos en la amplitud o frecuencia de las mPSC se han visto de forma independiente en distintos contextos de plasticidad homeostática. En los primeros estudios realizados en cultivos de neuronas corticales se vio que inhibir los potenciales de acción o la transmisión mediada por receptores AMPA durante 1 a 2 días producía un aumento en la amplitud, pero no en la frecuencia de los mEPSC (Turrigiano y col., 1998; O'Brien y col., 1998; Kilman y col., 2002). Sin embargo, trabajos posteriores en fibras neuromusculares y cultivos de neuronas de hipocampo han revelados formas de plasticidad homeostática que son congruentes a cambios en la frecuencia de las mPSC (Murthy y col., 2001; Paradis y col., 2001). De igual forma, esto se ha mostrado en estudios *in vivo* de hipocampo, en forma dependiente de la edad (Echegoyen y col., 2007). La inconexión entre ambas formas de plasticidad homeostática sugiere mecanismos independientes para ambas formas de plasticidad.

Los aumentos en la frecuencia promedio aquí observados podrían deberse a tres posibles alteraciones: cambios en la probabilidad de liberación de neurotransmisor, cambios en el número de contactos sinápticos o conversión de sinapsis silentes (sinapsis que carecen de receptores tipo AMPA, pero presentan receptores de tipo NMDA) a sinapsis funcionales. No obstante, en este caso en particular en que el proceso homeostático se desarrolla en algunas horas, es poco probable que el aumento en la frecuencia esté dado por un aumento en los contactos sinápticos, ya que estos fenómenos suelen desarrollarse, en un contexto homeostático, tras varios días de inactivación (Burrone y col., 2002). Para evaluar cambios en la probabilidad de liberación de neurotransmisor, una alternativa sería realizar un protocolo de facilitación por pulsos pareados (Héss y col., 1987). Finalmente, para estimar cambios en la proporción de sinapsis silentes se podría evaluar la frecuencia relativa de los minis registrados a -70 mV (condición en que las corrientes a través de receptores de NMDA están bloqueadas por magnesio) y a $+40$ mV, situación en la que contribuyen también las sinapsis silentes, si las hay.

El aumento en la amplitud de las mEPSC aquí observado puede ser interpretado como modificaciones en la conductancia y/o número de receptores glutamatérgicos (Turrigiano, 2008). No obstante, no se descarta que parte de los cambios vistos se deban a cambios en el contenido de neurotransmisor. Por ejemplo, existen evidencias de que el transportador vesicular de glutamato VGLUT aumenta sus niveles de expresión en los terminales presinápticos tras un periodo de inactivación, lo que sugiere cambios en el contenido de neurotransmisor dentro de las vesículas (De Gois y col., 2005). Sin embargo, esto sólo se ha observado tras varios días en cultivo, por lo

que cambios en los receptores sinápticos sigue siendo la explicación más probable dado el desarrollo temporal del proceso homeostático aquí descrito.

7.2 Un proceso de escalamiento homeostático rápido.

A diferencia de los casos clásicos de escalamiento sináptico (Turrigiano y col., 1998; O'Brien y col., 1998; Kilman y col., 2002) y de un gran número de reportes posteriores, en que los cambios homeostáticos se generaron después de varios días de inactivación, el proceso visto aquí se da entre 5 a 13 horas post rebanado.

Cambios homeostáticos con desarrollo temporal similar a este han sido descritos por Sutton y col., 2006. En rebanadas agudas y cultivadas se ha visto que el bloqueo de las corrientes tipo NMDA en conjunto con los potenciales de acción, produce un proceso homeostático luego de tan solo 3 horas. Además, se determinó que éste se daba exclusivamente por el aumento de receptores AMPA homómeros de GluA1 (carentes de subunidades GluA2), los cuales son permeables a calcio. En respaldo a esto, al utilizar drogas que bloquean específicamente la transmisión mediada por homómeros de GluA1 se recupera la situación control, alteración que no ocurría en las formas de plasticidad homeostática lentas. Ante esto, nuestros datos sugieren que el receptor de NMDA podría ser un agente relevante en el proceso homeostático aquí descrito. Dado que las rebanadas agudas de hipocampo poseen casi nula actividad sináptica a tiempos tempranos, pudiese ser que la poca transmisión espontánea recopile los efectos observados al bloquear receptores NMDA en neuronas disociadas, permitiendo el desarrollo de esta forma rápida de plasticidad homeostática. Consistente a esta predicción, el aumento en la amplitud de las mEPSC podría deberse al aumento de receptores AMPA carentes de subunidades GluA2.

¿Qué gatilla este proceso homeostático? Es factible que el corte de las vías sinápticas aferentes durante el proceso de preparación de las rebanadas sea suficiente para gatillar este proceso. En cultivos organotípicos la denervación de los aferentes entre la corteza entorrinal y el hipocampo produce escalamiento homeostático de las sinapsis excitatorias del giro dentado, el cual ocurre luego de una disminución significativa en la frecuencia de las mEPSC (Vlachos y col., 2012). No obstante, dado las condiciones experimentales, no se puede descartar otros posibles factores como la concentración de metabolitos en el medio extracelular que recubre a las rebanadas durante el tiempo de incubación en la cámara de interface invertida. Sin embargo, es importante recalcar que el método de incubación aquí descrito (cámara de interface, soluciones y temperatura) es similar al utilizado por otros grupos de trabajo (Lipton y col., 1995).

Los resultados presentados en este trabajo son interesantes porque evidencian por primera vez un proceso rápido de escalamiento sináptico en rebanadas agudas, gatillado sin el uso de fármacos. Debido a que este modelo, a diferencia de los cultivos, conserva en importante medida la anatomía y conexiones locales del hipocampo, permite una aproximación más fisiológica al estudio de los mecanismos de plasticidad homeostática. De hecho, una de las desventajas de los cultivos de neuronas disociadas, que es donde se han realizado la mayoría de los estudios de escalamiento homeostático, es que los componentes sinápticos son difícilmente asimilables a las situaciones *in vivo* o de rebanadas agudas.

7.3 Proyecciones

Los procesos de escalamiento sináptico mantienen las diferencias relativas en la transmisión de las sinapsis. Una potencial proyección de este trabajo es determinar cuales son el o los agentes moleculares que permitirían producir un cambio

proporcional a la fuerza sináptica de cada sinapsis. Probablemente, una señal intracelular clave sea el calcio, pues tras bloquear canales de calcio con NiCl_2 se recapitulan los efectos homeostáticos generados por la inactivación con TTX (Ibata y col., 2008). Una proteína candidata como agente sensor de actividad es la holoenzima CaMKII, la cual ha sido ampliamente descrita como agente regulador de la transmisión en los contextos de LTP (Lisman y col., 2012; Sanhueza y Lisman, 2013). Esta proteína es atractiva como mediador de los procesos de escalamiento, en primer lugar, porque es capaz de modificar la transmisión de sinapsis glutamatérgicas en respuesta a cambios en la concentración de calcio en la sinapsis (Lisman y col., 2002). Segundo porque media estos cambios uniéndose específicamente con la subunidad GluN2B de los NMDARs (Lisman y col., 2012; Sanhueza y Lisman, 2013), una interacción que además de ser necesaria para generar LTP, recientemente se ha reportado que tendría una función también en la expresión de procesos de plasticidad homeostática (Wang y col., 2011). La unión de CaMKII a los receptores NMDA le otorga una localización estratégica y le permite interactuar con diversas proteínas de las densidades sinápticas, entre ellas receptores glutamatérgicos y proteínas accesorias que han sido relacionadas con procesos de PSH, como GKAP (Shin y col., 2012) y SynGAP (Wang y col., 2011; Wang y col., 2013). En tercer lugar, la composición de subunidades α y β de CaMKII varía en respuesta a cambios en la actividad sináptica, lo que define su ubicación subcelular y su afinidad por calcio, y por ende su capacidad de modificar proteínas en las densidades sinápticas, (Thiagarajan y col., 2002).

Otra pregunta a abordar es si este proceso requiere la transcripción o traducción de proteínas. Trabajos anteriores muestran que las formas rápidas de plasticidad homeostática son dependientes de la síntesis de proteínas, pero no de la transcripción,

mientras que las lentas requieren ambas (Aoto y col., 2008; Wang y col., 2011). Esto es relevante, ya que en neuronas del sistema nervioso central la transcripción está limitada al núcleo mientras que la expresión de proteínas puede darse también en dendritas (Sutton y col., 2006; Sutton y Schuman, 2006), ante lo cual es necesario estudiar cuáles pueden ser los componentes dendríticos y somáticos involucrados en este proceso.

Varias de estas proyecciones están siendo actualmente o será abordada por nuestro equipo de trabajo. Por ejemplo, el rol de CaMKII y su interacción con el receptor de NMDA, cambios en las subunidades de receptores glutamatérgicos mediante Western-blot o medición de corrientes evocadas, cambios en la proporción de sinapsis silentes y cambios en la probabilidad de liberación de neurotransmisor.

8. CONCLUSIÓN

Cambios significativos de tipo homeostático ocurren en rebanadas agudas sin intervención farmacológica tras 4 horas post desaferentación. Estos cambios involucran aumentos tanto en la amplitud como la frecuencia de los mEPSC. Además, los cambios en la amplitud siguen una dinámica de escalamiento sináptico (i.e. las amplitudes de los eventos aumentan proporcionalmente), lo que es muy importante pues permitiría que se mantengan los diferentes pesos relativos de las sinapsis, generados previamente por procesos de LTP o LTD.



9. BIBLIOGRAFÍA

- Aoto, J., Nam, C. I., Poon, M. M., Ting, P. y Chen, L. (2008).** Synaptic signaling by all-trans retinoic acid in homeostatic synaptic plasticity. *Neuron*, 60(2), 308-320.
- Berlucchi, G. y Buchtel, H. A. (2009).** Neuronal plasticity: historical roots and evolution of meaning. *Experimental Brain Research*, 192(3), 307-319.
- Bi, G. Q. y Poo, M. M. (1998).** Synaptic modifications in cultured hippocampal neurons: dependence on spike timing, synaptic strength, and postsynaptic cell type. *The Journal of neuroscience*, 18(24), 10464-10472.
- Bliss, T. V. y Collingridge, G. L. (1993).** A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 361(6407), 31-39.
- Burrone, J., O'Byrne, M. y Murthy, V. N. (2002).** Multiple forms of synaptic plasticity triggered by selective suppression of activity in individual neurons. *Nature*, 420(6914), 414-418.
- De Gois, S., Schäfer, M. K. H., Defamie, N., Chen, C., Ricci, A., Weihe, E. y Erickson, J. D. (2005).** Homeostatic scaling of vesicular glutamate and GABA transporter expression in rat neocortical circuits. *The Journal of neuroscience*, 25(31), 7121-7133.
- Dickman, D. y Wondolowski, J. (2013).** Emerging links between homeostatic synaptic plasticity and neurological disease. *Frontiers in cellular neuroscience*, 7, 223.
- Echegoyen, J., Neu, A., Graber, K. D. y Soltesz, I. (2007).** Homeostatic plasticity studied using in vivo hippocampal activity-blockade: synaptic scaling, intrinsic plasticity and age-dependence. *PloS one*, 2(8), e700.
- Hebb, D. O. (2005).** *The organization of behavior: A neuropsychological theory.* Psychology Press.
- Hess, G., Kuhnt, U. y Voronin, L. L. (1987).** Quantal analysis of paired-pulse facilitation in guinea pig hippocampal slices. *Neuroscience letters*, 77(2), 187-192.
- Ibata, K., Sun, Q. y Turrigiano, G. G. (2008).** Rapid synaptic scaling induced by changes in postsynaptic firing. *Neuron*, 57(6), 819-826.

- Kelso, S. R., Ganong, A. H. y Brown, T. H. (1986).** Hebbian synapses in hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(14), 5326-5330.
- Kilman, V., van Rossum, M. C. y Turrigiano, G. G. (2002).** Activity deprivation reduces miniature IPSC amplitude by decreasing the number of postsynaptic GABAA receptors clustered at neocortical synapses. *The Journal of Neuroscience*, 22(4), 1328-1337.
- Kim, J., Tsien, R. W. y Alger, B. E. (2012).** An improved test for detecting multiplicative homeostatic synaptic scaling. *PloS one*, 7(5), e37364.
- Kudoh, S. N. y Taguchi, T. (2002).** A simple exploratory algorithm for the accurate and fast detection of spontaneous synaptic events. *Biosensors and Bioelectronics*, 17(9), 773-782.
- Lipton, P., Aitken, P. G., Dudek, F. E., Eskessen, K., Espanol, M. T., Ferchmin, P. A. ... y Leybaert, L. (1995).** Making the best of brain slices; comparing preparative methods. *Journal of neuroscience methods*, 59(1), 151-156.
- Lisman, J., Schulman, H. y Cline, H. (2002).** The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(3), 175-190.
- Lisman, J., Yasuda, R. y Raghavachari, S. (2012).** Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. *Nature Reviews Neuroscience*, 13(3), 169-182.
- Miller, K. D. y MacKay, D. J. (1994).** The role of constraints in Hebbian learning. *Neural Computation*, 6(1), 100-126.
- Murthy, V. SN., Schikorski, T., Stevens, C. F. y Zhu, Y. (2001).** Inactivity produces increases in neurotransmitter release and synapse size. *Neuron*, 32(4), 673-682.
- Neher, E. (1992).** Correction for liquid junction potentials in patch clamp experiments. *Methods in enzymology*, 207, 123-131.
- O'Brien, R. J., Kamboj, S., Ehlers, M. D., Rosen, K. R., Fischbach, G. D. y Huganir, R. L. (1998).** Activity-dependent modulation of synaptic AMPA receptor accumulation. *Neuron*, 21(5), 1067-1078.
- Paradis, S., Sweeney, S. T. y Davis, G. W. (2001).** Homeostatic control of presynaptic release is triggered by postsynaptic membrane depolarization. *Neuron*, 30(3), 737-749.

- Pozo, K. y Goda, Y. (2010).** Unraveling mechanisms of homeostatic synaptic plasticity. *Neuron*, 66(3), 337-351.
- Rodier, P. M. (1980).** Chronology of neuron development: animal studies and their clinical implications. *Developmental Medicine y Child Neurology*, 22(4), 525-545.
- Sanhueza, M. y Lisman, J. (2013).** The CaMKII/NMDAR complex as a molecular memory. *Molecular brain*, 6(1), 1.
- Szczot, M., Wojtowicz, T. y Mozrzymas, J. W. (2010).** GABAergic and glutamatergic currents in hippocampal slices and neuronal cultures show profound differences: a clue to a potent homeostatic modulation. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 61(4), 501.
- Simoni, A., Griesinger, C. B. y Edwards, F. A. (2003).** Development of rat CA1 neurones in acute versus organotypic slices: role of experience in synaptic morphology and activity. *The Journal of physiology*, 550(1), 135-147.
- Shin, S. M., Zhang, N., Hansen, J., Gerges, N. Z., Pak, D. T., Sheng, M. y Lee, S. H. (2012).** GKAP orchestrates activity-dependent postsynaptic protein remodeling and homeostatic scaling. *Nature neuroscience*, 15(12), 1655-1666.
- Stellwagen, D. y Malenka, R. C. (2006).** Synaptic scaling mediated by glial TNF- α . *Nature*, 440(7087), 1054-1059.
- Sutton, M. A., Ito, H. T., Cressy, P., Kempf, C., Woo, J. C. y Schuman, E. M. (2006).** Miniature neurotransmission stabilizes synaptic function via tonic suppression of local dendritic protein synthesis. *Cell*, 125(4), 785-799.
- Sutton, M. A. y Schuman, E. M. (2006).** Dendritic protein synthesis, synaptic plasticity, and memory. *Cell*, 127(1), 49-58.
- Massey Jr, F. J. (1951).** The Kolmogorov-Smirnov test for goodness of fit. *Journal of the American statistical Association*, 46(253), 68-78.
- Thiagarajan, T. C., Piedras-Renteria, E. S. y Tsien, R. W. (2002).** α - and β CaMKII: inverse regulation by neuronal activity and opposing effects on synaptic strength. *Neuron*, 36(6), 1103-1114.

Turrigiano, G. G. (2008). The self-tuning neuron: synaptic scaling of excitatory synapses. *Cell*, 135(3), 422-435.

Turrigiano, G. G. (2012). Homeostatic synaptic plasticity: local and global mechanisms for stabilizing neuronal function. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(1), a005736.

Turrigiano, G. G., Leslie, K. R., Desai, N. S., Rutherford, L. C. y Nelson, S. B. (1998). Activity-dependent scaling of quantal amplitude in neocortical neurons. *Nature*, 391(6670), 892-896.7. **El primer trabajo en reportar el fenómeno de escalamiento sináptico.**

Turrigiano, G. G. y Nelson, S. B. (2004). Homeostatic plasticity in the developing nervous system. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(2), 97-107.

Vlachos, A., Becker, D., Jedlicka, P., Winkels, R., Roeper, J. y Deller, T. (2012). Entorhinal denervation induces homeostatic synaptic scaling of excitatory postsynapses of dentate granule cells in mouse organotypic slice cultures. *PLoS One*, 7(3), e32883.

Wang, C. C., Held, R. G. y Hall, B. J. (2013). SynGAP regulates protein synthesis and homeostatic synaptic plasticity in developing cortical networks. *PloS one*, 8(12), e83941.

Wang, C. C., Held, R. G., Chang, S. C., Yang, L., Delpire, E., Ghosh, A. y Hall, B. J. (2011). A critical role for GluN2B-containing NMDA receptors in cortical development and function. *Neuron*, 72(5), 789-805.

10. ANEXO

10.1 Verificación de la actividad de drogas

Para verificar la actividad de TTX se realizó el siguiente protocolo: posteriormente a lograr la condición de célula completa, se esperó tres minutos para lograr un equilibrio entre el espacio intracelular y la solución de pipeta. Seguido a esto se evocaron corrientes macroscópicas mediante pulsos crecientes de voltaje con lo que se verificó la disminución o completa ausencia de las corrientes de acción (Fig. S1).

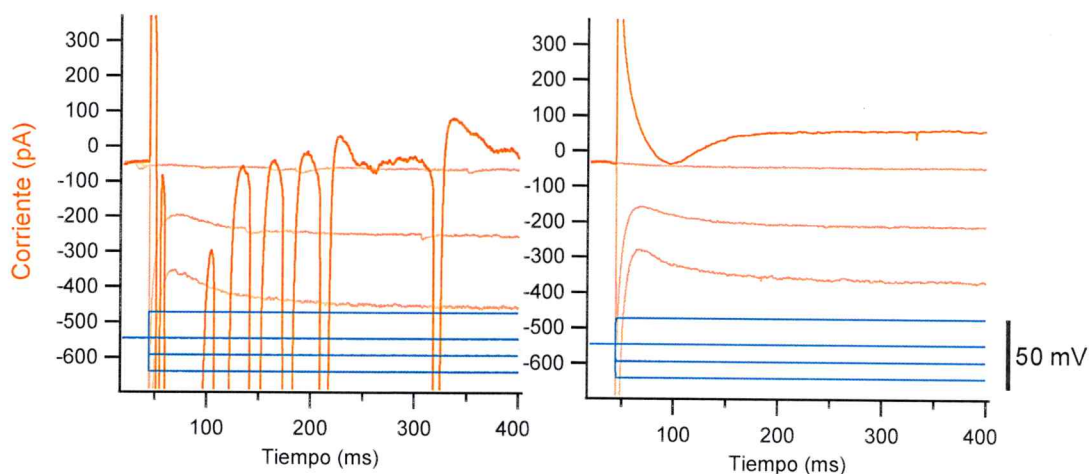


Figura S1. Corroboración del efecto de TTX. Corrientes de célula completa evocadas mediante pulsos cuadrados de voltaje (líneas azules) desde un potencial de mantención de -72 mV en condición control (izquierda) o con TTX (derecha). La adición de TTX elimina completamente la generación de corrientes de acción que en muchas ocasiones se observan a los potenciales más despolarizados por pérdida de la fijación de voltaje

Para corroborar la presencia de PTX, se midieron las mPSC a 0 mV, potencial al cual invierten las corrientes glutamatérgicas. Considerando que el potencial de inversión estimado de las corrientes GABAérgicas es de ~ -60 mV (dado por la diferencia de concentración en la solución extra e intracelular), a este potencial se espera ver sólo

eventos inhibitorios (Fig. S2). PTX bloqueó completamente la aparición de eventos en miniatura.

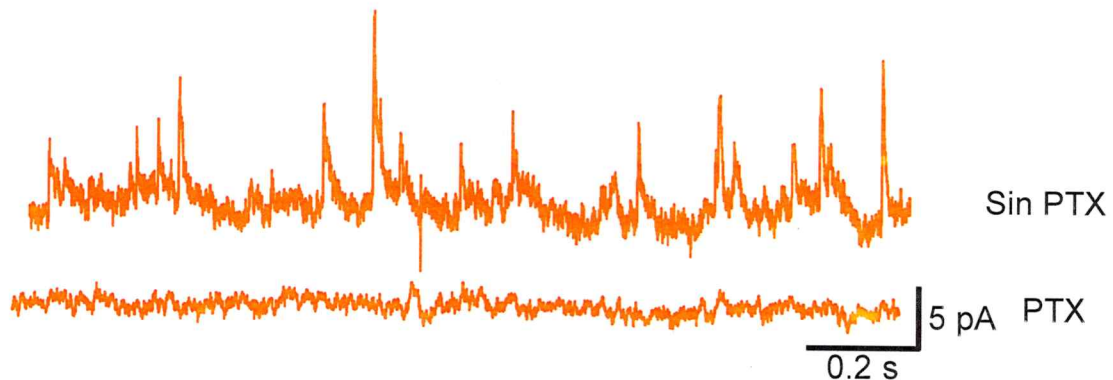


Figura S2. Corroboración del efecto de PTX. Registro de corrientes de célula completa a 0 mV (potencial de inversión de las corrientes glutamatérgicas), mostrando los eventos en miniatura en condición control (arriba) y luego de agregar PTX 100 μ M (abajo). La presencia de PTX elimina completamente la presencia de eventos.

10.2 Detección de los eventos en miniatura.

10.2.1 Suavización de los datos

Previamente a la cuantificación de eventos se realizó un suavizado binomial. El algoritmo realiza por defecto una convolución de los datos originales con coeficientes normalizados derivados del triángulo de pascal (convolución Gaussiana o transformada de Weierstrass). Se realizó un ajuste binomial con $n=25$. Este proceso no altera los parámetros estadísticos de los eventos analizados, pero mejora considerablemente la relación señal ruido (Fig. S3).

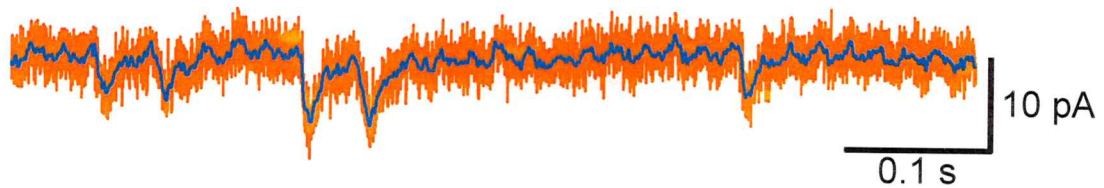


Figura S3. Datos crudos vs datos suavizados. Un ejemplo de la onda original vs la onda suavizada (rojo y azul, respectivamente).

10.2.2 Detección de eventos

Los eventos en miniatura se detectaron utilizando la colección de funciones *Neuromatic*. El algoritmo de detección es una adaptación de Kudoh y Taguchi (2002). La detección funciona mediante un algoritmo de dos etapas. En la primera etapa, la señal es analizada a fin de encontrar los posibles eventos sinápticos dado un rango de parámetros que limita los grados de libertad en la pendiente inicial y amplitud de los eventos. En la segunda etapa, cada uno de los eventos encontrados anteriormente es seleccionado de acuerdo a su constante de decaimiento. Cada una de estas etapas será descrita detalladamente a continuación.

Primera etapa del algoritmo: Sea i un índice que representa el tiempo promedio de una ventana de tiempo a investigar (línea azul, Fig. S4A) y sea $A(i)$ la amplitud en ese tiempo. Si la diferencia entre $A(i)$ y una amplitud cualquiera dentro de esa ventana temporal $A(i+w_i)$ excede un valor de umbral thr (definido empíricamente), entonces el algoritmo se detiene y selecciona esta ventana como un dominio donde ocurre un posible evento sináptico. Si los criterios no se cumplen, entonces la ventana de tiempo avanza un punto y el algoritmo se repite hasta que las condiciones se cumplan. A continuación, el algoritmo define el punto de inicio del evento estudiado. El algoritmo estudia por un método de gradiente decreciente desde el punto $A(i+w_i)$ cuál es el punto

de inicio real: Sea $J = A(i+wi)$ (el valor de i , el algoritmo construye una ventana a investigar a la izquierda de este punto (línea amarilla, Fig. S4B, las dimensiones de esta ventana se determinan empíricamente a modo de optimizar la detección del punto de inicio).; si la amplitud J cae por debajo de un umbral definido como una desviación estándar sobre la amplitud promedio de esa ventana entonces la pre-imagen de J es definida como el punto de inicio real (Fig. S4B, derecha), de lo contrario se analiza el punto $J-1$ y así hasta que el algoritmo se cumpla. En la en la parte izquierda de la figura S4B se muestra que para el punto $j-12$ el algoritmo se cumple (por lo tanto, la pre imagen de $j-12$ se define como punto de inicio). Finalmente se estima el pico del evento de una forma similar, el primer punto que caiga por sobre una desviación estándar bajo el promedio de una ventana de tiempo a la derecha del punto J es seleccionada como punto pico.

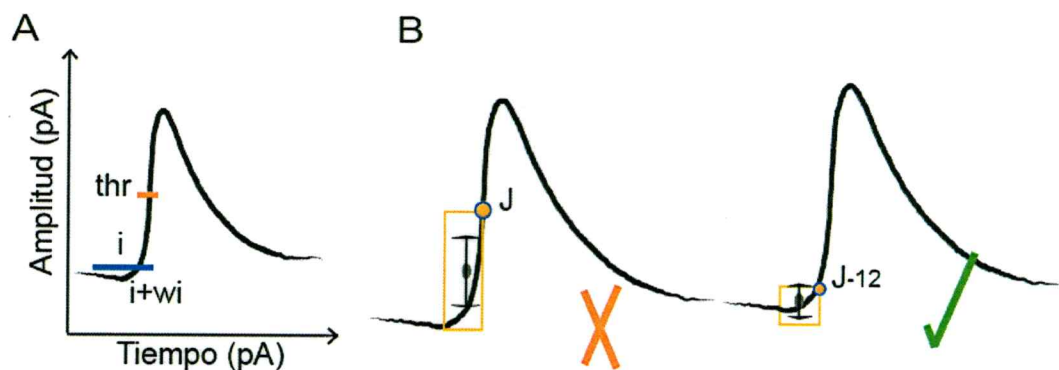


Figura S4. Ejemplo de un evento analizado. A: la línea azul es la ventana temporal cuyo tiempo promedio es i . $i+wi$ es el tiempo en el cual la diferencia de amplitudes entre $A(i+wi)$ y $A(i)$ es mayor a un umbral definido experimentalmente (thr : línea roja). B: J es una amplitud cuya pre-imagen está siendo investigada como posible punto de inicio de un evento sináptico. Esto será verdad si J cae por debajo de un umbral definido como una desviación estándar por sobre el promedio de amplitudes (barras grises) en una ventana de tiempo definida a la izquierda de J (cuadro amarillo). El panel izquierdo muestra un caso en que los criterios no se cumplen mientras que el panel derecho muestra un caso en que sí.

Parámetros utilizados en la primera etapa del algoritmo:

- Largo de la línea basal (línea azul): 5 ms
- Máxima distancia entre w_i y i : 2 ms
- Ventana de búsqueda del punto de inicio (Cuadro amarillo): 0,5 ms
- Máxima distancia entre el punto umbral y el punto de inicio: 2 ms
- Ventana de búsqueda del punto peak: 0,5 ms
- Distancia máxima entre el umbral y el peak: 14 ms
- Umbral de detección: 5pA

Segunda etapa del algoritmo: En esta etapa, los eventos encontrados anteriormente son filtrados según su constante de decaimiento, para ello se construye un histograma con la constante calculada para cada evento (Fig. S5), entonces el algoritmo descarta todos los eventos cuya constante de decaimiento sea menor a 1.1 ms (valor que se determinó empíricamente).

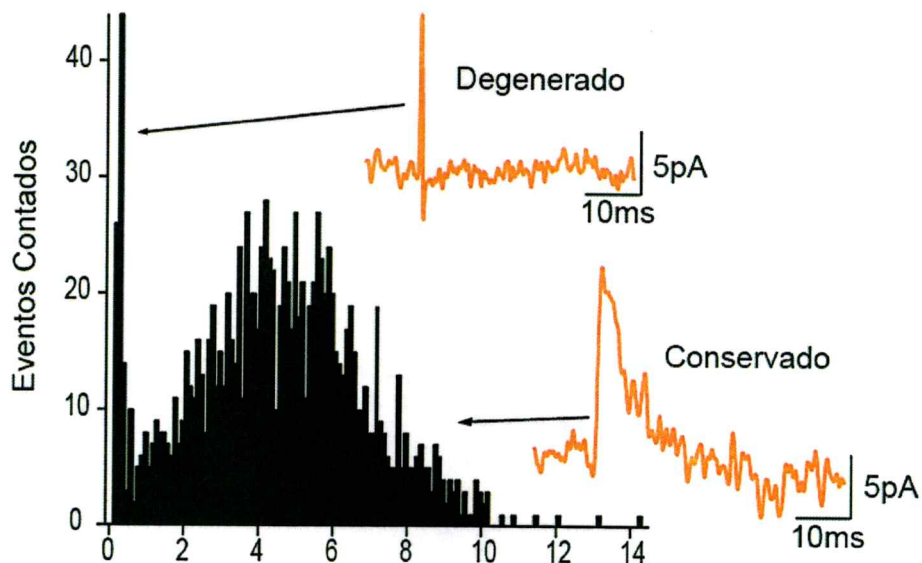


Figura S5. Histograma de constantes de decaimiento. Todos los eventos cuya constante de decaimiento esté por debajo de 1,1ms son descartados, el inserto superior muestra un ejemplo de un evento eliminado, mientras que el inferior muestra un evento conservado para el posterior análisis.



10.3 Estimación de valores críticos.

Para calcular la significancia estadística de las diferencias observadas se utilizó el test de Kolmogorov-Smirnov para dos muestras. Los valores críticos fueron estimados en base a tablas. Para los casos en que se compararon más de dos muestras (entiéndase como una muestra a la distribución de eventos en miniatura obtenida a partir de una única célula) o cuando se compararon distribuciones obtenidas por la agrupación de muestras, se utilizó valores críticos obtenidos mediante simulaciones de Montecarlo. El motivo por el cual se optó por este método y su funcionamiento se explica a continuación.

Para comparar las distribuciones de amplitudes obtenidas en distintas condiciones lo que se ha hecho anteriormente es agrupar los datos de cada célula en una única distribución (Burrone y col., 2002; Stellwagen y Malenka, 2006; Echegoyen y col., 2007; Ibata y col., 2008; Kim y col., 2012), luego ambas distribuciones son comparadas mediante el test de Kolmogorov-Smirnov para dos muestras. No obstante, esta aproximación no toma en consideración la desviación entre las distribuciones de amplitudes entre células de una misma población, lo cual sugiere que este método posee un error tipo I mayor al deseable. Para lidiar con esta problemática se propone estimar el valor de P mediante simulaciones de Montecarlo.

Las simulaciones de Montecarlo permiten resolver un problema estadístico utilizando una aproximación estocástica. Por ejemplo, supongamos que buscamos determinar cuál es la probabilidad de obtener 3 caras lanzando 5 monedas. Este problema se puede enfrentar de forma determinista si se utiliza un método teórico o matemático para determinar el valor de P (Ej. teorema del binomio), o de forma estocástica si se

tiran 5 monedas miles de veces y se determinan empíricamente el valor de P. Esta segunda aproximación es el fundamento detrás de las simulaciones de Montecarlo.

Para realizar simulaciones de Montecarlo es necesario determinar un parámetro estadísticamente relevante para caracterizar una población (Ej. Mediana, promedio, mínimo, máximo, etc). En este caso se utilizará la distancia máxima entre las curvas promedio de ambas poblaciones. Esta aproximación es congruente a los métodos estadísticos utilizados en trabajos anteriores, en los cuales se representó una población mediante la agrupación de todos los datos en un solo pool (Ej. Turrigiano y col., 1998), pues tal como se demostró en la figura 11.C la curva de probabilidad acumulada promedio es igual a la curva de probabilidad de los datos agrupados. Análogamente, la distancia máxima entre dos curvas de probabilidad posee su respaldo estadístico como parámetro relevante para comparar dos distribuciones (Massey Jr, 1951).

La ejecución del método de Montecarlo es la siguiente:

La figura S6 muestra la curva de probabilidad de amplitud acumulada para cada célula registrada. Se muestran respectivamente con color celeste y naranja las células correspondientes a la población temprana y tardía (clústeres observados). En naranja y celeste oscuro se muestra la curva de probabilidad acumulada promedio para cada población.

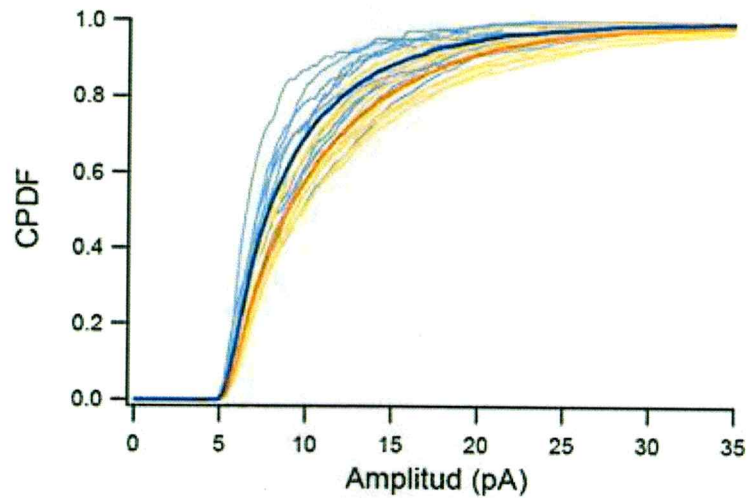


Figura S6. CPDF de cada célula, y curva promedio para la fase temprana (celeste) y tardía (naranja). En negrita se muestra la CPDF promedio correspondiente a cada fase.

La pregunta que se busca abordar es la siguiente:

¿Cuál es la probabilidad de que la diferencia máxima observada entre las curvas promedio de la figura S6 se explique por la desviación aleatoria entre las distribuciones de amplitudes de las células?

Para responder esta pregunta se partió de la hipótesis nula de que los datos a tiempos tempranos y tardíos son parte de la misma población. Para evaluar esta hipótesis en primera instancia se agruparon los datos en un conjunto común (Fig. S7).

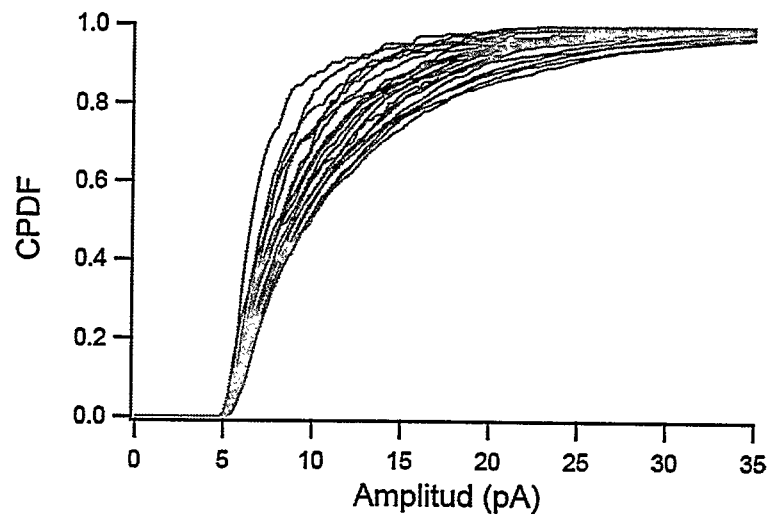


Figura S7. Agrupación de las curvas de cada célula en un pool común. CPDF de cada célula.

Luego la distribución de cada célula se asoció aleatoriamente al grupo temprano o tardío (manteniendo el mismo número de células que se tenía en los clústeres observados originalmente). La figura S8 muestra los pools obtenidos tras una permutación aleatoria de las curvas (clústeres obtenidos por permutación aleatoria). Para estos nuevos clústeres, se calculó la curva promedio y se determinó el valor de la distancia máxima entre estas.

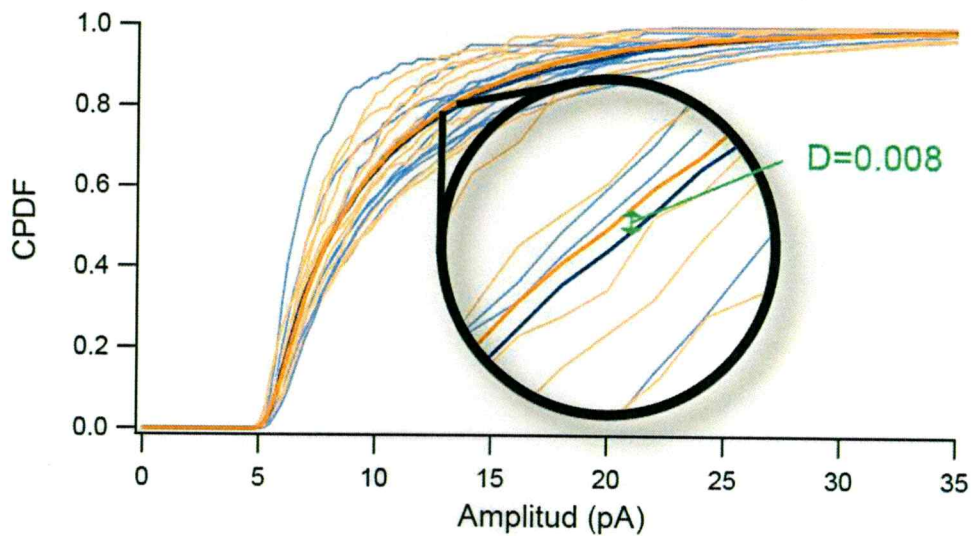


Figura S8. Distribución de los datos en clústeres aleatorios. Los datos fueron aleatoriamente agrupados en dos pools. En negrita se muestran las CPDF promedio correspondientes a cada pool. A partir de estas curvas se calculó la máxima distancia entre ellas.

Finalmente, este ejercicio se repitió 10.000 veces. Con lo cual se obtuvo una distribución de valores D (Fig. S9).

La diferencia máxima entre las curvas promedios de los clústeres observados originalmente (los distribuidos según tiempos tempranos y tardíos) es de $D = 0.118$ (Fig. S6). Buscando este valor en la curva de la figura S9 se encuentra que el valor P correspondiente a esta distancia es de 0.0148 (Es decir, la probabilidad de que esta diferencia se explique por las desviaciones aleatorias entre las distribuciones de amplitudes es de 0.0148). Considerando $p < 0.05$ como significativo, se concluye que las distribuciones dentro de los grupos temprano y tardío corresponden a poblaciones distintas. En comparación con los métodos anteriores, al estimar el valor de P agrupando los datos y utilizando el test de Kolmogorov-Smirnov para dos muestras se obtiene un valor de $P = 3.35e-06$ (Ej. Kim y col., 2012). De igual forma al considerar

como tamaño muestral el número de datos promedio en cada condición se obtiene un valor de $P= 0.0008$ (Ej. Stellwagen y Malenka, 2006). Ambos valores son considerablemente menores que el obtenido por este método (0.0148). El valor mayor de P se asocia a la desviación entre células que no fue considerada con los otros métodos, lo que sugiere que este método disminuye la probabilidad de cometer error tipo I.

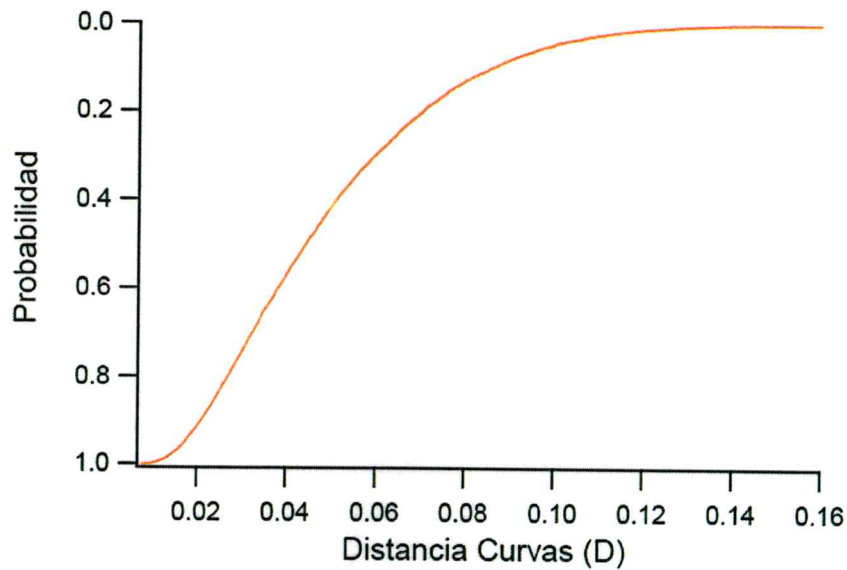


Figura S9. Curva de probabilidad vs distancia máxima. La curva indica la probabilidad de obtener una distancia mayor o igual a D .