

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
Facultad de Medicina  
Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia

PROPIEDADES DE LA COMUNICACIÓN  
BIDIRECCIONAL ENTRE ASTROCITOS Y NEURONAS

Tesis Doctoral  
Gertrudis Perea Parrilla  
Madrid, 2006

## ABREVIATURAS

ACh:	acetilcolina
AM:	acetoxi metiléster
AMPA:	ácido (RS)-2-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico
AP5:	ácido 2-amino-5-fosfonopentanoico
ATP:	adenosina 5'-trifosfato
BAPTA:	ácido 1,2-bis(2-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-tetraacético
CNQX:	6-ciano-7-nitroquinoxalin-2,3-diona
DHK:	dihidro-kainato
DMSO:	ácido dimetilsulfóxido
EPSC:	corriente excitadora postsináptica
GABA:	ácido $\gamma$ -aminobutírico
IP <sub>3</sub> :	inositol 1,4,5-trifosfato
MCPG:	(S)- $\alpha$ -metil-4-carboxifenilglicina
mAChR:	receptor metabotrópico de acetilcolina
mGluR:	receptor metabotrópico de glutamato
MLA:	citrato de metil-licaconitina
mM:	milimolar
$\mu$ M:	micromolar
M $\Omega$ :	megaohmio
mV:	milivoltio
NP-EGTA:	o-nitrofenil ácido etilenglicol-bis-(2-aminoetil)-N,N,N',N'-tetraacético
NMDA:	N-metil-D-aspartato
pA:	picoamperio
PLC:	fosfolipasa C
SN:	Sistema Nervioso
SNC:	Sistema Nervioso Central
t-PDC:	L-trans-2,4-dicarboxilato de pirrolidina
TTX:	tetrodotoxina
4-AP:	4-aminopiridina

## SUMMARY

The synaptic control of the astrocytic intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  is crucial in the reciprocal astrocyte–neuron communication. Using electrophysiological and  $\text{Ca}^{2+}$  imaging techniques in rat hippocampal slices, we investigated the astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  signal modulation induced by synaptic terminals that use glutamate and acetylcholine.  $\text{Ca}^{2+}$  elevations were evoked by glutamate released from Schaffer collaterals and by acetylcholine, but not glutamate, released by alveus stimulation, indicating that astrocytes discriminate the activity of different synapses belonging to different axon pathways. The  $\text{Ca}^{2+}$  signal was modulated bidirectionally by simultaneous activation of both pathways, being depressed at high stimulation frequencies and enhanced at low frequencies. The  $\text{Ca}^{2+}$  modulation was attributable to astrocytic intrinsic properties, occurred at discrete regions of the processes, and controlled the intracellular expansion of the  $\text{Ca}^{2+}$  signal. In turn, astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  signal elicited NMDA receptor-mediated currents in pyramidal neurons and modulated the synaptic transmission through presynaptic mechanisms. Therefore, because astrocytes discriminate and integrate synaptic information, we propose that they can be considered as cellular elements involved in the information processing by the nervous system.

# ÍNDICE

## I. INTRODUCCIÓN

1. Antecedentes históricos en el estudio de las células de glía	6
2. El ión calcio como base de la excitabilidad celular de los astrocitos	7
3. Comunicación astrocito-astrocito. Comunicación inter-astrocitaria e intra-astrocitaria	9
4. Sinapsis Tripartita	11
4.1. Comunicación neurona-astrocito. Los astrocitos responden a la actividad sináptica	12
4.2. Comunicación astrocito-neurona. Participación de los astrocitos en la fisiología neuronal	13

## II. OBJETIVOS

15

## III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Obtención y preparación de las rodajas de hipocampo de rata	19
2. Identificación de astrocitos	19
3. Registro electrofisiológico de astrocitos de CA1	20
4. Registros electrofisiológicos de pares de células (neurona-astrocito)	21
5. Estimulación eléctrica de vías axónicas	22
5.1. Estimulación eléctrica convencional	22
5.2. Estimulación eléctrica mínima	22
6. Fotometría del $\text{Ca}^{2+}$ intracelular en astrocitos	23
7. Análisis de la señal de $\text{Ca}^{2+}$ astrocitaria mediante imagen de fluorescencia	24
8. Foto-estimulación de astrocitos	26
9. Ionoforesis	26
10. Agentes Farmacológicos	27
11. Análisis de datos	27

## IV. RESULTADOS

1. Comunicación neurona-astrocito. Respuesta de los astrocitos a la actividad sináptica colinérgica	29
1.1. Caracterización de las respuestas astrocitarias a la estimulación del alveus	30
1.2. Las corrientes de entrada están mediadas por la activación de transportadores electrogénicos de glutamato	31
1.3. Los aumentos de $\text{Ca}^{2+}$ son debidos a la activación de receptores metabotrópicos de acetilcolina	33
2. Comunicación neurona-astrocito. Respuesta de los astrocitos a la actividad sináptica glutamatérgica	35
2.1. Caracterización de las respuestas astrocitarias	

a la estimulación de las colaterales de Schaffer	36
2.2. Las corrientes de entrada están mediadas por la activación de transportadores electrogénicos de glutamato	36
2.3. Los aumentos de $\text{Ca}^{2+}$ son debidos a la activación de receptores metabotrópicos de glutamato	37
3. Los astrocitos discriminan la actividad de diferentes terminales sinápticas procedentes de distintas vías axónicas	38
4. Integración de la información sináptica por astrocitos. Los astrocitos modulan su señal de $\text{Ca}^{2+}$ en respuesta a la actividad simultánea de distintas sinapsis	39
4.1. Los astrocitos presentan propiedades intrínsecas responsables de la modulación de la señal de $\text{Ca}^{2+}$	41
4.2. La modulación de la señal de $\text{Ca}^{2+}$ es regulada por el grado de actividad sináptica	43
4.3. La modulación de la señal de $\text{Ca}^{2+}$ está presente en regiones subcelulares de los procesos astrocitarios	44
5. Comunicación astrocito-neurona. Consecuencias fisiológicas de la señal de $\text{Ca}^{2+}$ astrocitaria	46
5.1. Modulación de la excitabilidad eléctrica en neuronas piramidales de CA1	46
5.2. Modulación de la transmisión sináptica evocada	50
<b>V. DISCUSIÓN</b>	53
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	60
<b>VII. REFERENCIAS</b>	62
<b>VIII. SEPARATAS</b>	71

## **I. INTRODUCCIÓN**

## **1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS EN EL ESTUDIO DE LAS CÉLULAS DE GLÍA**

El Sistema Nervioso (SN) es un conjunto organizado de células que se comporta como un procesador de la información que recibe del medio ambiente y de su propia actividad y con la que elabora diferentes respuestas biológicas. Las neuronas son reconocidas como los elementos celulares responsables del procesamiento de información del SN, gracias a una de sus propiedades fundamentales, la excitabilidad eléctrica, que constituye el sustrato biofísico de la codificación de información neuronal. Las neuronas transfieren la información entre ellas a través de estructuras especializadas en su membrana celular, las sinapsis, principalmente mediante la liberación de neurotransmisores químicos desde la terminal presináptica que provocan la activación de receptores específicos en la membrana postsináptica, lo cual representa la principal forma de comunicación en el SN.

Otros tipos celulares fundamentales del SN son las células de glía. Este tipo celular fue descrito originalmente por Virchow en 1846, quien propuso el término de glía para referirse a estas células no neuronales y a la función que desempeñaban en el SN, esto es, ser el aglutinante (el significado en griego de glía) del SN. Posteriores estudios permitieron conocer y clasificar los distintos tipos de células gliales en el SN en dos grandes grupos: macroglía y microglía. Las células de la microglía son macrófagos con funciones fagocíticas implicadas en procesos inflamatorios en el SN. Por su parte, astrogλία, oligodendrogλία y células epéndimogliales en el SN central y células de Schwann en el SN periférico, constituyen el grupo de células de macroglía. Los oligodendrocitos y las células de Schwann son los responsables de la formación de la vaina de mielina que envuelve los axones neuronales en el SN central y periférico, respectivamente. Las células epéndimogliales son un tipo especializado de glía que revisten los ventrículos y el canal ependimario en contacto con el líquido cefalorraquídeo. La astrogλία forma un grupo heterogéneo de células que presentan diferentes morfologías y fenotipos en distintas regiones del SN: células de Müller en la retina, células de la glía de Bergmann en el cerebelo, astrocitos protoplásmicos localizados en la sustancia gris, astrocitos fibrosos presentes en los tractos nerviosos de la sustancia blanca y astrocitos perivasculares en contacto con los vasos sanguíneos (véase Kettenmann y Ransom, 2005).

La función de relleno de la glía, defendida por Weigert, así como su papel de soporte trófico para las neuronas, postulado por Golgi, fueron ya entonces duramente cuestionadas por Cajal (1899), para el que las células de glía debían tener funciones más complejas que las propuestas por los sabios de la época. Así, Cajal, en base a sus observaciones, rebatía la simplicidad de estas hipótesis: “*si, a ejemplo de Golgi, asignamos a la neuroglía un papel nutritivo, nos veríamos obligados a defender que la inmensa mayoría de las pirámides cerebrales están mal nutridas, por carecer de forros neuróglícos.*” Y “*...existe una ley, **La ley de economía de espacio**, merced á la cual las células se disponen de tal suerte, que, sin menoscabo de la extensión de las superficies de conexión intercelular, son evitados los vacíos, y aquéllas ocupan siempre el menor espacio posible.*” (Ramón y Cajal, 1899).

La falta de herramientas y técnicas que permitieran aportar datos sobre la auténtica función de las células de glía mantuvo, a pesar del rechazo de Cajal, la teoría del relleno y del soporte trófico en vigor durante casi un siglo.

Durante este tiempo el estudio de las células de glía estuvo en un relativo segundo plano, sin embargo, es en la década de 1980 cuando se retoma con mayor interés el estudio de las células de la astrogλία, probablemente debido al íntimo contacto que mantienen con neuronas y sinapsis, desarrollándose numerosos estudios que pusieron de manifiesto las diferentes funciones que desempeñan estas células en el SN. La astrogλία participa de forma relevante en numerosos aspectos del desarrollo, el metabolismo y la patología del SN, siendo decisivos en el soporte estructural y metabólico neuronal, la supervivencia, diferenciación y guía neuronal, el crecimiento neurítico, la sinaptogénesis, y la homeostasis cerebral regulando la concentración local de iones y sustancias neuroactivas (revisado por Kettenmann y Ransom, 2005).

## **2. EL ION CALCIO COMO BASE DE LA EXCITABILIDAD CELULAR DE LOS ASTROCITOS**

La idea clásica que excluía a las células de glía de una participación activa en la fisiología del SN se basaba en el hecho de que éstas carecen de la propiedad fundamental que poseen las neuronas, a saber, la excitabilidad eléctrica. Las neuronas presentan en su membrana una amplia batería de canales de membrana activados por voltaje o ligando cuya activación producen flujos de corriente a través de la membrana y, por tanto, cambios en el potencial de membrana. Estos cambios de potencial de la



membrana celular constituyen el sustrato biofísico que subyace a los procesos de transferencia e integración de la información a nivel celular en las neuronas.

Las células gliales son células no excitables eléctricamente. Aunque estas células presentan en su membrana la mayoría de los canales expresados por las neuronas (Sontheimer, 1994), el nivel de expresión de algunos canales voltaje-dependientes, cruciales para la generación de respuestas activas, es relativamente bajo, lo que dificulta que las células gliales sufran cambios significativos en su potencial de membrana en respuesta a diferentes estímulos y, aunque pueden mostrar pequeñas variaciones en su potencial de membrana, éstas sólo representan respuestas pasivas principalmente debidas a las variaciones de la concentración extracelular de potasio generadas por la actividad neuronal (Orkand et al., 1966).

Aunque carecen de excitabilidad eléctrica, las células gliales y en particular los astrocitos sí son células excitables y su excitabilidad se basa en variaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Cornell-Bell et al., 1990; Charles et al., 1991). El desarrollo de nuevas técnicas de imagen y marcadores fluorescentes sensibles a iones, que conseguían monitorizar el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en células vivas, permitió demostrar que los astrocitos muestran una excitabilidad basada en variaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Este hallazgo supuso un cambio substancial en la visión de los astrocitos y sus funciones en el SN.

Las células eléctricamente excitables transforman su señal eléctrica en señales de  $\text{Ca}^{2+}$ , que son las responsables de desencadenar respuestas fisiológicas (secreción, movimiento, regulación de la expresión génica). Es decir, el  $\text{Ca}^{2+}$  es el encargado de transformar señales eléctricas en respuestas complejas intracelulares. En el SN el  $\text{Ca}^{2+}$  está implicado en distintos procesos fisiológicos neuronales, e.g., controlando la excitabilidad celular, la liberación de neurotransmisor o la plasticidad sináptica (véase Nicholls et al., 2001).

Los astrocitos muestran variaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular que puede presentarse de forma espontánea o en respuesta a diferentes estímulos. Esta señal de  $\text{Ca}^{2+}$  puede actuar como un mensajero intracelular o intercelular con importantes consecuencias funcionales. Esta excitabilidad celular en astrocitos se manifiesta como aumentos de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico y se basa en la existencia de bajas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  libre en el citoplasma celular. Mientras que las neuronas pueden utilizar el gradiente electroquímico del  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana celular para aumentar la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, gracias a la activación de canales específicos activados por voltaje o ligando en su membrana, los astrocitos utilizan el  $\text{Ca}^{2+}$

almacenado en el retículo endoplásmico, como principal fuente para aumentar el  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático. La movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  desde los reservorios intracelulares depende fundamentalmente de la activación de dos tipos de receptores: receptores de rianodina, sensibles a rianodina y cafeína; y receptores de inositol 1,4,5-trifosfato ( $\text{IP}_3$ ), sensibles a  $\text{IP}_3$  producido por la activación de fosfolipasa C (PLC).

Una de las características de la excitabilidad por  $\text{Ca}^{2+}$  es que puede presentarse en ausencia de actividad neuronal (Parri et al., 2001; Aguado et al., 2002; Nett et al., 2002). Esta señalización endógena se manifiesta en forma de oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  y se ha registrado en diferentes áreas cerebrales (neocorteza, cerebelo, hipocampo y tálamo ventrobasal) (Grosche et al., 1999; Parri et al., 2001; Aguado et al., 2002; Nett et al., 2002; Peters et al., 2003). La presencia de estas oscilaciones es dependiente de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de reservorios sensibles a  $\text{IP}_3$ . El significado funcional de las oscilaciones espontáneas de  $\text{Ca}^{2+}$  no ha sido demostrado, sin embargo, algunos autores proponen que estas oscilaciones podrían contribuir al desarrollo y maduración de los circuitos neuronales en etapas tempranas (Parri et al., 2001; Aguado et al., 2002).

La señal de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitaria puede presentarse con diferentes patrones temporales. En algunos casos, los astrocitos muestran aumentos rápidos y transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$ , denominados “espigas de  $\text{Ca}^{2+}$ ”, que eventualmente pueden estar seguidas de respuestas sostenidas en el tiempo. En otros, los astrocitos presentan espigas de  $\text{Ca}^{2+}$  con una frecuencia relativamente alta, denominadas “oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$ ”, que pueden ser moduladas en amplitud, duración y frecuencia por diferentes estímulos, incluyendo la actividad sináptica (Charles et al., 1991; Pasti et al., 1997; Deitmer et al., 1998; Araque et al., 2002; Perea y Araque, 2005a). Una característica importante de esta señalización por  $\text{Ca}^{2+}$  es que el  $\text{Ca}^{2+}$  puede propagarse dentro de una célula y actuar como una señal intracelular y, también puede propagarse a diferentes astrocitos actuando entonces como una señal intercelular.

### **3. COMUNICACIÓN ASTROCITO-ASTROCITO. COMUNICACIÓN INTER-ASTROCITARIA E INTRA-ASTROCITARIA.**

La existencia de comunicación astrocito-astrocito fue originalmente descrita en preparaciones de astrocitos en cultivo, donde se demostró que los aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  originados en un astrocito podían propagarse sin decremento a los astrocitos vecinos formando lo que se denomina una “onda de  $\text{Ca}^{2+}$ ”, que lograba alcanzar cientos de

micrómetros con una velocidad de propagación de  $\sim 20 \mu\text{m/s}$  (Cornell-Bell et al., 1990; Charles et al., 1991; Newman y Zahs, 1997; Innocenti et al., 2000). Por lo tanto, las ondas de  $\text{Ca}^{2+}$  podrían actuar como una forma de comunicación entre astrocitos a larga distancia. Los mecanismos que subyacen a esta comunicación intercelular han sido ampliamente investigados y discutidos, y actualmente existen tres modelos que intentan explicar la propagación de las ondas de  $\text{Ca}^{2+}$  (véase Cotrina y Nedergaard, 2005). Estos modelos no son excluyentes entre sí, es más, podrían coexistir en diferentes áreas cerebrales o bajo determinadas condiciones.

Brevemente, estos mecanismos propuestos son:

1) Difusión de  $\text{IP}_3$  a través de las uniones gap entre astrocitos. Este modelo propone que el  $\text{IP}_3$  formado en la célula estimulada podría difundir pasivamente a través de las uniones gap a los astrocitos con los que estuviese interconectado.

2) Comunicación regenerativa por ATP. El ATP liberado por la célula excitada, ya sea por conexinas (hemicanales de membrana) o por exocitosis vesicular, actuaría como mensajero extracelular activando receptores purinérgicos en las células vecinas e iniciando el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  en estas células, lo cual produciría la liberación de ATP que activamente propagaría la onda de  $\text{Ca}^{2+}$ .

3) Liberación focal de ATP. En este caso la estimulación de una célula daría lugar a la liberación de ATP que activaría los receptores purinérgicos de las células adyacentes e incrementaría su  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular.

Mientras la existencia de ondas de  $\text{Ca}^{2+}$  ha sido claramente demostrada en preparaciones en cultivo (Cornell-Bell, et al., 1990; Charles et al., 1991; Newman y Zahs, 1997, Araque et al., 1998a,b; Harris-White et al., 1998), la presencia de esta comunicación a larga distancia en preparaciones más intactas, como rodajas de cerebro o *in vivo* está discutida (véase Perea y Araque, 2005b). Algunos estudios muestran la presencia de estas ondas en rodajas de cerebro, pero restringidas en el número de células involucradas (Schipke et al., 2002; Sul et al., 2004), sugiriendo la posible existencia de circuitos gliales en la propagación de estas ondas.

Así pues, los astrocitos son capaces de comunicarse entre sí, transfiriendo la señal intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , lo cual representa una nueva forma de comunicación intercelular en el Sistema Nervioso Central (SNC).

Los aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  pueden iniciarse en regiones concretas de la célula, que consiguen quedar restringidos en estas regiones o eventualmente propagarse al resto de

la célula, generándose así una onda intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  (Pasti et al., 1997; Grosche et al., 1999; Perea y Araque, 2005a). La regionalización de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  se presenta tanto en los aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  espontáneos (Parri et al., 2001; Nett et al., 2002; Fiacco y McCarthy, 2004), como en las respuestas generadas por la actividad neuronal (Pasti et al., 1997; Grosche et al., 1999; Perea y Araque, 2005a). Por tanto, la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  puede estar espacialmente localizada en regiones subcelulares concretas de la célula, denominadas “microdominios”, que constituyen la unidad elemental de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$ . Los microdominios fueron descritos inicialmente en la glía de Bergmann en el cerebelo (Grosche et al., 1999), cuyos procesos celulares se organizan en finas láminas que envuelven las sinapsis entre las terminales axónicas de las fibras paralelas y las espinas de las neuronas de Purkinje. Estos microdominios son capaces de responder independientemente a la actividad sináptica con variaciones de  $\text{Ca}^{2+}$ , que eventualmente pueden propagarse a través de los procesos del astrocito a distintas regiones de la célula. Por tanto, los procesos de la glía de Bergmann, así como los procesos astrocitarios, podrían estar formados por cientos de compartimentos subcelulares independientes, con capacidad para interactuar autónomamente con los grupos particulares de sinapsis a las que envuelven.

La propagación de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  desde los microdominios donde se genera depende de la actividad sináptica. De hecho, aumentando el grado de estimulación se consigue que la señal de  $\text{Ca}^{2+}$ , restringida a unos determinados microdominios subcelulares generada por la estimulación a bajas frecuencias, se propague al resto de la célula (Pasti et al., 1997; Perea y Araque, 2005a).

#### **4. LA SINAPSIS TRIPARTITA**

En muchas regiones del SNC existe una íntima asociación entre los procesos astrocitarios y los elementos neuronales, ya sea con los cuerpos neuronales, dendritas o sinapsis (Ramón y Cajal, 1899; Ventura y Harris, 1999), lo cual supone una adecuada disposición física para la posible existencia de comunicación entre ellos. Resultados obtenidos en la última década, que describiremos en los siguientes apartados, han demostrado que los astrocitos pueden responder a la actividad neuronal con aumentos de su  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, existiendo así una comunicación entre neuronas y astrocitos, más allá de la simple recaptura de neurotransmisores liberados a la hendidura sináptica. Además, el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en los astrocitos puede provocar la liberación

de gliotransmisores, que pueden modular la excitabilidad neuronal y la transmisión sináptica, originándose una comunicación entre astrocitos y neuronas.

Por tanto, dada la asociación física y la comunicación bidireccional entre astrocitos y neuronas, se ha propuesto un nuevo concepto en la fisiología sináptica: La Sinapsis Tripartita, en la que la sinapsis está funcionalmente constituida por tres elementos (i.e., los elementos pre y postsinápticos neuronales y los astrocitos adyacentes), y donde los astrocitos desarrollan funciones activas como elementos reguladores en la transferencia de información en el SN (Araque et al., 1999).

#### **4.1. COMUNICACIÓN NEURONA-ASTROCITO. LOS ASTROCITOS RESPONDEN A LA ACTIVIDAD SINÁPTICA**

Los astrocitos expresan en su membrana una gran variedad de receptores de distintos neurotransmisores, tanto de tipo ionotrópico, que permiten un flujo selectivo de iones a través de la membrana celular, como metabotrópico, acoplados a distintas rutas de segundos mensajeros intracelulares. La aplicación exógena de diferentes neurotransmisores (glutamato, adenosina, norepinefrina, GABA, ATP, histamina o acetilcolina), resulta efectiva en aumentar la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular tanto *in vitro* como *in situ* (véase Porter y McCarthy, 1997; Perea y Araque 2002; Kettenmann y Ransom, 2005). Muchos de estos neurotransmisores actúan a través de activación de proteínas G, que por la acción de segundos mensajeros (PLC e  $IP_3$ ) producen la liberación de  $Ca^{2+}$  de los reservorios intracelulares y el consiguiente aumento de la concentración de  $Ca^{2+}$  en el citosol (Pasti et al., 1997; Porter y McCarthy, 1997; Bezzi et al., 1998; Kang et al., 1998; Kulik et al., 1999; Araque et al., 2002). Por tanto, la excitabilidad celular mostrada por los astrocitos puede ser desencadenada por activación de receptores de neurotransmisores.

Sin embargo, aunque existe respuesta astrocitaria a la aplicación exógena de agonistas, es la activación de estos receptores por neurotransmisores liberados por las terminales sinápticas lo que implica la existencia de una verdadera comunicación entre neuronas y astrocitos, lo cual representa una nueva forma de señalización intercelular en el SNC.

El control sináptico de la señal de  $Ca^{2+}$  astrocitario ha sido demostrado en determinadas regiones del SNC, como la retina (Newman, 2003), cerebelo (Grosche et al., 1999; Kulik et al., 1999), hipocampo (Porter y McCarthy, 1996; Pasti et al., 1997;

Bezzi et al., 1998; Araque et al., 2002; Perea y Araque, 2005a) y corteza cerebral (Peters et al., 2003; Wang et al., 2006). Asimismo, la respuesta de los astrocitos a determinados neurotransmisores liberados sinápticamente, como glutamato, GABA, ACh, noradrenalina y óxido nítrico, está bien documentada (véase Kettenmann y Ransom, 2005), pero se desconoce el posible control que otros sistemas de neurotransmisores puedan ejercer sobre la excitabilidad de los astrocitos.

#### **4.2. COMUNICACIÓN ASTROCITO-NEURONA. PARTICIPACIÓN DE LOS ASTROCITOS EN LA FISIOLÓGÍA NEURONAL**

Además de la comunicación entre neuronas y astrocitos, en la que los astrocitos escuchan lo que dicen las sinapsis, los astrocitos pueden a su vez devolver el mensaje a las sinapsis, estableciéndose así una comunicación entre astrocitos y neuronas.

Así como la comunicación neurona-astrocito está basada en el control sináptico de la señal de  $Ca^{2+}$  astrocitaria, esta señal de  $Ca^{2+}$  resulta clave en los procesos de comunicación astrocito-neurona, participando a través de la liberación de gliotransmisores en la modulación de la excitabilidad neuronal y la transmisión sináptica.

Los astrocitos, ya sea en preparaciones en cultivo o *in situ*, pueden liberar distintos gliotransmisores, como glutamato, ATP, D-Serina o  $TNF\alpha$ . La mayoría de estos gliotransmisores son liberados por mecanismos  $Ca^{2+}$ -dependientes (véase Perea y Araque, 2005b), aunque en condiciones patológicas existen otros mecanismos alternativos (véase Volterra y Bezzi, 2002), los cuales constituyen las señales de comunicación entre astrocitos y neuronas.

Se ha descrito la participación de los astrocitos en la modulación de la excitabilidad neuronal. En preparaciones de células en cultivo así como en rodajas de cerebro, el aumento de  $Ca^{2+}$  en los astrocitos estimula la liberación de glutamato que activa receptores de tipo NMDA en la neurona postsináptica, aumentando así la excitabilidad neuronal (Araque et al., 1998a,b; Parri et al., 2001; Fellin et al., 2004; Perea y Araque 2005a).

Asimismo, los astrocitos pueden estar involucrados en la modulación de la transmisión sináptica. En preparaciones de células en cultivo se ha descrito el papel modulador de los astrocitos en la transmisión sináptica, donde el aumento de  $Ca^{2+}$  astrocitario estimula la liberación de glutamato, el cual reduce transitoriamente la

transmisión sináptica excitadora e inhibitoria evocada por potenciales de acción. Esta modulación es debida a la activación de receptores metabotrópicos de glutamato en la terminal presináptica que reduce la liberación de neurotransmisor (Araque et al., 1998a).

Los astrocitos pueden intervenir en fenómenos de plasticidad heterosináptica. En rodajas de cerebro, se ha descrito su participación en la depresión heterosináptica dependiente de actividad (Zhang et al., 2003; Pascual et al., 2005). En este caso los astrocitos mediante la liberación de ATP, que se degrada en el medio extracelular a adenosina, provocan la reducción de la liberación de neurotransmisor a través de la activación de receptores purinérgicos A1 en las terminales presinápticas. Esta modulación existe no sólo en presencia de una intensa actividad sináptica, si no que se expresa basalmente, indicando que los astrocitos regulan el tono de la actividad sináptica excitadora (Pascual et al., 2005).

La transmisión sináptica espontánea también puede ser modulada por la actividad de los astrocitos. En células en cultivo, el aumento de  $Ca^{2+}$  astrocitario provoca la liberación de glutamato y el aumento de la frecuencia de corrientes sinápticas miniaturas, dependiente de la activación de receptores NMDA en las terminales presinápticas (Araque et al., 1998b). En preparaciones más intactas, se ha demostrado que los astrocitos, a través de la liberación  $Ca^{2+}$ -dependiente de glutamato, pueden incrementar la frecuencia de corrientes sinápticas inhibitorias miniaturas (Kang et al., 1998), y aumentar la frecuencia de corrientes sinápticas excitadoras espontáneas en las neuronas de CA1 de hipocampo (Fiacco y McCarthy, 2004), activando receptores metabotrópicos de glutamato de tipo I en las terminales inhibitorias y excitatorias, respectivamente.

La modulación de la transmisión sináptica ha sido demostrada también para las células de Müller en la retina (Newman, 2003), la glía de Bergmann (Brockhaus y Deitmer, 2002) y las células perisinápticas de Schwann en el SN Periférico (Robiati, 1998).

Por tanto, la capacidad de los astrocitos de responder a la actividad sináptica y de modular en distinto grado la actividad sináptica y la excitabilidad neuronal sugieren que estas células pueden ser elementos activos capaces de intervenir en los procesos de comunicación e integración del SN.

## **II. OBJETIVOS**



La estrecha relación física entre los astrocitos y las sinapsis a las que envuelven hace posible que pueda existir comunicación entre ellos. El estudio de la comunicación entre neuronas y astrocitos ha demostrado la existencia de diálogo entre las terminales de las colaterales de Schaffer (CS) y los astrocitos localizados en *stratum radiatum* de CA1 de hipocampo. Los astrocitos de esta región responden con aumentos de  $Ca^{2+}$  al glutamato liberado por las CS (Porter y McCarthy, 1996). Asimismo, se ha demostrado la comunicación entre interneuronas y astrocitos en esta misma región, mostrando que los astrocitos responden a la actividad de las interneuronas con aumentos de  $Ca^{2+}$  mediados por GABA (Kang et al., 1998).

Sin embargo, se desconocía si los astrocitos de hipocampo podían responder a otros neurotransmisores liberados sinápticamente y si los astrocitos eran capaces de responder también a la actividad de otras vías nerviosas extrínsecas al circuito local donde están inmersos. Es decir, ¿en la comunicación neurona-astrocito pueden intervenir otros neurotransmisores?, y ¿los astrocitos pueden ser dianas celulares de vías aferentes que provengan de otras regiones cerebrales?

El hipocampo recibe aferencias de distintas áreas encefálicas, en particular, proyecciones colinérgicas procedentes de los núcleos de los ganglios basales, septum medial y banda diagonal de Broca (Amaral y Witter, 1955; Lewis y Shute, 1967), que proyectan a la región *stratum oriens* de CA1. Considerando la naturaleza colinérgica de estas proyecciones y que provienen de otras áreas cerebrales, nos propusimos estudiar la posible participación de ACh en los procesos de comunicación neurona-astrocito.

Por tanto, planteamos como Primer Objetivo de estudio la **CARACTERIZACIÓN DE LAS RESPUESTAS ASTROCITARIAS A LA ACTIVIDAD SINÁPTICA COLINÉRGICA.**

Además, considerando que el glutamato es el principal neurotransmisor excitador en el hipocampo y que los astrocitos de la región *stratum oriens* de CA1 expresan receptores de glutamato, nos preguntamos si estos astrocitos podrían también responder al glutamato liberado por las CS, que proyectan al *stratum radiatum* y *stratum oriens* de la región CA1 (Li et al., 1994). La respuesta de los astrocitos de *stratum oriens* a la estimulación de las CS indicaría que en esta región existen astrocitos capaces de responder a la actividad sináptica de fibras colinérgicas y glutamatérgicas y/o que existen subpoblaciones de astrocitos que detectan la actividad de cada una de estas vías.

Por tanto, planteamos como Segundo Objetivo de estudio la **CARACTERIZACIÓN DE LAS RESPUESTAS ASTROCITARIAS A LA ACTIVIDAD SINÁPTICA GLUTAMATÉRGICA.**

En la comunicación recíproca neurona-astrocito, el control sináptico de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitaria resulta un elemento fundamental, ya que determina las posibles consecuencias funcionales de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitaria sobre la fisiología neuronal. Sin embargo, las propiedades y la regulación de esta respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  por la actividad sináptica son escasamente conocidas. Si los astrocitos pueden responder a la actividad simultánea de dos sinapsis y si esta actividad simultánea puede provocar cambios en su excitabilidad celular es una cuestión aún por resolver. Considerando que disponemos de un sistema en el que los astrocitos pueden recibir información de sinapsis colinérgicas y glutamatérgicas, nos planteamos el estudio de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  en respuesta a la activación de estas sinapsis.

Por tanto, planteamos como Tercer Objetivo el estudio de la **MODULACIÓN DE LA SEÑAL DE CALCIO INTRACELULAR POR LA ACTIVIDAD SIMULTÁNEA DE DISTINTAS SINAPSIS.**

Por último, la comunicación entre neuronas y astrocitos es una comunicación bidireccional, en la que los astrocitos, además de responder a la actividad sináptica con aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, pueden comunicarse con las neuronas, y en particular con las sinapsis, gracias principalmente a la liberación  $\text{Ca}^{2+}$ -dependiente de gliotransmisores. Estos gliotransmisores provocan cambios en la excitabilidad neuronal y pueden intervenir en procesos de plasticidad sináptica. Dada la importancia de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitaria en estos procesos nos planteamos el estudio de las posibles consecuencias funcionales del aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  en los astrocitos sobre la fisiología de las neuronas piramidales de CA1.

Por tanto, planteamos como Cuarto Objetivo de estudio las **CONSECUENCIAS DE LA SEÑAL DE CALCIO ASTROCITARIO EN LA FISIOLOGÍA NEURONAL.**

Este objetivo general se concreta en los siguientes objetivos específicos:

- 1) Estudio de la modulación de la excitabilidad celular en neuronas piramidales de CA1.
- 2) Estudio de la modulación de la transmisión sináptica evocada en neuronas piramidales de CA1.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

## **1. OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS RODAJAS DE HIPOCAMPO**

Las rodajas de hipocampo fueron obtenidas de ratas Wistar de 12-17 días de edad. Los animales fueron decapitados y sus hemisferios expuestos por craneotomía. El encéfalo fue rápidamente extraído y bañado con líquido cefalorraquídeo artificial (LCA) a 4 °C. Una vez situado el encéfalo en la cámara de corte, se separaron los dos hemisferios y se realizaron cortes transversales (300-400 µm de espesor) con un vibrátomo (Pelco 101, Series 1000, St. Louis, MO, USA). Las rodajas así obtenidas, se incubaron durante 30-60 minutos en LCA, burbujeadas permanentemente con carbógeno (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>), a temperatura ambiente (21-24 °C). El LCA contenía (en mM): NaCl 124, KCl 2.69, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.25, MgSO<sub>4</sub> 2, NaHCO<sub>3</sub> 26, CaCl<sub>2</sub> 2 y glucosa 10 (pH = 7.3). Posteriormente, las preparaciones fueron transferidas a la cámara de registro (para rodajas sumergidas, con un volumen de 2 ml), donde se mantuvo una perfusión continua (2 ml/ min) con LCA burbujeadado con carbógeno. Las células fueron visualizadas con un microscopio Olympus BX50WI (Olympus Optical, Tokyo, Japan), equipado con contraste de interferencia diferencial, un objetivo de 40x de inmersión en agua y una cámara CCD sensible a la luz infrarroja.

## **2. IDENTIFICACIÓN DE ASTROCITOS**

Los astrocitos fueron identificados de acuerdo a sus propiedades morfológicas y electrofisiológicas (Pasti et al., 1997; Bergles y Jahr, 1997; Bezzi et al., 1998; Bergles et al., 2000; Araque et al., 2002): soma pequeño y redondeado (< 15 µm), con numerosos procesos delgados y ramificados (detectados tras el llenado de la célula con Fluo-3, marcador fluorescente sensible al ion calcio), potencial de reposo hiperpolarizado ( $V_r = -73 \pm 1$  mV; n = 144), elevada conductancia de membrana ( $22 \pm 2$  nS; n = 144) y ausencia de potenciales de acción en respuesta a estímulos despolarizantes (Figuras 1C, D). En algunos casos, las células registradas fueron analizadas con técnicas inmunohistoquímicas y examinadas después con un microscopio confocal. El doble marcaje con la sonda fluorescente Fluo-3 y el anticuerpo contra la proteína gliofibrilar ácida (GFAP) de las células registradas confirmó su identificación como astrocitos (Araque et al., 2002).

### 3. REGISTRO ELECTROFISIOLÓGICO DE ASTROCITOS DE CA1

Los registros electrofisiológicos de los astrocitos de *stratum radiatum* y *stratum oriens* de la región CA1 de hipocampo se realizaron usando la técnica de “patch-clamp” en la configuración de célula entera. Los electrodos de registro consistían en un alambre de plata clorurado (Ag/AgCl) incluido en capilares de borosilicato con capilar interno (OD-ID: 1.5-0.86 mm; Sutter Instrument Co., Novato, CA, USA), que fueron estirados con un estirador de pipetas (Model P-80, Sutter Instrument Co.). Las micropipetas tuvieron una resistencia de 6-10 M $\Omega$  y un comportamiento óhmico. Como electrodo de referencia se utilizó un electrodo relleno de KCl 3 M y con una resistencia de 2.7 K $\Omega$  (World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL, USA). Las micropipetas destinadas al registro de corrientes en astrocitos fueron rellenas con la solución intracelular que contenía (en mM): KMeSO<sub>4</sub> 100, KCl 50, HEPES 10, ATP-Na<sub>2</sub> 4 (pH = 7.3). Los registros de las corrientes iónicas de membrana fueron obtenidos con un amplificador Axoclamp-2A (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) en la modalidad de fijación de voltaje (“voltage-clamp”) continua con un solo electrodo de registro (“continuous single electrode voltage-clamp”) o un amplificador PC-ONE Patch Clamp (DAGAN Corporation, Minneapolis, MN, USA), en la modalidad de fijación de voltaje (“voltage-clamp”). Las capacitancias rápida y lenta de la membrana celular fueron neutralizadas y la resistencia en serie fue compensada (alrededor del 70%; los experimentos en las que células presentaron un cambio en la resistencia en serie superior al 20 % fueron rechazados), y el potencial de membrana se mantuvo en el potencial de reposo de la célula. Las señales fueron filtradas a 1-3 KHz y transferidas con una frecuencia de muestreo de 10 KHz a un ordenador pentium mediante una tarjeta de conversión analógico-digital DigiData 1320 (Axon Instruments). El programa de ordenador pCLAMP 8 (Axon Instruments) se utilizó para la generación de los estímulos y la adquisición y almacenamiento de las señales electrofisiológicas.

Todos los experimentos fueron desarrollados a temperatura ambiente (21-24°C).

#### 4. REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS DE PARES DE CÉLULAS (NEURONA-ASTROCITO)

En algunos experimentos se realizaron registros electrofisiológicos simultáneos de pares de células, a saber, astrocitos de las regiones de *stratum oriens* o *stratum radiatum* y neuronas piramidales de la región CA1, examinando al mismo tiempo la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular de los astrocitos. Para el registro electrofisiológico de los astrocitos se utilizaron pipetas llenadas con la solución intracelular indicada anteriormente. Para el registro de las corrientes iónicas de membrana de las neuronas piramidales de CA1 se utilizaron electrodos con una resistencia de 3-6  $\text{M}\Omega$ , y rellenos con una solución intracelular que contenía (en mM): Gluconato-K 135, KCl 10, HEPES 10, MgCl 1, ATP- $\text{Na}_2$  2 (pH = 7.3). Los registros electrofisiológicos fueron obtenidos con un amplificador Axoclamp-2A (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) y un amplificador PC-ONE Patch Clamp (DAGAN Corporation, Minneapolis, MN, USA), en la modalidad de fijación de voltaje ("voltage-clamp"). Las capacitancias rápida y lenta de la membrana celular fueron neutralizadas y la resistencia en serie fue compensada (alrededor del 70%; los experimentos en las que células presentaron un cambio en la resistencia en serie superior al 20 % fueron rechazados), y el potencial de membrana para los astrocitos se mantuvo en el potencial de reposo de la célula, mientras que para las neuronas piramidales se conservó fijado a -70 mV. Las señales fueron filtradas a 1 KHz y transferidas con una frecuencia de muestreo de 10 KHz a un ordenador pentium mediante una tarjeta de conversión analógico-digital DigiData 1320 (Axon Instruments). El programa de ordenador pCLAMP 8 (Axon Instruments) se utilizó para la generación de los estímulos y la adquisición y almacenamiento de los registros. Los pares de registros se realizaron considerando como distancia máxima entre los somas de las células 150  $\mu\text{m}$ . En algunos casos los astrocitos registrados fueron estimulados con trenes de pulsos despolarizantes con el fin de provocar aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (pulsos de 60-180 mV de 100-500 ms de duración, aplicados cada 1 s durante 3-10 min). La frecuencia media de los aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitarios así como las corrientes registradas en las neuronas piramidales de CA1 (corrientes lentas de entrada, denominadas en el texto como SICs, del inglés "Slow Inward Currents") fue analizada cada 3-10 min.

## 5. ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA DE VÍAS AXÓNICAS

### 5.1. Estimulación eléctrica convencional

La estimulación eléctrica de las vías axónicas se produjo por estimulación convencional mediante el uso de electrodos bipolares de nicrom (80  $\mu\text{m}$  de diámetro), conectados a un estimulador a través de unidades de aislamiento (Grass S88, Quincy, MA, USA). Los electrodos de estimulación se situaron cerca del área de subículum sobre el *stratum oriens/alveus* (para simplificar en adelante lo denominaremos alveus), el cual contiene fibras glutamatérgicas y colinérgicas procedentes de los núcleos septum medial y banda diagonal de Broca (Amaral y Witter, 1955; Lewis y Shute, 1967), y sobre *stratum radiatum* de CA1 para estimular las colaterales de Schaffer. Salvo indicación expresa en el texto, se aplicaron trenes de estímulos a 30 Hz durante 5 s (0.016 Hz) y en la mayoría de los casos tres o más respuestas fueron promediadas. En algunos experimentos se modificaron las frecuencias sin alterar la intensidad de estimulación.

### 5.2. Estimulación eléctrica mínima

Para el estudio de la modulación de la transmisión sináptica por astrocitos se estimularon los axones de las colaterales de Schaffer mediante estimulación mínima, con la que se consiguen estimular una o muy pocas sinapsis (Stevens y Wang, 1995; Isaac et al., 1996), utilizando bajos valores de intensidad de estimulación (10-100 mA en la salida del estimulador).

Se utilizaron para la estimulación dos electrodos de plata clorurados (Ag/AgCl) incluidos de manera independiente en un capilar septado (TST 150-6, World Precision Instruments, Inc.) y estirado, con un diámetro en la punta del electrodo de  $\sim 5 \mu\text{m}$ . Los capilares se rellenaron de solución extracelular y se conectaron a un estimulador (S-900, DAGAN Corporation) y a una unidad de aislamiento del estímulo (S-910, DAGAN Corporation).

Se consideraron respuestas sinápticas, denominadas EPSCs o aciertos (éxitos en la transferencia de información sináptica entre la terminal pre y la neurona postsinápticas), aquellas cuya amplitud superaba tres veces el desvío estándar de la señal basal (considerado como ruido), i.e., EPSCs  $> 4 \text{ pA}$ . La ausencia de EPSCs fue considerada

como un fallo en la liberación de neurotransmisor en la terminal presináptica. La clasificación de aciertos y fallos se realizó visualmente, siguiendo este criterio.

Para aceptar que los registros obtenidos eran consecuencia de la estimulación mínima de una o muy pocas sinapsis, se siguieron además los siguientes criterios (Stevens y Wang, 1995; Isaac et al., 1996; Dobrunz y Stevens, 1997):

- 1) No se detectaron respuestas sinápticas en  $\geq 50$  % de los casos.
- 2) La proporción de fallos y aciertos, así como la amplitud de los aciertos no sufrieron cambios aún cuando se aumentó la intensidad de estimulación  $\sim 65$  %.
- 3) La latencia y la forma de los EPSCs no cambiaron durante la estimulación.
- 4) La disminución de la intensidad de estimulación provocó la rápida desaparición de todas las respuestas.

Se analizaron los siguientes parámetros generados por estimulación mínima:

- a) Potencia sináptica (amplitud media de los EPSCs).
- b) Probabilidad de liberación (relación del número de EPSCs registrados respecto al número total de estímulos).
- c) Eficacia sináptica (amplitud media de todas las respuestas, incluyendo fallos y aciertos).

Cambios en la probabilidad de liberación se relacionan con cambios a nivel presináptico, mientras que cambios en la potencia sináptica pueden reflejar alteraciones pre y postsinápticas. Se aplicaron estímulos únicos a 0.5 Hz durante el tiempo de registro. En estos experimentos la solución extracelular contenía en su composición Picrotoxina (50  $\mu$ M), un bloqueante de receptores GABA<sub>A</sub> (receptor ionotrópico involucrado en la transmisión rápida inhibitoria), con lo que se conseguían aislar las respuestas sinápticas excitadoras.

## 6. FOTOMETRÍA DEL Ca<sup>2+</sup> INTRACELULAR EN ASTROCITOS

Las variaciones de Ca<sup>2+</sup> en el astrocito fueron registradas mediante microscopía de fluorescencia, utilizando el indicador de Ca<sup>2+</sup> Fluo-3 (Molecular Probes, Eugene, OR). La pipeta de registro contenía, además de la solución intracelular indicada en el punto III.3, 50 $\mu$ M de Fluo-3. Esta molécula es excitable a longitudes de onda dentro del espectro visible, presentando un máximo de excitación a  $\lambda_{exc}$  488 nm y máximo de emisión a  $\lambda_{em}$  525 nm. El fluoróforo Fluo-3 presenta cambios en la intensidad de su



espectro de emisión de fluorescencia en presencia de diferentes concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ . A bajas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  la sonda Fluo-3 apenas emite fluorescencia, sin embargo su señal de fluorescencia puede aumentar de 60 a 100 veces en presencia de altas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ , por lo que resulta una herramienta adecuada para detectar cambios en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Las células fueron iluminadas a 490 nm utilizando una lámpara de xenón acoplada a un monocromador Polychrome II (T.I.L.L. Photonics, Planegg, Germany). Las células se iluminaron durante 20-200 ms cada 0.5-1 s y la intensidad de epifluorescencia emitida fue recogida (en una ventana de tamaño variable de 25-50  $\mu\text{m}$  de lado) a través de un fotomultiplicador (modelo R928, Hamamatsu Photonic System, Bridgewater, NJ), e integrada por el sistema fotométrico de T.I.L.L. Photonics.

Para estimar si existían cambios en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular se analizó la razón  $(F-F_0)*100/F_0$ , siendo F la fluorescencia obtenida en cada secuencia y  $F_0$  la fluorescencia basal ( $F_0 =$  promedio de 10-20 valores de fluorescencia anteriores al estímulo aplicado o valores correspondientes al inicio del registro, en el caso de variaciones espontáneas de  $\text{Ca}^{2+}$ ). A los valores de fluorescencia se restó la señal de fondo (“background”, correspondiente a procesos de autofluorescencia de las células y uniones no específicas de la sonda con otros elementos). Se consideró que existía respuesta astrocitaria de  $\text{Ca}^{2+}$  cuando la señal de fluorescencia,  $(F-F_0)*100/F_0$ , era 3 veces superior al desvío estándar de la señal basal.

## **7. ANÁLISIS DE LA SEÑAL DE $\text{Ca}^{2+}$ ASTROCITARIA MEDIANTE IMAGEN DE FLUORESCENCIA**

Alternativamente a las medidas fotométricas se tomaron imágenes de epifluorescencia utilizando una cámara digital (CCD; Retiga EX; Qimaging, Canada) acoplada al microscopio. La metodología utilizada fue idéntica a la descrita en el apartado III.6, pero donde el fotomultiplicador fue sustituido por la cámara CCD.

En algunos experimentos se utilizaron diferentes sondas para la medida del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, Fluo-3 AM, Fluo-4 AM, Calcium Green-1 AM (Ca-Green-1 AM) y Fura-2 AM (Molecular Probes, Eugene, OR). Ésta es una técnica de marcaje no invasiva gracias a las formas acetoxi-metiléster (AM) que llevan acoplados los fluoróforos. La forma AM, apolar e insensible a  $\text{Ca}^{2+}$ , permite a la molécula atravesar la membrana plasmática de las células y una vez en el citoplasma ser hidrolizada por la acción de

esterasas celulares liberando el indicador ahora polar y con capacidad para detectar el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. No existieron diferencias en las respuestas de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitario ni alteraciones de los fenómenos observados con el uso de diferentes sondas de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Las rodajas de hipocampo fueron incubadas con el indicador de  $\text{Ca}^{2+}$ , que salvo indicación expresa contraria, fue Fluo-3 AM. Se aplicaron 2-5  $\mu\text{l}$  del marcador, con una concentración inicial de 2 mM en DMSO y ácido plurónico, directamente sobre el hipocampo, alcanzando una concentración final de 2-10  $\mu\text{M}$  (con una concentración final de ácido plurónico de 0.001%), durante 30-60 minutos a temperatura ambiente. En estas condiciones, la gran mayoría de las células cargadas fueron identificadas como astrocitos por sus características morfológicas, confirmadas, en algunos casos, por sus propiedades electrofisiológicas (Kang et al., 1998; Parri et al., 2001; Aguado et al., 2002; Nett et al., 2002; Liu et al., 2004). Las células se iluminaron durante 200-500 ms, y la captura de las imágenes se realizó cada 1-2 s. El monocromador Polychrome II y la cámara estuvieron controlados y sincronizados por un programa adaptado a estos registros IPLab 3.7 (Scanalytics, BD Biosciences Rockville, MD, USA).

Las variaciones de fluorescencia fueron consideradas como aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitario si eran tres veces superiores al desvío estándar de la señal basal ( $F_0$ ), al menos en 2 imágenes consecutivas y si ocurrían durante los 15 s después de la estimulación. El parámetro usado en la cuantificación de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  de los astrocitos fue la amplitud de las variaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  transitorias de larga duración (denominadas “espigas de  $\text{Ca}^{2+}$ ”) generadas por estimulación sináptica (Figuras 3C; 8C) o por despolarización directa del astrocito (Figura 19B). En los experimentos referidos en la figura 19B se analizó además la frecuencia de las espigas de  $\text{Ca}^{2+}$  (denominadas “oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$ ”) que ocurrieron de forma espontánea o después de la despolarización directa del astrocito. Los aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitarios fueron observados tanto espontáneamente (Latour et al., 2001; Aguado et al., 2002) como después de la estimulación sináptica de alveus y/o CS. Se descartaron del estudio aquellos astrocitos en los que la frecuencia de oscilación de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  daba lugar a un análisis equívoco de las respuestas generadas por estimulación sináptica.

## 8. FOTO-ESTIMULACIÓN DE ASTROCITOS

Alternativamente a la estimulación de un único astrocito por pulsos despolarizantes, se utilizaron técnicas de foto-estimulación de agentes donantes de  $\text{Ca}^{2+}$  (conocidos como “jaulas de  $\text{Ca}^{2+}$ ”), con las que se conseguía aumentar rápidamente los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en un astrocito. Como agente donante de  $\text{Ca}^{2+}$  se utilizó o-nitrofenil EGTA (NP-EGTA; Molecular Probes, Eugene, OR), el cual es fotoactivable por luz ultravioleta (UV). NP-EGTA presenta una alta afinidad por  $\text{Ca}^{2+}$  que disminuye drásticamente (hasta 12 000 veces) después de la estimulación con luz UV, permitiendo el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma celular.

La estimulación con pulsos de luz UV se realizó con un sistema de iluminación JML-C2 (Rapp OptoElectronic, Hamburg, Germany). Para la estimulación selectiva de un único astrocito y la monitorización de los cambios de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular se incluyeron NP-EGTA (5 mM) y Fluo-4 (50-100  $\mu\text{M}$ ) en la pipeta de registro del astrocito. La estimulación con pulsos de luz UV (2 Hz, 5 s; 150 V) se concentró en el soma y parte de los procesos astrocitarios, y provocó consistentemente la fotólisis de NP-EGTA y el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  en el astrocito registrado (Figuras 22A; 23B).

En estos experimentos los astrocitos fueron iluminados durante 50-100 ms y la captura de las imágenes se realizó cada 500 ms.

## 9. IONOFORESIS

Se utilizó la técnica de ionoforesis (MicroIontophoresis Dual Current Pulse Generator, World Precision Instruments) que permite la aplicación de drogas o sustancias que presentan carga eléctrica con un alto grado de resolución espacial y temporal. Se aplicaron los siguientes neurotransmisores: glutamato (Glu), acetilcolina (ACh), ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) y ATP con pulsos de corriente de 1-5 s, ajustando la intensidad del estímulo hasta obtener una respuesta reproducible. Se utilizó un capilar septado (TST 150-6, World Precision Instruments, Inc.) con una resistencia de 5-15  $\text{M}\Omega$  para la aplicación de ACh (0.5 M en agua; pH = 6), Glu (0.7 M en agua; pH = 8) y GABA (0.3 M en agua; pH = 4). Cada sección fue rellenada independientemente con los neurotransmisores a estudiar. Para la aplicación de ATP (20mM en LCA; pH = 8) se utilizaron capilares de borosilicato (TW150-4, World

Precision Instruments, Inc.) En todos los casos la pipeta de ionoforesis fue situada en las proximidades del soma del astrocito registrado. Los experimentos de ionoforesis se realizaron en presencia de TTX (1  $\mu$ M).

## 10. AGENTES FARMACOLÓGICOS

MCPG, CNQX, AP5 y t-PDC fueron obtenidos de Tocris Cookson (Bristol, UK); DHK fue obtenido de Ocean Produce International (Shelburne, Canada). El resto de drogas fueron suministradas por Sigma.

## 11. ANÁLISIS DE DATOS

El análisis de los registros electrofisiológicos se realizó con el programa Clampfit, incluido en el programa pCLAMP 8 (Axon Instruments). El análisis estadístico y la representación gráfica de los datos se realizaron mediante el uso de los programas Excel (Microsoft Office 2003) y SigmaPlot 8.0. La medida de fluorescencia en los astrocitos y el tratamiento de las imágenes de  $\text{Ca}^{2+}$  se realizaron con los programas IPLab 3.7 (Scanalytics, BD Biosciences Rockville, MD, USA) y Photoshop 7.0, respectivamente. Los datos son expresados como la media  $\pm$  el error estándar, indicándose en cada caso el número de datos (n). Las diferencias estadísticas fueron establecidas usando el test *t de Student*, asignándose un asterisco (\*) a diferencias significativas con  $p < 0.05$ , dos asteriscos (\*\*) a diferencias muy significativas con  $p < 0.01$  y tres asteriscos (\*\*\*) a diferencias altamente significativas con  $p < 0.001$ . Para el análisis de la distribución de amplitudes de los EPSCs obtenidos con el método de estimulación mínima se utilizó el test de Kolmogorov-Smirnov.

## **IV. RESULTADOS**

## 1. COMUNICACIÓN NEURONA-ASTROCITO. RESPUESTA DE LOS ASTROCITOS A LA ACTIVIDAD SINÁPTICA COLINÉRGICA

Los astrocitos presentan en su membrana una amplia batería de receptores para un gran número de transmisores. Las preparaciones de células en cultivo han permitido caracterizar los diferentes tipos de receptores mediante la aplicación exógena de distintos neurotransmisores (revisado por Verkhratsky et al., 1998; Kettenmann y Steinhäuser, 2005). Sin embargo, la presencia de estos receptores en preparaciones más intactas (como las rodajas de cerebro en cultivo, rodajas frescas agudas o in vivo), así como su activación por la actividad neuronal sólo ha sido confirmada para algunos neurotransmisores, a saber, glutamato, adenosina, ATP, GABA, histamina y noradrenalina (Duffy et al., 1995; Porter y McCarthy 1996, 1997; Pasti et al., 1997; Bezzi et al., 1998; Kang et al., 1998; Robitaille, 1998; Verkhratsky et al., 1998; Guthrie et al., 1999; Kulik et al., 1999; Shelton y McCarthy 1999, 2000; Wang et al., 2006).

El glutamato representa el ejemplo mejor estudiado de neurotransmisor involucrado en la comunicación neurona-astrocito. Asimismo, el hipocampo, estructura donde el glutamato es el principal neurotransmisor excitador, es uno de los modelos más utilizados para el estudio de esta comunicación neurona-astrocito, donde se han caracterizado las respuestas astrocitarias debidas a glutamato liberado sinápticamente por las colaterales de Schaffer (Porter y McCarthy 1996, 1997; Pasti et al., 1997; Bezzi et al., 1998). El hipocampo recibe importantes aferencias de distintas áreas encefálicas, en particular, proyecciones colinérgicas procedentes de los núcleos de los ganglios basales, septum medial y banda diagonal de Broca (Lewis y Shute, 1967; Amaral y Witter, 1995). Los astrocitos localizados en la región de *stratum radiatum* del área CA1 de hipocampo pueden responder a la perfusión de ACh con aumentos en sus niveles de  $Ca^{2+}$  intracelular (Shelton y McCarthy, 2000). Sin embargo, se desconoce si los astrocitos situados en la región *stratum oriens*, región por la que discurren los axones colinérgicos, son capaces de responder a ACh.

La primera aproximación al estudio de la existencia de receptores funcionales de ACh en astrocitos fue la aplicación exógena de ACh por ionoforesis. Se procedió al registro simultáneo de los niveles de  $Ca^{2+}$  intracelular (por inclusión en la pipeta de registro de la sonda fluorescente sensible a  $Ca^{2+}$  Fluo-3) y las corrientes transmembrana en astrocitos de la región *stratum oriens* de CA1, identificados por sus propiedades morfológicas y electrofisiológicas (véase Materiales y Métodos, Figuras 1A, B). La

aplicación de pulsos de ACh (5 s) genera en los astrocitos de *stratum oriens* aumentos en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (8 de 8 astrocitos registrados). Este aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  se bloquea en presencia de atropina (50  $\mu\text{M}$ ), antagonista de los receptores metabotrópicos de ACh sensibles a muscarina, (mAChR; n = 5 astrocitos; p < 0.001) (Figura 2). Estos resultados indican que los astrocitos localizados en la región de *stratum oriens* tienen receptores funcionales de ACh de tipo muscarínico, que desencadenan tras su activación aumentos en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular.

Con el fin de estudiar si los receptores de ACh expresados por los astrocitos de esta región son activados por la actividad sináptica de las fibras colinérgicas, se procedió a la estimulación eléctrica de alveus. Se observa que la estimulación sináptica genera en los astrocitos corrientes transmembrana lentas de entrada ( $-115 \pm 13.3$  pA, amplitud media de una muestra representativa de 68 astrocitos). Además, alrededor del 70% de los astrocitos (54 de 79) responden a la estimulación eléctrica con aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular transitorios y de larga duración (Figura 3C). Asimismo, se observa que la amplitud de ambas respuestas depende de la frecuencia y duración de la estimulación (Figura 3D), indicando que los astrocitos son capaces de responder a la actividad sináptica de los axones colinérgicos de alveus, variando su respuesta en función del grado de actividad de estas fibras.

### **1.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS RESPUESTAS ASTROCITARIAS A LA ESTIMULACIÓN DE ALVEUS**

Los astrocitos, en íntimo contacto con las sinapsis establecidas entre la neurona presináptica y la célula postsináptica, pueden responder a sustancias neuroactivas liberadas por la actividad neuronal (Porter y McCarthy, 1996; Pasti et al., 1997; Latour et al., 2001). Por tanto, se estudió si las respuestas astrocitarias observadas dependían de la liberación sináptica de neurotransmisor, utilizándose para ello agentes farmacológicos que modulan la transmisión sináptica.

Se observa que las corrientes transmembrana, así como los aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular son bloqueadas en presencia de TTX (1  $\mu\text{M}$ ), toxina que bloquea canales de sodio y previene la generación de potenciales de acción, lo cual indica que estas respuestas dependen de la actividad neuronal mediada por potenciales de acción (Figura 4A). La liberación sináptica de neurotransmisor necesita la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular

a través de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  voltaje-dependientes. Estos canales pueden ser bloqueados por cadmio ( $\text{Cd}^{2+}$ ) extracelular (Hille, 1992), inhibiéndose así la liberación vesicular del neurotransmisor. La aplicación de  $\text{Cd}^{2+}$  extracelular (100  $\mu\text{M}$ ), suprime las respuestas astrocitarias de corriente y aumento de los niveles  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Figura 4B).

Otro fármaco que modula la transmisión sináptica es 4-aminopiridina (4-AP), bloqueante de canales de potasio, que despolariza la membrana celular e incrementa la liberación de neurotransmisor de las terminales nerviosas (Thesleff, 1980). La presencia de 4-AP (100  $\mu\text{M}$ ) en el medio induce un aumento en la amplitud de las respuestas astrocitarias, tanto de las corrientes transmembrana como de las variaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Figura 4C).

Estos resultados indican que las respuestas de los astrocitos a la estimulación de las fibras de alveus están mediadas por la actividad sináptica, puesto que requieren de la existencia de potenciales de acción y la liberación vesicular de neurotransmisor.

## **1.2. LAS CORRIENTES DE ENTRADA ESTÁN MEDIADAS POR LA ACTIVACIÓN DE TRANSPORTADORES ELECTROGÉNICOS DE GLUTAMATO**

Los astrocitos expresan en su membrana un elevado número de transportadores de glutamato  $\text{Na}^+$ -dependientes con gran afinidad por glutamato (GLT-1 y GLAST, homólogos de los transportadores EAAT1 Y EAAT2 en humano, respectivamente). Los transportadores de glutamato  $\text{Na}^+$ -dependientes son los responsables del 95% de la recaptura del glutamato liberado en la hendidura sináptica llevada a cabo por los astrocitos (Mennerick et al., 1996; Bergles y Jahr, 1997; Anderson y Swanson, 2000).

La concentración extracelular de glutamato en condiciones fisiológicas es de  $\sim 2 \mu\text{M}$ , mientras la concentración intracelular de glutamato varía entre 1 y 10 mM dependiendo del tipo celular (Anderson y Swanson, 2000). La activación de los transportadores GLT-1 y GLAST permite la recaptura, dentro del citoplasma del astrocito, del glutamato liberado a la hendidura sináptica en contra de su gradiente de concentración. El transporte de glutamato, cargado negativamente y asociado con un  $\text{H}^+$ , está acoplado al transporte de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  que siguen sus respectivos gradientes de concentración, lo que genera una corriente neta de entrada a través de la membrana de la célula (Bergles y Jahr, 1997; Huang y Bergles, 2004). Existe al mismo tiempo una entrada de  $\text{Cl}^-$  cuya función no está totalmente aclarada; se ha propuesto que podría actuar contrarrestando



la despolarización que acompaña la recaptura de glutamato (Wadiche et al., 1995). Esta corriente ha sido registrada en astrocitos de la región *stratum radiatum* de CA1, donde el glutamato liberado por las colaterales de Schaffer es capaz de activar los transportadores de los astrocitos localizados en esta región (Bergles y Jahr, 1997).

Como se ha mencionado en el punto anterior, los núcleos de los ganglios basales, septum medial y banda diagonal de Broca, proyectan axones colinérgicos a la región *stratum oriens* de CA1 de hipocampo. Sin embargo, además de los axones colinérgicos se han descrito proyecciones de naturaleza glutamatérgica a la región CA1 procedentes de estos núcleos (Manns et al., 2001), existiendo también axones glutamatérgicos de colaterales recurrentes de las propias piramidales de CA1 (Ramón y Cajal, 1899; Klishin et al., 1995; Maccaferri y McBain, 1995), que establecen contactos sinápticos con otras piramidales de CA1 e interneuronas. Conociendo, por tanto, la invasión colinérgica y glutamatérgica de la región del *stratum oriens*, la estimulación eléctrica de esta vía podría activar los transportadores de glutamato en los astrocitos localizados en esta región. Para testar esta hipótesis, se registraron las corrientes de membrana y los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular de astrocitos del *stratum oriens* y, posteriormente, se aplicaron antagonistas de estos transportadores, dihidrokainato (DHK 1 mM; antagonista no transportable selectivo para GLT-1) y L-trans-2,4- dicarboxilato de pirrolidina (t-PDC 0.3 mM; inhibidor competitivo no selectivo de la recaptura de glutamato). La aplicación de estos antagonistas reduce de forma significativa la amplitud de las corrientes ( $19.3 \pm 5.8\%$  respecto al control;  $n = 4$ ;  $p < 0.001$ ), sin afectar a la amplitud de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por la estimulación sináptica (Figuras 5A, B). Otro resultado a favor de la participación de los transportadores de glutamato en la generación de estas corrientes la aportó la sustitución de  $\text{Na}^+$  extracelular por litio ( $\text{Li}^+$ ), el cual inhibe la recaptura de glutamato dependiente de  $\text{Na}^+$  (Araque et al., 2000). La sustitución de  $\text{Na}^+$  por  $\text{Li}^+$  reduce significativamente la amplitud de estas corrientes ( $11.2 \pm 5.8\%$  respecto al control;  $n = 7$ ;  $p < 0.001$ ).

Estos resultados indican que las corrientes registradas en los astrocitos de *stratum oriens* están fundamentalmente mediadas por la activación de transportadores de glutamato, lo que sugiere que los astrocitos de esta región están involucrados en la recaptura del glutamato liberado en la hendidura sináptica. Además, la ausencia de cambios en la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitaria en presencia de antagonistas de los transportadores indican la independencia de los mecanismos que subyacen a estos dos fenómenos.

### 1.3. LOS AUMENTOS DE $\text{Ca}^{2+}$ SON DEBIDOS A LA ACTIVACIÓN DE RECEPTORES METABOTRÓPICOS DE ACh

Los astrocitos localizados en *stratum radiatum* de CA1 responden a la estimulación de las CS con variaciones de su  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Estos aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  están mediados por la activación de receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs) (Porter y McCarthy, 1996; Pasti et al., 1997; Bezzi et al., 1998) y, en el caso de células precursoras de oligodendrocitos se han descrito aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  mediados por la activación de receptores glutamatérgicos de tipo AMPA (Bergles et al., 2000). Por lo tanto, para testar si los astrocitos localizados en el *stratum oriens* expresan en su membrana receptores de glutamato (GluR) y que éstos son funcionales, se aplicó directamente glutamato con técnicas de ionoforesis. La aplicación directa de glutamato (0.7 M, 5 s) sobre los astrocitos provoca aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (8 de 9 astrocitos; confirmando resultados previos en astrocitos de *stratum radiatum* por Shelton y McCarthy, 1999), que se ven bloqueados en presencia de antagonistas de receptores de glutamato ( $n = 4$ ;  $p < 0.001$ ) (Figura 6A).

Una vez identificada la presencia de receptores de glutamato en los astrocitos de *stratum oriens* se investigó si los aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  observados tras la estimulación de alveus estaban mediados por la activación de estos receptores. Se observa que tanto antagonistas de los receptores metabotrópicos de glutamato, MCPG (0.8 mM; antagonista no selectivo de los receptores del grupo I y II), como antagonistas de los receptores ionotrópicos, CNQX (20  $\mu\text{M}$ ; antagonista competitivo de los receptores AMPA/Kainato) y D-AP-5 (50  $\mu\text{M}$ ; antagonista competitivo de los receptores NMDA), no afectaron la amplitud de las respuestas de  $\text{Ca}^{2+}$  ni la amplitud de las corrientes de membrana (Figuras 6B, C). Estos resultados indican que el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por la estimulación eléctrica de alveus no está determinado por la activación de receptores de glutamato.

Puesto que el alveus contiene aferencias colinérgicas que proyectan a CA1 y establecen contactos sinápticos en *stratum oriens* (Lewis y Shute, 1967; Amaral y Witter, 1995), se analizó si los aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  registrados en los astrocitos de esta región podrían estar mediados por la activación de receptores colinérgicos.

Los astrocitos de preparaciones en cultivo presentan en su membrana, entre otros, receptores nicotínicos de ACh (nAChRs). Los receptores nicotínicos que contienen en

su estructura la subunidad  $\alpha 7$  son permeables a  $\text{Ca}^{2+}$  y su activación produce un aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en astrocitos en cultivo, a través de un mecanismo de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  (Sharma y Vijayaraghavan, 2001). Además, en células gliales de moluscos se ha demostrado la activación sináptica de receptores nicotínicos (Smit et al., 2001). Sin embargo, su expresión en otro tipo de preparaciones como rodajas agudas de cerebro, está discutida (Shelton y McCarthy, 2000). Para testar si los receptores nicotínicos podían estar mediando las respuestas de aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  registradas en los astrocitos del *stratum oriens*, se estudió la expresión funcional de éstos. Como se puede observar en la figura 7A, la estimulación eléctrica de alveus genera respuestas astrocitarias, aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y corrientes transmembrana, que no se ven afectadas por la aplicación de MLA (50 nM), antagonista de los receptores nicotínicos que expresan la subunidad  $\alpha 7$ . Estos resultados indican que el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por la estimulación de alveus no se debe a la activación de receptores nicotínicos de ACh.

Como se ha descrito en párrafos anteriores los astrocitos de *stratum oriens* expresan receptores metabotrópicos de ACh (mAChRs) funcionales (Figura 2; Shelton y McCarthy, 2000). Por tanto, se analizaron los efectos de atropina, antagonista de los mAChRs, sobre las respuestas generadas por la estimulación eléctrica de alveus. En la figura 7B se observa que los aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  se reducen en presencia de atropina ( $12.1 \pm 8.2\%$  respecto al control;  $n = 8$ ), sin afectar la amplitud de las corrientes de membrana, lo que sugiere que la reducción en la respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  no se debe a una reducción de la actividad sináptica (Figuras 7B, C). Por lo tanto, estos resultados indican que los astrocitos de *stratum oriens* son capaces de responder a la estimulación de alveus con aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular mediados por la activación de receptores metabotrópicos colinérgicos.

Los astrocitos poseen una amplia gama de receptores metabotrópicos acoplados intracelularmente a proteínas G que permiten la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Esta movilización depende de la activación de una cascada de segundos mensajeros, donde destaca la activación secuencial de fosfolipasa C (PLC), la producción de inositol-trifosfato ( $\text{IP}_3$ ) y la activación de los receptores de  $\text{IP}_3$  en el retículo endoplásmico, lo que genera la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  de los reservorios intracelulares y el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico (c.f., Porter y McCarthy, 1997; Shelton y McCarthy, 2000). En consecuencia, se analizó la dependencia de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitaria del  $\text{Ca}^{2+}$  de los reservorios intracelulares.

Thapsigargina es un inhibidor de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP-asa responsable de introducir  $\text{Ca}^{2+}$  en los reservorios intracelulares en contra de gradiente, y su uso conlleva el vaciado de los reservorios intracelulares. La perfusión de thapsigargina (1  $\mu\text{M}$ ) durante 30-45 min consigue inhibir el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  en los astrocitos (Figura 7C). Este resultado muestra que la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  generada por la estimulación de alveus se debe a la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  desde los reservorios intracelulares. La amplitud de las corrientes de membrana no se ve afectada significativamente en presencia de thapsigargina, lo cual sugiere que thapsigargina no modifica la cantidad de neurotransmisor liberado (c.f., Reyes y Stanton, 1996).

En conjunto, estos resultados indican que los astrocitos de *stratum oriens* responden a la actividad de una vía colinérgica extrínseca al hipocampo, con aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  mediados por la activación de mAChRs y corrientes lentas de entrada generadas por la activación de transportadores de glutamato.

## **2. COMUNICACIÓN NEURONA-ASTROCITO. RESPUESTA DE LOS ASTROCITOS A LA ACTIVIDAD GLUTAMATÉRGICA**

Conociendo que los astrocitos de la región de *stratum oriens* del hipocampo responden con aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  a ACh, pero no a glutamato liberados sinápticamente tras la estimulación de los axones de alveus y, que estos astrocitos expresan receptores funcionales de glutamato (Porter y McCarthy, 1996; Shelton y McCarthy, 1999; Latour et al., 2001), nos planteamos la siguiente pregunta: ¿Podrían activarse estos receptores en respuesta a una vía glutamatérgica distinta?

Las colaterales de Schaffer (CS), colaterales axónicas de las neuronas piramidales de CA3, son la principal entrada glutamatérgica a la región CA1. Estas colaterales discurren fundamentalmente por el *stratum radiatum* y, en una pequeña proporción proyectan al *stratum oriens* de la región CA1 (Li et al., 1994). Para testar si los astrocitos localizados en *stratum oriens* pueden responder al glutamato liberado por las colaterales de Schaffer, se registraron simultáneamente las variaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y las corrientes transmembrana en los astrocitos de esta región. Como muestra la figura 8C la estimulación de las CS genera corrientes lentas de entrada ( $-39.9 \pm 5.5$  pA;  $n = 31$ ) y un aumento en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en los astrocitos registrados (84% de una muestra de 31 células). La amplitud de ambas respuestas depende de la frecuencia y duración del estímulo (Figura 8F), al igual que ocurría en el

caso de la estimulación de alveus, indicando que la respuesta de los astrocitos es función del grado de actividad sináptica de las colaterales de Schaffer.

## **2.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS RESPUESTAS ASTROCITARIAS A LA ESTIMULACIÓN DE LAS COLATERALES DE SCHAFER**

Siguiendo el mismo procedimiento utilizado para la caracterización de las respuestas desencadenadas por la estimulación de alveus, se usaron herramientas farmacológicas que modulan la actividad sináptica y la liberación de neurotransmisor. La aplicación de TTX (1  $\mu$ M; Figura 8D) y  $\text{Cd}^{2+}$  extracelular (100  $\mu$ M), inhiben tanto el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular como las corrientes transmembrana. Por el contrario, la perfusión de 4-AP (100  $\mu$ M) incrementa la amplitud de ambas respuestas, quedando así demostrado que las respuestas astrocitarias generadas por la estimulación de las CS están mediadas por la liberación sináptica de neurotransmisor (Figura 8E).

## **2.2. LAS CORRIENTES DE ENTRADA ESTÁN MEDIADAS POR LA ACTIVACIÓN DE TRANSPORTADORES ELECTROGÉNICOS DE GLUTAMATO**

Las corrientes transmembrana registradas en estos astrocitos podrían ser debidas a la activación de transportadores electrogénicos de glutamato, como consecuencia de la recaptura del glutamato liberado por las CS a la hendidura sináptica. Para comprobar esta hipótesis, se aplicaron antagonistas de los transportadores de glutamato. La presencia de antagonistas específicos de estos transportadores, DHK (1 mM) y t-PDC (0.3 mM), bloquea la aparición de las corrientes sin afectar significativamente los aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 9B). Además, como ocurre en el caso de la estimulación de alveus, la sustitución de  $\text{Na}^{+}$  extracelular por  $\text{Li}^{+}$  inhibe totalmente las corrientes transmembrana ( $2.4 \pm 1.2\%$  respecto al control,  $n = 6$ ;  $p < 0.001$ ).

Estos resultados indican que las corrientes transmembrana generadas por la estimulación de las colaterales de Schaffer están mediadas por la activación de transportadores de glutamato.

### **2.3. LOS AUMENTOS DE $\text{Ca}^{2+}$ SON DEBIDOS A LA ACTIVACIÓN DE RECEPTORES METABOTRÓPICOS DE GLUTAMATO**

Puesto que las colaterales de Schaffer son axones glutamatérgicos y su activación genera corrientes transmembrana mediadas por transportadores de glutamato, se analizó si la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitaria podía deberse a la activación de receptores glutamatérgicos en la membrana de los astrocitos. En presencia de antagonistas de receptores de glutamato, los aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  son significativamente reducidos ( $20 \mu\text{M}$  CNQX +  $50 \mu\text{M}$  AP5 +  $0.8 \text{ mM}$  MCPG;  $p < 0.001$ ; Figuras 9A, B), indicando la naturaleza glutamatérgica de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitaria. Con el fin de conocer si los receptores ionotrópicos de glutamato estaban participando en la respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  registrada, se aplicaron antagonistas específicos de estos receptores, CNQX ( $20 \mu\text{M}$ ) y AP5 ( $50 \mu\text{M}$ ). La presencia de estos antagonistas no afecta significativamente al incremento de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $69.5 \pm 11.1\%$ ;  $n = 4$ ;  $p = 0.07$ ; Figura 9B), lo que sugiere que el  $\text{Ca}^{2+}$  que pudiera permear por estos receptores no contribuye sustancialmente a los aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  registrados. Sin embargo, en presencia únicamente de MCPG ( $0.8 \text{ mM}$ ), antagonista de los receptores metabotrópicos, no se detectan aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  en los astrocitos, indicando que la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  en respuesta a la estimulación de las CS está mediada esencialmente por receptores metabotrópicos de glutamato (Figuras 11B, D). Consistente con estos resultados, la aplicación de thapsigargina ( $1 \mu\text{M}$ ) bloquea los aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  sin afectar la amplitud de las corrientes de los transportadores (Figura 9B).

Por lo tanto, estos resultados indican que el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por la estimulación de las CS se debe a la activación de receptores metabotrópicos de glutamato que movilizan  $\text{Ca}^{2+}$  de los reservorios intracelulares.

### 3. LOS ASTROCITOS DISCRIMINAN LA ACTIVIDAD DE DIFERENTES TERMINALES SINÁPTICAS PROCEDENTES DE DISTINTAS VÍAS AXÓNICAS

Como se ha descrito anteriormente los astrocitos de *stratum oriens* responden con aumentos de  $Ca^{2+}$  a ACh, pero no a glutamato liberado de las terminales sinápticas de alveus. Sin embargo, los astrocitos de esta región son capaces de responder a glutamato cuando es liberado por las CS, lo cual sugiere que los astrocitos podrían discriminar la actividad de diferentes sinapsis glutamatérgicas y responder selectivamente a la actividad de cada vía axónica o, alternativamente, podrían existir dos subpoblaciones de astrocitos capaces de responder específicamente a cada una de las vías. Para estudiar estas ideas, se registraron en un mismo astrocito las respuestas generadas por la estimulación de las CS y alveus (Figura 10A).

En estas condiciones, la estimulación de alveus y CS generó aumentos de  $Ca^{2+}$  y corrientes transmembrana en un mismo astrocito. Farmacológicamente se caracterizaron las respuestas de  $Ca^{2+}$  obtenidas por la estimulación de las dos vías, comprobándose que las respuestas de  $Ca^{2+}$  originadas por la estimulación de CS son insensibles a la aplicación de atropina (50  $\mu$ M) y su dependencia de la activación de receptores metabotrópicos de glutamato, ya que los aumentos de  $Ca^{2+}$  desaparecen tras la perfusión de MCPG (0.8 mM). Por el contrario, en presencia de atropina, pero no de MCPG, se bloquea el aumento de  $Ca^{2+}$  generado por la estimulación de alveus. Las respuestas de  $Ca^{2+}$  desaparecen totalmente en presencia de los dos antagonistas (Figuras 11B, D). Estos resultados indican que los receptores glutamatérgicos de los astrocitos de *stratum oriens* se activan por glutamato liberado por las CS, pero no por glutamato liberado por las terminales de alveus, que, sin embargo sí es capaz de alcanzar la membrana de los astrocitos, como demuestra la existencia de las corrientes de membrana debidas a la activación de los transportadores de glutamato (Figuras 10B, 11A).

En conjunto, estos resultados revelan que los astrocitos responden específicamente a la actividad de vías axónicas que liberan diferentes neurotransmisores (i.e., ACh y glutamato), además de discriminar la actividad de distintas sinapsis procedentes de diferentes vías (i.e., sinapsis glutamatérgicas de alveus y CS) (Figura 10B).

#### **4. INTEGRACIÓN DE LA INFORMACIÓN SINÁPTICA POR ASTROCITOS. LOS ASTROCITOS MODULAN SU SEÑAL DE $\text{Ca}^{2+}$ EN RESPUESTA A LA ACTIVIDAD SIMULTÁNEA DE DISTINTAS SINAPSIS**

Las neuronas han sido clásicamente reconocidas como los elementos celulares responsables del procesamiento de información del Sistema Nervioso. Una característica fundamental de las neuronas involucrada en el procesamiento de información es su capacidad de modular su excitabilidad eléctrica en respuesta a la interacción de distintos neurotransmisores (McCormick, 1998). Conociendo la facultad de los astrocitos de responder con aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  tanto a la actividad de alveus como a las CS, nos preguntamos si los astrocitos podrían modular su señal de  $\text{Ca}^{2+}$ , la base de su excitabilidad celular, en respuesta a la interacción de estas dos vías. Es decir, ¿los astrocitos son capaces de integrar la información procedente de dos sinapsis y modular su excitabilidad celular o, simplemente, responden de forma pasiva a la actividad sináptica? Con el fin de investigar esta idea planteamos la siguiente hipótesis: si no existe integración de información, la respuesta del astrocito generada por la estimulación simultánea (ES) de alveus y CS sería igual a la suma de las respuestas obtenidas por la estimulación independiente (EI) de cada una de ellas (Figura 10C). La interacción entre las dos vías es cuantificada como la relación O/E, a saber, el cociente entre la respuesta observada (O) por ES y la respuesta esperada (E) de la suma de las respuestas obtenidas por EI de cada vía.

El resultado de este análisis muestra que la corriente de los transportadores generada por ES no resulta significativamente diferente de la corriente esperada ( $94.36 \pm 18.87\%$ ;  $n = 28$  astrocitos; Figuras 11A, C). La señal de  $\text{Ca}^{2+}$ , por su parte, presenta un comportamiento más complejo. En la mayoría de los casos (60 de 77 células) la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  generada por ES es menor en amplitud (i.e.,  $\text{O/E} < 100\%$ ) que la señal esperada y, en el 13% de los astrocitos la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  obtenida por ES es mayor que el valor esperado (10 de 77 células). Durante ES la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  se reduce en promedio al  $47.8 \pm 5.6\%$  ( $n = 77$ ;  $p < 0.001$ ; Figuras 11B, C).

Abordamos la caracterización farmacológica de este fenómeno aplicando antagonistas de los receptores metabotrópicos de ACh y glutamato. Como hemos descrito en párrafos anteriores la presencia de atropina ( $50 \mu\text{M}$ ) bloquea el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  mediado por la estimulación de alveus, así como la presencia de MCPG ( $0.8 \text{ mM}$ )



inhibe la respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  generada por las CS. La perfusión de cualquiera de estos antagonistas inhibe la modulación de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  observada por la estimulación simultánea de ambas vías. Se observa que en presencia de atropina o MCPG la respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  generada por ES es similar a la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por la estimulación independiente de CS o alveus, respectivamente (Figuras 11B, D). Por lo tanto, la modulación de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitaria es un fenómeno que requiere la activación de receptores colinérgicos y glutamatérgicos.

Una posible explicación para este fenómeno podría ser que la modulación de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  no fuese más que la consecuencia de la saturación de los mecanismos de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde los reservorios intracelulares o del agotamiento parcial de éstos. Para testar esta hipótesis se aumentó la intensidad de estimulación de las CS o alveus (incrementando de esta forma el número de axones estimulados). El resultado de estos experimentos muestra que la respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  todavía es capaz de aumentar en amplitud, superando incluso los valores de  $\text{Ca}^{2+}$  esperados para la estimulación simultánea ( $n = 4$ ; Figura 11E). Además, el análisis detallado del grado de modulación (medido como la relación O/E) respecto a la amplitud de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$ , obtenida por estimulación independiente de cada una de las vías, no muestra relación de dependencia entre ellas (coeficiente de correlación lineal  $r^2 = 0.01$  para las respuestas de  $\text{Ca}^{2+}$  generadas por estimulación de CS y alveus). Estos resultados indican que la modulación de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  no depende de la amplitud de la señal en respuesta a cada una de las vías.

Además, una característica de la modulación de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  es que puede presentarse aunque no existan aumentos detectables de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en los astrocitos registrados. El estudio de astrocitos que sólo mostraron aumentos detectables de  $\text{Ca}^{2+}$  por estimulación de alveus (11 de 77 células) o CS (24 de 77 células), pero no por estimulación de la otra vía, reveló que también estas células expresaban modulación de su señal de  $\text{Ca}^{2+}$  tras la estimulación simultánea de ambas vías (33 de 35 astrocitos), lo que sugiere que prácticamente todos los astrocitos son capaces de responder a las dos vías. Aunque no podemos excluir que existan pequeñas respuestas inferiores a nuestro nivel de detección, estos resultados sugieren que la regulación de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por la actividad simultánea de dos vías no es dependiente del propio  $\text{Ca}^{2+}$ , si no que es consecuencia de un mecanismo modulador anterior a la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de los reservorios intracelulares.

En conjunto, estos resultados muestran que los astrocitos modulan su señal de  $\text{Ca}^{2+}$  en respuesta a la actividad simultánea de distintas sinapsis.

#### **4.1. LOS ASTROCITOS PRESENTAN PROPIEDADES INTRÍNSECAS RESPONSABLES DE LA MODULACIÓN DE LA SEÑAL DE $\text{Ca}^{2+}$**

La reducción que se observa en la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  durante ES podría ser debida a la disminución de la cantidad de neurotransmisor liberado por las terminales sinápticas estimuladas. Sin embargo, esta posibilidad parece poco probable si se observa que la amplitud de la corriente de los transportadores, que refleja la cantidad de glutamato liberado (Mennerick et al., 1996; Bergles y Jahr, 1997; Huang y Bergles, 2004), obtenida por ES es similar al valor esperado de la suma de las corrientes generadas por estimulación independiente (Figuras 11A, C).

No obstante, para testar esta hipótesis se utilizó un detector más sensible a cambios en la liberación de neurotransmisor: las corrientes sinápticas de neuronas piramidales de CA1. Se registraron las corrientes excitadoras postsinápticas (EPSCs, del inglés “Excitatory PostSynaptic Currents”) inducidas por la estimulación a 1 Hz de alveus y CS. Estas corrientes son debidas a la activación de receptores ionotrópicos de glutamato sensibles a CNQX (20  $\mu\text{M}$ ;  $n = 3$ ;  $p < 0.001$ ). Las corrientes sinápticas inducidas por ES no son significativamente distintas de la suma de las corrientes generadas por EI (Figuras 12A, B). Además, para estudiar si existía algún tipo de modulación entre las dos vías se utilizó el test de pares de pulsos, comúnmente usado para estudiar fenómenos de facilitación o depresión de la transmisión sináptica a nivel presináptico. Se compararon las amplitudes de los EPSCs obtenidos por estimulación de CS o alveus, observándose que la amplitud media de la respuesta no se ve modificada por la estimulación previa de la otra vía (Figuras 12C, D; pulsos separados 50 ms). En conjunto, la suma de las corrientes y la ausencia de regulación cruzada de los EPSCs indican que se están activando distintos grupos de sinapsis y que la cantidad de neurotransmisor liberado por alveus o CS no se ve modificada por la activación de la otra vía.

Por otra parte, es conocida la capacidad de ACh de modular la liberación de neurotransmisor (Hounsgaard, 1978; Gray et al., 1996), y que la estimulación repetida de larga duración de las aferencias colinérgicas al hipocampo induce una inhibición de curso lento de la liberación de glutamato por las colaterales de Schaffer (Fernández de

Sevilla y Buño, 2003). Para testar si la aplicación de trenes de estímulos en alveus estaba modificando la liberación de glutamato de las CS, se estudiaron las corrientes sinápticas inducidas por CS antes e inmediatamente después de la estimulación de alveus con un único tren de estímulos (30 Hz, 5 s, es decir, los mismos parámetros empleados para observar la modulación de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos). El resultado de este estudio muestra que la aplicación de un tren de estímulos en alveus no modifica significativamente la amplitud media de las corrientes sinápticas generadas por la estimulación de CS (Figuras 12E, F).

En conjunto, el análisis de las corrientes sinápticas indica que la modulación de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  no es consecuencia de interacciones ocurridas en la red neuronal que modifiquen la cantidad de neurotransmisor liberado por las terminales sinápticas.

Conociendo entonces que la regulación de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitaria requería la activación de receptores de ACh y glutamato y no dependía de las interacciones del circuito neuronal en el que se hallaban localizados, ¿era de esperar que existiese modulación de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  por aplicación directa de ambos neurotransmisores?

Para contestar esta pregunta, se aplicaron ionofóricamente glutamato y ACh, bloqueando con TTX ( $1\mu\text{M}$ ) la actividad sináptica mediada por potenciales de acción. Cuando a través de una pipeta septada situada próxima al cuerpo de los astrocitos se aplican ambos transmisores (Figura 13A), se observa que la aplicación de glutamato, así como de ACh (pulsos de 5 s de duración), provocan aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  (15 de 15 astrocitos), sensibles a la aplicación de MCPG ( $0.8\text{ mM}$ ) y atropina ( $50\ \mu\text{M}$ ), respectivamente (Figuras 13B, C). La modulación de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  aparece cuando se aplican simultáneamente los dos neurotransmisores, siendo significativamente menores las variaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  generadas por la aplicación simultánea que las respuestas esperadas por la suma de los aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  obtenidos por la aplicación de un solo neurotransmisor ( $51.17 \pm 5.27\%$ ;  $p < 0.001$ ; Figuras 13A, B). Y como ocurre en el caso de la modulación inducida por estimulación eléctrica, este fenómeno desaparece en presencia de los antagonistas de los receptores de ACh o glutamato (Figuras 13B, C). Estos resultados, que apoyan los datos obtenidos con estimulación sináptica, indican que la modulación de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  se debe a propiedades intrínsecas de los astrocitos.

Si esta propiedad de los astrocitos de modular su señal de  $\text{Ca}^{2+}$  se presentaba como consecuencia de la activación de determinadas sinapsis o si, por el contrario, se

expresaba indistintamente de las características de las sinapsis estimuladas, era un asunto aún por determinar.

Para aclarar esta cuestión, se estudió la existencia de modulación de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por glutamato y otro neurotransmisor de gran relevancia en el hipocampo, el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA). Al igual que en el caso de ACh y glutamato, se aplicaron directamente estos neurotransmisores mediante ionoforesis y en presencia de TTX ( $1 \mu\text{M}$ ). Se observa que la aplicación de GABA es capaz de producir aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos de la región de *stratum oriens* (7 de 7 células). La aplicación simultánea de glutamato y GABA da lugar a incrementos de  $\text{Ca}^{2+}$  similares en amplitud a la suma de las respuestas inducidas independientemente por cada neurotransmisor ( $95.42 \pm 2.47\%$ ;  $p > 0.05$ ) (Figuras 14A, B)

Estos resultados indican que la modulación de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$ , es un fenómeno específico que depende de la naturaleza de los transmisores involucrados y, por tanto, de las características de las sinapsis implicadas.

#### **4.2. LA MODULACIÓN DE LA SEÑAL DE $\text{Ca}^{2+}$ ES REGULADA POR EL GRADO DE ACTIVIDAD SINÁPTICA**

Como se ha descrito en el apartado anterior, la modulación de  $\text{Ca}^{2+}$  depende de los neurotransmisores involucrados, esto es, ACh y glutamato en el caso de la estimulación de alveus y CS. Esta modulación implica la reducción de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  generada por la estimulación simultánea a altas frecuencias de ambas vías. Nos preguntamos entonces si el grado de modulación de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  era un fenómeno constante o, por el contrario, era función del grado de actividad sináptica. Se estudió, por tanto, si existía relación alguna entre el grado de actividad sináptica y la modulación de  $\text{Ca}^{2+}$  observada en los astrocitos.

Para abordar este estudio se utilizaron distintos parámetros de estimulación, aplicándose trenes de estímulos de 10 a 50 Hz (5 s de duración) en las CS, mientras permanecía constante la frecuencia de estimulación de alveus a 30 Hz (5 s de duración). Se analizó la relación entre la respuesta observada y la respuesta esperada (O/E) para las distintas frecuencias de estimulación aplicadas en las CS. En la figura 15A se observa que la razón O/E disminuye a medida que la frecuencia de estimulación de las CS aumenta, es decir, cuanto mayor es el grado de actividad sináptica mayor es la depresión relativa de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitaria. El estudio del efecto de la estimulación a bajas

frecuencias sobre la modulación del  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitario requería la aplicación de un paradigma de estimulación distinto, puesto que la frecuencia de estimulación aplicada en alveus era relativamente alta (30 Hz). En consecuencia, las frecuencias de estimulación (1 a 50 Hz) aplicadas a ambas vías fueron idénticas y fueron cambiando conjuntamente en cada uno de los experimentos, analizándose las razones O/E correspondientes. Consistente con los resultados anteriores, la figura 15C muestra que la estimulación a altas frecuencias (30 y 50 Hz) provoca aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  por debajo de los valores esperados. Sin embargo, la estimulación a bajas frecuencias (1 y 10 Hz) genera respuestas de  $\text{Ca}^{2+}$  significativamente mayores que las respuestas esperadas, es decir, la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  es potenciada por encima de los valores esperados. Estos resultados muestran la existencia de un control bidireccional de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  por la actividad sináptica, siendo potenciada o deprimida en función del grado de actividad neuronal.

En conjunto estos resultados indican que la modulación de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos es un fenómeno plástico y bidireccional regulado por el grado de actividad sináptica.

#### **4.3. LA MODULACIÓN DE LA SEÑAL DE $\text{Ca}^{2+}$ ESTÁ PRESENTE EN REGIONES SUBCELULARES DE LOS PROCESOS ASTROCITARIOS**

Hasta el momento se han presentado resultados del estudio de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  registrada en el soma del astrocito. Sin embargo, distintos trabajos han mostrado que la comunicación neurona-astrocito es un fenómeno altamente localizado en regiones concretas de los procesos astrocitarios, denominados “microdominios”, regiones subcelulares de los procesos capaces de responder independientemente a la actividad sináptica con aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  (Pasti et al., 1997; Grosche et al., 1999; Carmignoto, 2000; Haydon y Araque, 2002; Araque et al., 2002; Nett et al., 2002; Fiacco y McCarthy, 2004). Decidimos por tanto estudiar si estas regiones subcelulares de los astrocitos presentaban también modulación de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  en respuesta a la activación simultánea de distintas sinapsis. Para ello se analizaron astrocitos que, con el indicador fluorescente, mostraban visibles 1 o más procesos. Se estudiaron las variaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  generadas por la estimulación independiente o simultánea a altas frecuencias de CS y alveus, como se ha descrito en apartados anteriores, midiendo el cambio de fluorescencia en el soma así como en regiones restringidas de los procesos

astrocitarios de 20-50  $\mu\text{m}^2$ , que se corresponde con la magnitud de los microdominios observados en la glía de Bergmann en cerebelo (definidos por Grosche et al., 1999). De las distintas regiones en que fueron subdivididos los procesos se analizó 1 área por proceso (Figura 16A). Bajo estas condiciones el 83% de las regiones estudiadas (20 de 24, de una muestra de 14 astrocitos) presentaron modulación de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por estimulación simultánea de las CS y alveus, como refleja la correspondiente relación O/E (Figuras 16B, C). En concreto, la mayoría de las regiones presentaron una reducción de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  (17 de 24), mientras que en 3 casos se produjo una potenciación de la respuesta observada y en otros 4 no se observaron diferencias respecto a los valores esperados.

Estos resultados indican que las regiones subcelulares de los procesos modulan sus niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en respuesta a la actividad de distintas sinapsis. Por tanto, los microdominios astrocitarios no sólo representan los elementos subcelulares encargados del intercambio de información entre astrocitos y neuronas si no que son las unidades de integración de la información sináptica en la comunicación neurona-astrocito.

Dado que la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  puede propagarse intracelularmente en condiciones de intensa actividad sináptica desde las regiones donde se genera hacia el soma y otros procesos astrocitarios (Porter y McCarthy, 1996; Pasti et al., 1997; Grosche et al., 1999), se estudiaron los posibles efectos de la modulación de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  en la propagación intracelular de la misma.

En algunos casos, pudo observarse que la estimulación independiente de las CS y alveus genera aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  en regiones concretas de los procesos que se propagan, con cierto retraso, al soma y otros procesos celulares (Porter y McCarthy, 1996; Pasti et al., 1997; Grosche et al., 1999) (Figura 17). La estimulación simultánea de estas vías provoca no sólo la modulación de la respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  observada (como ya ha sido descrita), si no que además la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  queda confinada en regiones discretas, desapareciendo así la propagación de  $\text{Ca}^{2+}$  al resto de la célula. Un ejemplo de este fenómeno se ilustra en la figura 17, donde se muestra un astrocito en el que se distinguen 2 procesos y que fue subdividido en 3 regiones (las regiones 1 y 3 corresponden a procesos y la región 2 corresponde al soma del astrocito). La estimulación de las CS generó aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  en las regiones 1 y 2, pero no en la región 3. Por su parte, la estimulación de alveus provocó aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  en la región 1, que se propagaron hacia el soma y la región 3 con un cierto retraso. Activando

simultáneamente ambas vías, la respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  se vio reducida en amplitud en la región 1 y no se observó respuesta alguna en las regiones sucesivas (Figura 17B). Estos resultados muestran que la actividad simultánea de distintas sinapsis no sólo puede modular la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  a nivel de los microdominios, si no que también puede controlar su propagación dentro del astrocito.

En conjunto, estos resultados indican que los microdominios son las unidades elementales que subyacen a la comunicación recíproca entre neuronas y astrocitos. Además, como se discutirá más adelante, el control sináptico de la propagación de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  puede tener importantes consecuencias en la fisiología cerebral, regulando espacialmente la influencia de los astrocitos sobre los elementos sinápticos.

## **5. COMUNICACIÓN ASTROCITO-NEURONA. CONSECUENCIAS FISIOLÓGICAS DE LA SEÑAL DE $\text{Ca}^{2+}$ ASTROCITARIA**

Hasta aquí se han presentado resultados correspondientes a las consecuencias de la actividad neuronal sobre la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitaria. No obstante, la comunicación neurona-astrocito es una comunicación recíproca donde la actividad neuronal también puede verse influenciada por la actividad astrocitaria. La señal de  $\text{Ca}^{2+}$  tiene un papel crucial en la señalización astrocito-neurona, siendo decisiva en los procesos que se acompañan de liberación de sustancias neuroactivas, denominadas “gliotransmisores”, a través de mecanismos  $\text{Ca}^{2+}$ -dependientes, como glutamato, ATP y D-Serina (Araque et al., 1998a, b; 2000; Bezzi et al., 1998, 2004; Innocenti et al., 2000; Newman, 2003; Pasti et al., 2001; Zhang et al., 2004; Mothet et al., 2005). Decidimos por tanto, investigar las consecuencias de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitaria sobre la excitabilidad neuronal y la transmisión sináptica evocada en neuronas piramidales de CA1.

### **5.1. MODULACIÓN DE LA EXCITABILIDAD ELÉCTRICA EN NEURONAS PIRAMIDALES DE CA1**

Utilizando preparaciones de cultivos celulares se había demostrado que el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos estimula la liberación de glutamato, originando la aparición de corrientes lentas de entrada (definidas como SICs, del inglés “Slow Inward Currents”), en neuronas próximas. Estas corrientes eran debidas a la activación de receptores

ionotrópicos de glutamato e indicaban que los astrocitos pueden modular la excitabilidad eléctrica neuronal en preparaciones en cultivo (Araque et al., 1998a).

Sin embargo, se desconocía la existencia de esta modulación en preparaciones más intactas. Por tanto, decidimos investigar la existencia de SICs en rodajas de cerebro. Así, estudiamos las consecuencias electrofisiológicas de los aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitarios sobre la excitabilidad neuronal en neuronas piramidales de CA1 de hipocampo. Para ello, se realizaron registros de pares de células, astrocitos y neuronas piramidales de CA1, mientras se registraban simultáneamente las variaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos (Figura 18A).

Puesto que los astrocitos presentan aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  espontáneos, nos propusimos investigar si las neuronas piramidales mostraban también estas corrientes lentas, SICs, espontáneamente.

En ausencia de  $\text{Mg}^{2+}$  extracelular, que permite la activación de receptores de NMDA en el potencial de membrana en reposo, las neuronas piramidales muestran espontáneamente corrientes excitadoras postsinápticas (EPSCs; amplitud media  $-39.8 \pm 3.9$  pA;  $n = 35$ ), así como corrientes lentas de entrada (SICs, amplitud media  $-18.3 \pm 1.4$  pA;  $n = 35$ ) (Figura 18B). Estas corrientes lentas pueden ser distinguidas de los EPSCs por sus características cinéticas, ya que presentan un curso temporal de activación y desactivación más lento que las corrientes sinápticas (véase Figura 18B). La frecuencia de aparición de estas corrientes lentas, SICs, no se modifica en presencia de TTX ( $1 \mu\text{M}$ ), indicando que no están mediadas por la liberación de neurotransmisor dependiente de potenciales de acción (Figura 18C). En presencia de TTX aún existen corrientes sinápticas, denominadas corrientes miniaturas, debidas a la liberación espontánea e independiente de potenciales de acción de neurotransmisor. En estas condiciones, todavía es posible discriminar las SICs de las corrientes miniaturas por sus características cinéticas (10–90% tiempo de la fase de ascenso:  $27.9 \pm 8.5$  y  $6.0 \pm 1.0$  ms, respectivamente; 10–90% tiempo de la fase de caída:  $193.2 \pm 92.9$  y  $24.5 \pm 3.2$  ms, respectivamente;  $n = 20$ ). Por tanto, utilizando parámetros cinéticos podemos distinguir las corrientes sinápticas y las SICs.

Se utilizaron herramientas farmacológicas para determinar el tipo de transmisor y los receptores implicados en la generación de SICs (Figura 18C). La aplicación de CNQX ( $10 \mu\text{M}$ ), antagonista de los receptores de glutamato de tipo AMPA/Kainato, no modifica la frecuencia de aparición de estas corrientes lentas. Por el contrario, la



aplicación de AP5 (50  $\mu\text{M}$ ), antagonista de los receptores de glutamato de tipo NMDA, bloquea completamente la aparición de estas corrientes. De acuerdo con este resultado, la presencia de  $\text{Mg}^{2+}$  (2 mM) en el medio extracelular reduce significativamente la frecuencia de SICs. Aunque se encontraron diferencias en la frecuencia de SICs debidas a la presencia de  $\text{Mg}^{2+}$  extracelular, no se observaron cambios en la amplitud de estas corrientes ( $-22.8 \pm 3.2$  pA en control y  $-17.0 \pm 1.9$  pA en presencia de 2 mM  $\text{Mg}^{2+}$ ;  $n = 17$  SICs;  $p > 0.05$ ), sugiriendo que estas corrientes reflejan eventos unitarios no sinápticos. Estos resultados sugieren que las corrientes lentas de entrada SICs están mediadas por la activación de receptores de tipo NMDA en la neurona piramidal.

Puesto que el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos genera SICs mediadas por glutamato en neuronas en preparaciones en cultivo (Araque et al., 1998a), decidimos investigar el posible origen astrocitario del glutamato responsable de las SICs y su dependencia de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$ . Para ello, se registraron simultáneamente las corrientes transmembrana en neuronas y la señal de  $\text{Ca}^{2+}$ , medida en el soma, en astrocitos (3-6 astrocitos situados en las proximidades de la neurona registrada,  $< 150$   $\mu\text{m}$  del soma de la neurona).

Como resultado de estos experimentos se observó que la mayoría de las SICs ( $69.2 \pm 4.8\%$ ;  $n = 92$  SICs de 8 pares de células) fueron registradas durante el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  espontáneo en astrocitos adyacentes (Figura 19A). La ausencia de paralelismo absoluto entre estas dos respuestas no resulta sorprendente ya que es probable que una fracción de los astrocitos que experimentan aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  no estén siendo registrados (por su localización fuera del plano focal o por llenado insuficiente con la sonda fluorescente Fluo-3).

La estimulación con trenes de pulsos despolarizantes ha sido utilizada como herramienta para aumentar selectivamente el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en astrocitos (Kang et al., 1998; Zonta et al., 2003). Con el fin de testar si la frecuencia de SICs estaba relacionada con la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitaria, se aplicaron trenes de pulsos despolarizantes (60-180 mV de 100-500 ms de duración, aplicados cada 1 s durante 3-10 min) en los astrocitos. La despolarización directa de los astrocitos resultó efectiva en el 83.33% de los casos (10 de 12 astrocitos), generando un aumento en la frecuencia de oscilación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, así como el incremento de la frecuencia de aparición de las SICs neuronales (Figuras 19B, C). La presencia de AP5 (50  $\mu\text{M}$ ) en el medio consigue bloquear totalmente la aparición de las corrientes lentas sin afectar a la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitaria (Figura 19A).

Estos resultados sugieren que el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos es suficiente para inducir la liberación de glutamato y la activación de receptores de NMDA en las neuronas piramidales de CA1.

Para investigar si el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  en los astrocitos es además necesario para inducir estas corrientes en la neurona postsináptica, se utilizó BAPTA, un quelante rápido y específico de  $\text{Ca}^{2+}$ , en la pipeta de registro de los astrocitos. En presencia de BAPTA (20 mM) no se detectan aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$ , espontáneos o inducidos por estimulación en los astrocitos registrados, ni se observa un incremento de la frecuencia de SICs ( $0.51 \pm 0.11 \text{ min}^{-1}$  en control frente a  $0.48 \pm 0.15 \text{ min}^{-1}$  con despolarización en el astrocito;  $p > 0.05$ ;  $n = 6$  pares de células) (Figura 19C).

En conjunto, estos resultados demuestran que el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  en los astrocitos es necesario y suficiente para inducir corrientes lentas de entrada mediadas por la activación de receptores NMDA en neuronas piramidales de CA1.

Por último, para confirmar la dependencia de la SIC neuronal respecto del aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitario, decidimos potenciar la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitaria sincronizando experimentalmente el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  en varios astrocitos mientras se registraban las corrientes neuronales. Como estímulo se utilizó ATP por su capacidad de provocar aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, que pueden propagarse intercelularmente como una onda de  $\text{Ca}^{2+}$  (Cotrina et al., 2000) (Figura 20A). La aplicación por ionoforesis de ATP, en presencia de TTX ( $1 \mu\text{M}$ ), provoca el aumento sincronizado de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en varios astrocitos ( $n = 35$  astrocitos en 5 rodajas). Concomitantemente a estos aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  se observa la aparición de una o varias SICs en la neurona piramidal ( $-77.7 \pm 1.3 \text{ pA}$ ;  $n = 40$  SICs en 5 rodajas) (Figura 20B). La aplicación de AP5 ( $50 \mu\text{M}$ ) bloquea totalmente la aparición de estas corrientes, mientras las respuestas de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitarias no resultan afectadas (Figuras 20B, C). Estos resultados apoyan la idea de que el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  en los astrocitos provoca la liberación de glutamato que activa receptores NMDA en la neurona piramidal.

El análisis de la aparición de las SICs neuronales y los aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  inducidos por ATP muestra la existencia de una restricción temporal de la respuesta neuronal (Figura 20D). Se observa que el aumento en la frecuencia de SICs sólo ocurre durante la fase de ascenso de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitaria (5-6 s) y, aunque los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en los astrocitos permanecen aumentados por más tiempo, la frecuencia de SICs vuelve a valores control pasado este breve periodo de incremento de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitaria.

Estos resultados sugieren, por un lado, que la liberación de glutamato, desencadenada por el aumento de la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  en los astrocitos, podría ocurrir sólo cuando la pendiente de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  fuese positiva, es decir, sólo durante la fase de ascenso del incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Por otro, que la restricción temporal de la liberación de glutamato podría ser debida a un agotamiento de los mecanismos de liberación, es decir, debido a la existencia de un bajo número de vesículas que contienen el transmisor o debido a una limitación en la efectividad de la transmisión, quizá por la falta de estructuras especializadas como existen en las sinapsis.

En conjunto, estos resultados indican que los astrocitos modulan la excitabilidad eléctrica neuronal, mediante la liberación  $\text{Ca}^{2+}$ -dependiente de glutamato, generando corrientes lentas de entrada mediadas por la activación de receptores de NMDA neuronales.

## **5.2. MODULACIÓN DE LA TRANSMISIÓN SINÁPTICA EVOCADA**

Por último, nos preguntamos si los astrocitos son capaces de modular la transmisión sináptica evocada por potenciales de acción.

El estudio de la posible modulación de la transmisión sináptica por astrocitos se enfrenta a un problema conceptual y dos obstáculos metodológicos. El primero se basa en la variabilidad de efectos del  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitario sobre la transmisión sináptica, habiéndose descrito que los astrocitos provocan el aumento de la transmisión excitadora, de la transmisión inhibitoria y participan en la inhibición de la transmisión excitadora (Araque et al., 1998a,b; Kang et al., 1998; Zhang et al., 2003; Fiacco y McCarthy, 2004; Liu et al., 2004; Pascual et al., 2005). Los obstáculos metodológicos consisten en: 1) la necesidad de la activación selectiva de astrocitos, que impide el uso de sustancias neuroactivas como herramientas para la estimulación de astrocitos; y 2) el hecho de que la estimulación sináptica convencional provoca la activación de un elevado número de axones y sinapsis, lo cual implica la existencia de una alta variabilidad intrínseca en los parámetros que definen la transmisión sináptica. Esta variabilidad podría fácilmente enmascarar los efectos de un único astrocito sobre estos parámetros. Por tanto, decidimos utilizar como aproximación experimental la “estimulación mínima” de una o muy pocas sinapsis y la foto-estimulación de un único astrocito (véase Materiales y Métodos).

Para ello, se realizaron pares de registros de astrocitos de *stratum radiatum* y neuronas piramidales de CA1 y se estimularon las CS utilizando el método de estimulación mínima. La estimulación selectiva y la visualización de los cambios de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en astrocitos únicos se realizaron mediante la inclusión en la pipeta de registro de NP-EGTA (5 mM), donante de  $\text{Ca}^{2+}$  fotoactivable por luz UV, y Fluo-4 (50-100  $\mu\text{M}$ ) (Figura 22A).

La estimulación de una o pocas sinapsis de las CS (0.5 Hz) genera en la neurona postsináptica respuestas sinápticas unitarias, caracterizadas por presentar fallos, lo que se observa como ausencia de respuesta, y éxitos de la transmisión sináptica, EPSCs, de amplitud pequeña y estable (Figura 21C, D, E). La probabilidad de éxito de respuestas es  $\sim 0.4$ , lo cual está de acuerdo con la probabilidad de éxito media para las sinapsis CA3-CA1 (Dobrunz y Stevens, 1997). Se analizaron los siguientes parámetros: probabilidad de éxito de los EPSCs, amplitud media de los EPSCs (denominada “potencia sináptica”) y amplitud media de los EPSCs incluyendo fallos (denominada “eficacia sináptica”), en condiciones control (pre-estímulo) así como en condiciones de estimulación del astrocito (post-estímulo).

La estimulación de los astrocitos con pulsos de luz UV (2 Hz, 5 s de duración) genera aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular de larga duración (10 de 10 astrocitos; Figuras 22A, 23B). El aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  generado por la estimulación con luz UV es reproducido en estímulos sucesivos (Figura 22B).

En las condiciones de pares de registros y estimulación mínima, la coincidencia de la estimulación sináptica y el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  en el astrocito provoca cambios en la transmisión sináptica (Figura 23B). El análisis de las respuestas sinápticas antes (Pre) y después (Post) del aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  en el astrocito indica que, mientras la potencia sináptica (tamaño de los EPSCs) no se ve afectada por el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitario (23C, D, E), la probabilidad de liberación (número de EPSCs) aumenta significativamente (4 de 8 pares de células) (23B-E).

En ausencia de NP-EGTA en la pipeta de registro del astrocito la estimulación con luz UV no genera cambios en los parámetros de estudio ( $n = 3$  pares de células). Asimismo, las propiedades sinápticas no se ven afectadas por la presencia en el medio extracelular de una pipeta llenada con NP-EGTA ( $n = 3$  neuronas). Por tanto, estos resultados sugieren que la modulación de la transmisión sináptica observada con la estimulación por UV de un astrocito no se debe a la estimulación directa por luz UV de

la terminal sináptica, ni al aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular derivado de la fotoestimulación de NP-EGTA.

En conjunto, nuestros resultados sugieren que los astrocitos son capaces de modular la transmisión sináptica a nivel de una única sinapsis a través de mecanismos presinápticos.

Aunque desconocemos los neurotransmisores y mecanismos que subyacen a esta modulación que ejercen los astrocitos sobre la transmisión sináptica, estos resultados plantean numerosas preguntas que aún quedan por resolver. Conocer qué tipo de gliotransmisor está mediando esta respuesta, así como los receptores y mecanismos presinápticos neuronales involucrados resulta esencial para entender la sutil comunicación existente en cada una de las sinapsis entre astrocitos y neuronas.

## **VI. DISCUSIÓN**

La existencia de comunicación recíproca entre astrocitos y neuronas revela el importante papel que juegan los astrocitos en la fisiología del Sistema Nervioso. Los resultados aquí presentados muestran que los astrocitos, más allá de ser meros espectadores, son elementos activos, dotados de propiedades complejas, que participan activamente en los procesos de transferencia y procesamiento de información del Sistema Nervioso.

Así, se ha demostrado que los astrocitos localizados en *stratum oriens* de la región CA1 de hipocampo, que recibe abundantes aferencias colinérgicas, responden a ACh liberada sinápticamente por estas fibras. ACh activa receptores metabotrópicos colinérgicos presentes en la membrana de los astrocitos, aumentando la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular mediante la liberación de  $Ca^{2+}$  desde los reservorios intracelulares. Por lo tanto, la respuesta de los astrocitos a ACh liberada sinápticamente implica la existencia de un nuevo transmisor en la comunicación entre neuronas y astrocitos.

Además, los astrocitos de la región de *stratum oriens* de hipocampo son capaces de responder a la actividad de axones, extrínsecos al circuito local en el que residen, procedentes de núcleos de los ganglios basales, septum medial y banda diagonal de Broca. Estos resultados sugieren que los astrocitos pueden actuar también como dianas para aferencias que procedan de diferentes áreas cerebrales, lo que añade mayor complejidad a las vías funcionales de comunicación existentes en el Sistema Nervioso.

Conjuntamente con los axones colinérgicos por la región de alveus discurren también axones glutamatérgicos (Klishin et al., 1995; Maccaferri y McBain, 1995; Manns et al., 2001), por lo que resulta sorprendente que los aumentos de  $Ca^{2+}$  en los astrocitos de *stratum oriens* estén mediados exclusivamente por receptores de ACh y no de glutamato. Más aún considerando que los astrocitos de esta región expresan receptores funcionales de glutamato y que existen corrientes mediadas por transportadores de glutamato, lo cual indica que el glutamato liberado por estas fibras consigue alcanzar la membrana astrocitaria. Una posible explicación para estos resultados podría ser que la concentración de glutamato extracelular alcanzada por la estimulación de las fibras de alveus no fuese suficiente para activar los receptores de glutamato, pero sí los transportadores. Sin embargo, parece improbable debido a que la afinidad de los transportadores de glutamato es similar a la que presentan los receptores metabotrópicos de glutamato ( $EC_{50} = 4-30 \mu M$ ) (Conn y Pin, 1997; Anderson y Swanson, 2000).

Asimismo, los astrocitos de *stratum oriens* de hipocampo presentan la capacidad de discriminar la actividad de distintas sinapsis procedentes de diferentes áreas cerebrales. Estos astrocitos discriminan entre la actividad de sinapsis colinérgicas y glutamatérgicas, así como entre sinapsis que pertenecen a distintas vías axónicas, es decir, pueden diferenciar entre el glutamato liberado por las colaterales de Schaffer o por las terminales de alveus. Esta discriminación entre el glutamato liberado por CS y alveus sugiere la existencia de dominios funcionales de membrana, que aseguran una comunicación neurona-astrocito localizada. Aunque se desconocen los mecanismos que median esta selectividad, una posible explicación para este fenómeno se basaría en que receptores y transportadores de glutamato están espacialmente segregados en la membrana de los astrocitos, es decir, los receptores de glutamato estarían situados en los microdominios próximos a las terminales de las CS, pero no en los procesos cercanos a las terminales glutamatérgicas de alveus, favoreciendo así la comunicación glutamatérgica neurona-astrocito procedente de CA3. Esta distribución heterogénea permitiría la formación de vías extracelulares de comunicación, que permitirían la activación selectiva de receptores de glutamato por determinadas terminales sinápticas. Por lo tanto, la discriminación de neurotransmisores por parte de los astrocitos representa una propiedad celular que define nuevas vías de comunicación entre neuronas y astrocitos.

Del mismo modo, hemos demostrado que los astrocitos tienen la capacidad de modular su señal de  $Ca^{2+}$  en respuesta a la activación simultánea de sinapsis colinérgicas y glutamatérgicas, la cual depende de propiedades intrínsecas de los astrocitos. Esta modulación es función del grado de actividad sináptica neuronal, siendo potenciada o deprimida a bajas y altas frecuencias, respectivamente. La modulación de la señal de  $Ca^{2+}$  depende de la naturaleza de los transmisores involucrados, presentándose cuando se activan simultáneamente sinapsis colinérgicas y glutamatérgicas, pero no cuando se estimulan receptores glutamatérgicos y gabaérgicos. Esta selectividad en los neurotransmisores que participan en la modulación de la señal de  $Ca^{2+}$  podría ser debida a las rutas intracelulares de segundos mensajeros acopladas a cada uno de ellos. Mientras que los receptores metabotrópicos de ACh y glutamato convergen en sus rutas intracelulares de señalización a nivel de la activación de fosfolipasa C y producción de  $IP_3$ , los receptores metabotrópicos de GABA están acoplados a vías intracelulares distintas que implican la regulación de la adenilato ciclasa y la modulación de los niveles de  $AMP_c$  (Catsicas y Mobbs, 2001).



Estos resultados sugieren que la modulación de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos es un fenómeno plástico que puede ser inducido selectivamente por la activación de determinadas vías axónicas.

La propiedad de la mayoría de los neurotransmisores de aumentar los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en los astrocitos está suficientemente documentada (Porter y McCarthy, 1997; Verkhratsky et al., 1998; Perea y Araque 2005b). Trabajos más recientes han demostrado que la activación de receptores por aplicación exógena de neurotransmisores puede tener efectos potenciadores en la respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  (Fatatis et al., 1994; Cormier et al., 2001; Sul et al., 2004), sin embargo, no se conocía la existencia de una señalización neuronal con efectos depresores sobre la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  en los astrocitos. Nuestros resultados demuestran que la actividad simultánea de sinapsis colinérgicas y glutamatérgicas puede inducir una reducción de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$ , sugiriendo que esta señal es susceptible de depresión, lo que representaría una forma de inhibición.

Además, numerosos fenómenos celulares dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  podrían ser regulados por la modulación sináptica de esta señal, en concreto la liberación de gliotransmisores dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , como glutamato y ATP, y sus efectos neuromoduladores (Kang et al., 1998; Newman y Zhas, 1998; Newman, 2003; Zhang et al., 2003; Fiacco y McCarthy, 2004; Fellin et al., 2004; Perea y Araque, 2005a). En consecuencia, la modulación bidireccional de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  añade mayor complejidad y grados de libertad a la comunicación neurona-astrocito.

Una de las propiedades fundamentales de las neuronas es su capacidad de integrar la información sináptica. Esta integración se define como el proceso por el cual las neuronas son capaces, gracias a las propiedades intrínsecas de su membrana, de sumar no linealmente distintas entradas excitadoras e inhibitoras y elaborar una nueva respuesta de salida (véase Nicholls et al., 2001). Por tanto, la modulación de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  que acontece en los astrocitos en respuesta a la activación de distintas sinapsis sugiere que los astrocitos son capaces de integrar la información procedente de distintas sinapsis.

Igualmente, hemos demostrado que el fenómeno de modulación de las respuestas de  $\text{Ca}^{2+}$  tiene lugar en regiones concretas de los procesos astrocitarios, denominados microdominios, apoyando la idea de que los microdominios representan la unidad elemental en la comunicación recíproca neurona-astrocito (Grosche et al., 1999; Haydon y Araque, 2002; Nett et al., 2002; Fiacco y McCarthy, 2004; Perea y Araque, 2005a).

La propagación de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitaria está regulada por el grado de actividad sináptica, demostrándose que a bajas frecuencias de estimulación la respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  queda restringida en áreas concretas de los procesos y, en condiciones de intensa actividad (altas frecuencias de estimulación) se generan señales de  $\text{Ca}^{2+}$  que, iniciadas en determinados procesos, acaban propagándose al resto de la célula (Porter y McCarthy, 1996; Pasti et al., 1997; Kang et al., 1998). Este fenómeno ha sido propuesto como base de un código de comunicación neurona-astrocito, que se traduce en señales de corto alcance y de largo alcance (Fellin y Carmignoto, 2004). Nuestros resultados van más allá y muestran que la modulación de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  controla la propagación intracelular de la misma, indicando que las características de la comunicación neurona-astrocito no sólo dependen del grado de actividad sináptica, sino también de las características espacio-temporales de la actividad de diferentes sinapsis.

Asimismo, nuestros resultados muestran que la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitaria estimula la liberación de glutamato, que genera corrientes lentas mediadas por la activación de receptores de NMDA en neuronas piramidales de CA1. Además, el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  en los astrocitos es capaz de modular la transmisión sináptica evocada. Por tanto, el control sináptico de la propagación de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  puede tener importantes consecuencias en la fisiología cerebral, regulando el alcance de la influencia astrocitaria sobre las terminales sinápticas (Kang et al., 1998; Angulo et al., 2004; Fellin et al., 2004; Fiacco y McCarthy 2004).

Aunque se desconocen los mecanismos celulares responsables de la modulación de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$ , nuestros resultados sugieren que este mecanismo no reside en la interacción de la red neuronal, sino que resulta de fenómenos reguladores a nivel del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, apoyando la existencia de propiedades intrínsecas en los astrocitos. Si bien es cierto que no podemos descartar la existencia de pequeñas variaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  por debajo de nuestro nivel de detección, el hecho de que esta regulación no parezca depender de la amplitud de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  indica que el factor limitante en esta modulación no es el propio  $\text{Ca}^{2+}$ , sino un proceso intracelular anterior a la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de los reservorios intracelulares. Conociendo que los receptores metabotrópicos de ACh y glutamato comparten las mismas rutas intracelulares de señalización a nivel de la activación de fosfolipasa C, producción de  $\text{IP}_3$  y liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de los reservorios intracelulares, la modulación de  $\text{Ca}^{2+}$  podría ser debida a la regulación de la cascada de segundos mensajeros en alguno de los puntos anteriores a la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ . Son necesarios futuros estudios para determinar la posible interacción entre las vías

intracelulares de señalización y conocer los mecanismos moleculares implicados en la modulación de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitaria.

El aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos estimula la liberación de glutamato, que a través de su acción sobre receptores presinápticos y postsinápticos modula la transmisión sináptica y la excitabilidad neuronal (Araque et al., 1998a,b; Kang et al., 1998; Pasti et al., 2001; Parri et al., 2001; Brockhaus y Deitmer, 2002; Fellin et al., 2004; Fiacco y McCarthy 2004; Liu et al., 2004; Pascual et al., 2005; Tian et al., 2005). Nuestros resultados han mostrado que el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos estimula la liberación de glutamato que induce la aparición de corrientes lentas excitadoras, SICs, mediadas por la activación de receptores de tipo NMDA en neuronas piramidales de CA1. Estas corrientes y su dependencia de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitaria, descritas originalmente en preparaciones de astrocitos en cultivo (Araque et al., 1998a), han sido observadas también en neuronas talámicas, donde podrían estar relacionadas con procesos de maduración de la red neuronal (Parri et al., 2001) y en neuronas piramidales de CA1, donde se ha sugerido que la aparición de estas corrientes podría estar relacionada con mecanismos de sincronización de la actividad neuronal (Angulo et al., 2004; Fellin et al., 2004). Aunque no hemos investigado el significado funcional de estas corrientes, el hecho de que estén mediadas por receptores de NMDA sugiere que, además de la sincronización neuronal sugerida por otros autores (Angulo et al., 2004; Fellin et al., 2004), podrían producirse fenómenos de detección de coincidencia entre la comunicación astrocito-neurona y la actividad sináptica en la neurona postsináptica.

Asimismo, nuestros resultados muestran que los astrocitos son capaces de modular las propiedades de transmisión de información de una única sinapsis. La estimulación selectiva de un único astrocito puede incrementar de forma transitoria la probabilidad de liberación de neurotransmisor en una sinapsis. Aunque todavía no disponemos de datos que revelen la naturaleza del transmisor que está mediando este fenómeno ni los mecanismos que lo sustentan, el aumento de la probabilidad de liberación indica que el astrocito está actuando a través de mecanismos presinápticos que regulan la liberación de neurotransmisor.

Estos resultados sugieren la participación de los astrocitos en procesos de plasticidad sináptica a corto plazo y, ya que son capaces de aumentar la eficacia sináptica, los astrocitos podrían intervenir en la expresión de LTP en aquellas sinapsis. Dada la importancia de la plasticidad en la transmisión de la información en el SN, el hecho de que los astrocitos puedan modular e intervenir en ella añade mayor complejidad al SNC.

En conclusión, la propiedad de los astrocitos de diferenciar entre la actividad de diferentes sinapsis pertenecientes a distintas vías neuronales, la modulación bidireccional de su excitabilidad celular por la actividad sináptica y la expresión de propiedades intrínsecas sugieren que los astrocitos están dotados de características computacionales celulares, hasta ahora propiedad fundamental considerada exclusiva de las neuronas, que permiten considerar a los astrocitos como elementos involucrados en el procesamiento de información del Sistema Nervioso.

## **VI. CONCLUSIONES**

1. Los astrocitos localizados en el *stratum oriens* de la región CA1 de hipocampo de rata responden a acetilcolina liberada sinápticamente.
2. Los astrocitos responden a la actividad de vías extrínsecas al circuito local en el que están inmersos.
3. Los astrocitos pueden discriminar la actividad de distintas sinapsis y responder selectivamente a la activación de cada una de ellas.
4. Los astrocitos modulan su señal de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en respuesta a la activación simultánea de sinapsis colinérgicas y glutamatérgicas.
5. La modulación de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  depende de propiedades intrínsecas de los astrocitos.
6. La señal de  $\text{Ca}^{2+}$  es regulada bidireccionalmente por la actividad sináptica, siendo potenciada o deprimida en función del grado de actividad neuronal.
7. La modulación de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  ocurre localmente en regiones discretas de los astrocitos.
8. La modulación de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  puede controlar la propagación intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  en el astrocito.
9. Los astrocitos modulan la excitabilidad eléctrica de neuronas piramidales de CA1 mediante la activación de receptores glutamatérgicos de NMDA.
10. Los astrocitos modulan la transmisión sináptica excitadora entre las colaterales de Schaffer y las neuronas piramidales de CA1 de hipocampo a través de mecanismos presinápticos.

## **VII. REFERENCIAS**

- Aguado, F., Espinosa-Parrilla, J.F., Carmona, M.A., Soriano, E. (2002). Neuronal activity regulates correlated network properties of spontaneous calcium transients in astrocytes in situ. *J. Neurosci.* *22*, 9430-9444.
- Amaral, D.G., Witter, M.P. (1995). Hippocampal formation. In: *The rat nervous system*. Ed 2 (Paxinos G, ed), pp 443–493. London: Academic.
- Anderson, C.M., Swanson, R.A. (2000). Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia* *32*, 1–14.
- Angulo, M.C., Kozlov, A.S., Charpak, S., Audinat, E. (2004). Glutamate released from glial cells synchronizes neuronal activity in the hippocampus. *J. Neurosci.* *24*, 6920–6927.
- Araque, A., Li, N., Doyle, R.T., Haydon, P.G. (2000). SNARE protein-dependent glutamate release from astrocytes. *J. Neurosci.* *20*, 666-673.
- Araque, A., Martin, E.D., Perea, G., Arellano, J.I., Buño, W. (2002). Synaptically-released acetylcholine evokes  $Ca^{2+}$  elevations in astrocytes in hippocampal slices. *J. Neurosci.* *22*, 2443-2450.
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R.P., Haydon, P.G. (1998a). Glutamate-dependent astrocyte modulation of synaptic transmission between cultured hippocampal neurons. *Eur. J. Neurosci.* *10*, 2129-2142.
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R.P., Haydon, P.G. (1999). Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci.* *22*, 208-215.
- Araque, A., Sanzgiri, R.P., Parpura, V., Haydon, P.G. (1998b). Calcium elevation in astrocytes causes an NMDA receptor-dependent increase in the frequency of miniature synaptic currents in cultured hippocampal neurons. *J. Neurosci.* *18*, 6822-6829.
- Bergles, D.E., Jahr, C.E. (1997). Synaptic activation of glutamate transporters in hippocampal astrocytes. *Neuron* *19*, 1297-1308.
- Bergles, D.E., Diamond, J.S., Jahr, C.E. (1999). Clearance of glutamate inside the synapse and beyond. *Curr. Opin. Neurobiol.* *9*, 293-298.
- Bergles, D.E., Roberts, J.D., Somogyi, P., Jahr, C.E. (2000). Glutamatergic synapses on oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. *Nature* *405*, 187-191.
- Bezzi, P., Carmignoto, G., Pasti, L., Vesce, S., Rossi, D., Rizzini, B., Pozzan, T., Volterra, A. (1998). Prostaglandins stimulate  $Ca^{2+}$ -dependent glutamate release in astrocytes. *Nature* *391*, 281-285.



- Bezzi, P., Gundersen, V., Galbete, J.L., Seifert, G., Steinhauser, C., Pilati, E. y Volterra, A. (2004). Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. *Nat Neurosci.* 7, 613-620.
- Brockhaus, J., Deitmer, J.W. (2002). Long-lasting modulation of synaptic input to Purkinje neurons by Bergmann glia stimulation in rat brain slices. *J. Physiol. (Lond)* 545, 581-593.
- Carmignoto, G. (2000). Reciprocal communication systems between astrocytes and neurons. *Prog. Neurobiol.* 62, 561-581.
- Catsicas, M., Mobbs, P. (2001). GABA<sub>B</sub> Receptors Regulate Chick Retinal Calcium Waves. *J. Neurosci.* 21, 897-910.
- Cornell-Bell, A.H., Finkbeiner, S.M., Cooper, M.S., Smith, S.J. (1990). Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science* 247, 470-73.
- Charles, A.C., Merrill, J.E., Dirksen, E.R., Sanderson, M.J. (1991). Intercellular signaling in glial cells: calcium waves and oscillations in response to mechanical stimulation and glutamate. *Neuron* 6, 983-992.
- Conn, P.J., Pin, J.P. (1997). Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37, 205–237.
- Cormier, R.J., Mennerick, S., Melbostad, H., Zorumski, C.F. (2001). Basal levels of adenosine modulate mGluR5 on rat hippocampal astrocytes. *Glia* 33, 24-35.
- Cotrina, M.L., Lin, J.H., Lopez-Garcia, J.C., Naus, C.C., Nedergaard, M. (2000). ATP-mediated glia signaling. *J. Neurosci.* 20, 2835–2844.
- Cotrina, M.L., Nedergaard, M. (2005). Intracellular calcium control mechanisms in glia, in: H. Kettenman, B. Ransom (Eds.), *Neuroglia*, Oxford University Press, New York, pp. 229–239.
- Deitmer, J.W., Verkhratsky, A.J., Lohr, C. (1998). Calcium signalling in glial cells. *Cell Calcium* 24, 405–416.
- Dobrunz, L.E., Stevens, C.F. (1997). Heterogeneity of Release Probability, Facilitation, and Depletion at Central Synapses. *Neuron* 18, 995-1008.
- Duffy, S., MacVicar, B.A. (1995). Adrenergic calcium signaling in astrocyte networks within the hippocampal slice. *J. Neurosci.* 15, 5535–5550.
- Fatatis, A., Holtzclaw, L.A., Avidor, R., Brenneman, D.E., Russell, J.T. (1994). Vasoactive intestinal peptide increases intracellular calcium in astroglia: synergism with alpha-adrenergic receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 2036-2040.

- Fellin, T., Carmignoto, G. (2004). Neuron-to-astrocyte signaling in the brain represents a distinct multifunctional unit. *J. Physiol. (Lond)* 559, 3-15.
- Fellin, T., Pascual, O., Gobbo, S., Pozzan, T., Haydon, P.G., Carmignoto, G. (2004). Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors. *Neuron* 43, 729–743.
- Fernández de Sevilla, D., Buño, W. (2003). Presynaptic inhibition of Schaffer collateral synapses by stimulation of hippocampal cholinergic afferent fibres. *Eur. J. Neurosci.* 17, 555-558.
- Fiacco, T.A., McCarthy, K.D. (2004). Intracellular astrocyte calcium waves in situ increase the frequency of spontaneous AMPA receptor currents in CA1 pyramidal neurons. *J. Neurosci.* 24, 722-732.
- Gray R, Rajan A.S, Radcliffe K.A, Yakehiro M, y Dani J.A. (1996). Hippocampal synaptic transmission enhanced by low concentrations of nicotine. *Nature* 24, 713-716.
- Grosche, J., Matyash, V., Moller, T., Verkhratsky, A., Reichenbach, A., Kettenmann, H. (1999). Microdomains for neuron-glia interaction: parallel fiber signaling to Bergmann glial cells. *Nat. Neurosci.* 2, 139-143.
- Guthrie P.B., Knappenberger J, Segal M, Bennett M.V., Charles A.C., Kater S.B. (1999). ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves. *J. Neurosci.* 19, 520-528.
- Harris-White, M.E., Zanotti, S.A., Frautschy, S.A., Charles, A.C. (1998) Spiral intercellular calcium waves in hippocampal slice cultures. *J. Neurophysiol.* 79, 1045–1052.
- Haydon, P.G., Araque, A. (2002). Astrocytes as modulators of synaptic transmission. In *The Tripartite Synapse: Glia In Synaptic Transmission*, A. Volterra, P.J. Magistretti y P.G. Haydon, eds. (New York: Oxford University Press), pp. 185-198.
- Hille, B. (1992). *Ionic channels of excitable membranes*, Ed 2. Sunderland, MA: Sinauer.
- Hounsgaard J. (1978). Presynaptic inhibitory action of acetylcholine in area CA1 of the hippocampus. *Exp. Neurol.* 62, 787-797.
- Huang H.Y., Bergles D.E. (2004). Glutamate transporters bring competition to the synapse. *Curr. Opin. Neurobiol.* 14, 346-352.
- Innocenti, B., Parpura, V., Haydon, P.G. (2000). Imaging extracellular waves of glutamate during calcium signaling in cultured astrocytes. *J Neurosci.* 20: 1800–1808.

- Isaac, T., Hjelmstad, G.O., Nicoll, R.A., Malenka, R.C. (1996). Long-term potentiation at single fiber inputs to hippocampal CA1 pyramidal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *93*, 8710-8715.
- Kang, J., Jiang, L., Goldman, S.A., Nedergaard, M. (1998). Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nat. Neurosci.* *1*, 683-692.
- Kettenmann, H., Ransom, B.R. (2005). *Neuroglia*. 2<sup>nd</sup> Ed. Oxford University Press, New York.
- Kettenmann, H., Steinhäuser, C. (2005). Receptors for Neurotransmitters and Hormones, in: H. Kettenman, B. Ransom (Eds.), *Neuroglia*, Oxford University Press, New York, pp. 131–145.
- Klishin, A., Tsintsadze, T., Lozovaya, N., Krishtal, O. (1995). Latent N-methyl-D-aspartate receptors in the recurrent excitatory pathway between hippocampal CA1 pyramidal neurons: Ca<sup>2+</sup>-dependent activation by blocking A1 adenosine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *92*, 12431–12435.
- Kulik, A., Haentzsch, A., Luckermann, M., Reichelt, W., Ballanyi, K. (1999). Neuron-glia signaling via  $\alpha 1$  adrenoceptor-mediated Ca<sup>2+</sup> release in Bergmann glial cells *in situ*. *J. Neurosci.* *19*, 8401–8408.
- Latour, I., Gee, C.E., Robitaille, R., Lacaille, J.C. (2001). Differential mechanisms of Ca<sup>2+</sup> responses in glial cells evoked by exogenous and endogenous glutamate in rat hippocampus. *Hippocampus* *11*, 132-145.
- Lewis, P.R., Shute, C.C.D. (1967). The cholinergic limbic system: projections to hippocampal formation, medial cortex, nuclei of the ascending cholinergic reticular system, and the subfornical organ and supra-optic crest. *Brain* *90*, 521-540.
- Li, X-G., Somogyi, P., Ylinen, A., Buzsaki, G. (1994). The hippocampal CA3 network: an in vivo intracellular labeling study. *J. Comp. Neurol.* *339*, 181–208.
- Liu, Q.S., Xu, Q., Arcuino, G., Kang, J., Nedergaard, M. (2004). Astrocyte-mediated activation of neuronal kainate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *101*, 3172-3177.
- Maccaferri, G., McBain, C.J. (1995). Passive propagation of LTD to stratum oriens-alveus inhibitory neurons modulates the temporoammonic input to the hippocampal CA1 region. *Neuron* *15*, 137–145.
- Manns ID, Mainville L, Jones BE. (2001). Evidence for glutamate, in addition to acetylcholine and GABA, neurotransmitter synthesis in basal forebrain neurons projecting to the entorhinal cortex. *Neuroscience* *107*, 249-63.

- McCormick, D.A. (1998). Membrane properties and neurotransmitter actions. In *The synaptic organization of the brain*, G.M. Shepherd, ed. (New York: Oxford University Press), pp 37-75.
- Mennerick, S., Benz, A., Zorumski, C.F. (1996). Components of glial responses to exogenous and synaptic glutamate in rat hippocampal microcultures. *J. Neurosci.* *16*, 55-64.
- Mothet, J.P., Pollegioni, L., Ouanounou, G., Martineau, M., Fossier, P., Baux, G. (2005). Glutamate receptor activation triggers a calciumdependent and SNARE protein-dependent release of the gliotransmitter d-serine, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* *102*, 5606–5611.
- Nett, W.J., Oloff, S.H., McCarthy, K.D. (2002). Hippocampal astrocytes in situ exhibit calcium oscillations that occur independent of neuronal activity. *J. Neurophysiol.* *87*, 528-537.
- Newman, E.A. (2003). Glial cell inhibition of neurons by release of ATP. *J. Neurosci.* *23*, 1659-1666.
- Newman, E.A., Zahs, K.R. (1997). Calcium waves in retinal glial cells. *Science* *275*, 844–847.
- Newman, E.A., Zahs, K.R. (1998). Modulation of neuronal activity by glial cells in the retina. *J. Neurosci.* *18*, 4022-4028.
- Nicholls J.G., Martin A. R., Wallace B. G., Fuchs P. A. (2001). *From Neuron to Brain*. 4<sup>th</sup> Ed. (Sunderland, Massachussets: Sinauer Associates, Inc.).
- Orkand, R.K., Nicholls, J.G., Kuffler, S.W. (1966). Effect of nerve impulses on the membrane potential of glial cells in the central nervous system of amphibia, *J. Neurophysiol.* *29*, 788–806.
- Parpura, V., Haydon, P.G. (2000). Physiological astrocytic calcium levels stimulate glutamate release to modulate adjacent neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *97*, 8629-8634.
- Parri, H.R., Gould, T.M., Crunelli, V. (2001). Spontaneous astrocytic Ca<sup>2+</sup> oscillations in situ drive NMDAR-mediated neuronal excitation. *Nat. Neurosci.* *4*, 803-812.
- Pascual, O., Casper, K.B., Kubera, C., Zhang, J., Revilla-Sanchez R., Sul, J.Y., Takano, H., Moss, S.J., McCarthy, K., Haydon, P.G. (2005). Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks. *Science* *310*, 113-116.

- Pasti, L., Volterra, A., Pozzan, T., Carmignoto, G. (1997). Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes in situ. *J. Neurosci.* *17*, 7817-7830.
- Pasti, L., Zonta, M., Pozzan, T., Vicini, S., Carmignoto, G. (2001). Cytosolic calcium oscillations in astrocytes may regulate exocytotic release of glutamate. *J. Neurosci.* *21*, 477-484.
- Perea, G., Araque, A. (2002). Communication between astrocytes and neurons: a complex language. *J. Physiol. (Paris)* *96*, 199-207.
- Perea, G., Araque, A. (2005a). Properties of synaptically evoked astrocyte calcium signal reveal synaptic information processing by astrocytes. *J. Neurosci.* *25*, 2192–2203.
- Perea, G., Araque, A. (2005b). Glial calcium signaling and neuron–glia communication. *Cell Calcium* *38*, 375–382.
- Peters, O., Schipke, C.G., Hashimoto, Y., Kettenmann, H. (2003). Different mechanisms promote astrocyte Ca<sup>2+</sup> waves and spreading depression in the mouse neocortex. *J. Neurosci.* *23*, 9888–9896.
- Porter, J.T., McCarthy, K.D. (1996). Hippocampal astrocytes in situ respond to glutamate released from synaptic terminals. *J. Neurosci.* *16*, 5073-5081.
- Porter, J.T., McCarthy, K.D. (1997). Astrocytic neurotransmitter receptors in situ and in vivo. *Prog. Neurobiol.* *51*, 439-455.
- Ramón y Cajal, S. (1899). *Textura del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados*. Tomo I. N. Moya, Madrid.
- Reyes M, Stanton PK (1996) Induction of hippocampal long-term depression requires release of Ca<sup>2+</sup> from separate presynaptic and postsynaptic intracellular stores. *J Neurosci* *16* 5951–5960.
- Robitaille, R. (1998). Modulation of synaptic efficacy and synaptic depression by glial cells at the frog neuromuscular junction. *Neuron* *21*, 847-855.
- Schipke, C.G., Boucsein, C., Ohlemeyer, C., Kirchhoff, F., Kettenmann, H. (2002). Astrocyte Ca<sup>2+</sup> waves trigger responses in microglial cells in brain slices. *FASEB J.* *16*, 255–257.
- Sharma, G., Vijayaraghavan, S. (2001). Nicotinic cholinergic signaling in hippocampal astrocytes involves calcium-induced calcium release from intracellular stores. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *98*,4148–4153.

- Shelton, M.K., McCarthy, K.D. (1999). Mature hippocampal astrocytes exhibit functional metabotropic and ionotropic glutamate receptors in situ. *Glia* 26, 1-11.
- Shelton, M.K., McCarthy, K.D. (2000). Hippocampal astrocytes exhibit Ca<sup>2+</sup>-elevating muscarinic cholinergic and histaminergic receptors in situ. *J. Neurochem.* 74, 555-63.
- Smit, A.B., Syed, N.I., Schaap, D., van Minnen, J., Klumperman, J., Kits, K.S., Lodder, H., van der Schors, R.C., van Elk, R., Sorgedrager, B., Brejc, K., Sixma, T.K., Geraerts, W.P. (2001). A glia-derived acetylcholine-binding protein that modulates synaptic transmission. *Nature* 411, 261–268.
- Sontheimer, H.(1994). Voltage-dependent ion channels in glial cells. *Glia* 11, 156–172.
- Stevens, C.F., Wang, Y. (1995). Facilitation and depression at single central synapses. *Neuron* 14, 795-802.
- Sul, J.Y., Orosz, G., Givens, R.S., Haydon, P.G. (2004). Astrocytic connectivity in the hippocampus. *Neuron Glia Biology* 1, 3-11.
- Thesleff, S. (1980). Aminopyridines and synaptic transmission. *Neuroscience* 5, 413–1419.
- Tian G.F., Azmi H., Takano T., Xu Q., Peng W., Lin J., Oberheim N., Lou N., Wang X., Zielke H.R., Kang J., Nedergaard M. (2005). An astrocytic basis of epilepsy. *Nat. Med.* 11 973-981.
- Ventura, R., Harris, K.M. (1999). Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes, *J. Neurosci.* 19, 6897–6906.
- Verkhratsky, A., Orkand, R.K., Kettenmann, H. (1998). Glial calcium: homeostasis and signaling function. *Physiol. Rev.* 78, 99-141.
- Virchow, R. (1846). U<sup>ber</sup> das granulirte ansehn der wandungen der gerhirnventrikel, *Allg.Z. Psychiatr.* 3, 242.
- Volterra, A., Bezzi, P. (2002). Release of transmitters from glial cells. In *The Tripartite Synapse: Glia In Synaptic Transmission*, A. Volterra, P.J. Magistretti y P.G. Haydon, eds. (New York: Oxford University Press), pp. 164-184.
- Wadiche J.I, Amara S.G y Kavanaugh M.P.(1995). Ion fluxes associated with excitatory amino acid transport. *Neuron.* 15, 721-728.
- Wang, X., Lou, N., Xu, Q., Tian, G.F., Peng, W.G., Han, X., Kang, J., Takano, T., Nedergaard, M. (2006). Astrocytic Ca<sup>2+</sup> signaling evoked by sensory stimulation in vivo. *Nat. Neurosci.* 9, 816 – 823.

- Zhang, Q., Fukuda, M., Van Bockstaele, E., Pascual, O., Haydon, P.G. (2004). Synaptotagmin IV regulates glial glutamate release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *101*, 9441-9446.
- Zhang, J., Wang, H., Ye, C., Ge, W., Chen, Y., Jiang, Z., Wu, C., Poo, M., Duan, S. (2003). ATP released by astrocytes mediates glutamatergic activity-dependent heterosynaptic suppression. *Neuron* *40*, 971-982.
- Zonta M., Angulo M.C., Gobbo S., Rosengarten B., Hossmann K.A., Pozzan T., Carmignoto G. (2003) Neuron -to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat. Neurosci.* *6* 43–50.

## **VIII. SEPARATAS**



# Synaptically Released Acetylcholine Evokes $\text{Ca}^{2+}$ Elevations in Astrocytes in Hippocampal Slices

Alfonso Araque, Eduardo D. Martín, Gertrudis Perea, Jon I. Arellano, and Washington Buño

*Instituto Cajal, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid 28002, Spain*

Recent results have demonstrated the existence of bidirectional communication between glial cells and neurons. We investigated in brain slices whether rat hippocampal astrocytes respond to acetylcholine synaptically released by an extrinsic pathway. We stimulated the stratum oriens/alveus, which contains cholinergic afferents from the septum and diagonal band of Broca, and recorded whole-cell membrane currents and intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels of astrocytes located in the hippocampal stratum oriens. Nerve-fiber stimulation evoked a long-lasting inward current and increased the  $\text{Ca}^{2+}$  levels in astrocytes. Both astrocytic responses were abolished by tetrodotoxin or  $\text{Cd}^{2+}$  and were increased by 4-aminopyridine, indicating that the responses were attributable to synaptically released neurotransmitter. The inward current was inhibited by glutamate transporter antagonists, indicating that it was attributable to the electrogenic glutamate transporter activity. The synaptically evoked intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  elevations were not affected by glutamate receptor antagonists

but were abolished by atropine, indicating that they were mediated by muscarinic cholinergic receptors. Thapsigargin prevented the  $\text{Ca}^{2+}$  elevation but did not modify the inward current, indicating that the  $\text{Ca}^{2+}$  signal was attributable to intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization. These results indicate that hippocampal astrocytes respond to acetylcholine released by synaptic terminals. The synaptically released acetylcholine acts on muscarinic receptors, mobilizing  $\text{Ca}^{2+}$  from the intracellular stores. Different regions in the recorded astrocytes showed independent stimulus-induced  $\text{Ca}^{2+}$  variations, suggesting the existence of subcellular domains in the astrocytic responses evoked by the synaptic cholinergic activity. Therefore, our results show the existence of cholinergic neuron–astrocyte signaling and suggest that astrocytes are a target of axonal inputs from different brain areas.

**Key words:** intracellular calcium; astrocytes; muscarinic cholinergic receptors; glutamate transporters; hippocampal slices; synaptic transmitter release

Astrocytes possess a form of excitability based on intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  variations (Cornell-Bell et al., 1990; Charles et al., 1991; Newman and Zahs, 1997) that can be triggered by synaptically released glutamate (Dani et al., 1992; Porter and McCarthy, 1996; Pasti et al., 1997). Furthermore, physiological astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  elevations evoke  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent glutamate release from astrocytes that signal to adjacent neurons (Parpura et al., 1994; Pasti et al., 1997; Araque et al., 1998a,b, 2000; Bezzi et al., 1998; Parpura and Haydon, 2000), modulating the neuronal excitability (Araque et al., 1998a; Newman and Zahs, 1998) and synaptic transmission (Araque et al., 1998a,b; Kang et al., 1998). Neuron–glia interaction has also been reported in the peripheral nervous system, in which perisynaptic Schwann cells respond to neurotransmitter release and modulate synaptic transmission (Robitaille, 1998; Rochon et al., 2001). These results suggest the existence of bidirectional communication between astrocytes and neurons in which glutamate plays a pivotal role as the signal that mediates this new form of communication in the nervous system (Carmignoto, 2000; Araque et al., 2001; Haydon, 2001).

Astrocytes express many neurotransmitter receptors coupled to

intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization (Verkhratsky and Kettenmann, 1996; Porter and McCarthy, 1997). Studies using brain slices have demonstrated that several neurotransmitters may regulate  $\text{Ca}^{2+}$  levels of astrocytes (Porter and McCarthy, 1996; Pasti et al., 1997; Kang et al., 1998; Kulik et al., 1999; Shelton and McCarthy, 1999, 2000). Nevertheless, the activation of these receptors by synaptically released neurotransmitters has not been fully determined. Indeed, most of the *in situ* studies have reported that glutamate is the neurotransmitter that controls astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  (Porter and McCarthy, 1996; Pasti et al., 1997). Kang et al. (1998) showed that stimulation of hippocampal interneurons can elevate astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  levels through activation of  $\text{GABA}_B$  receptors. Bergmann glial  $\text{Ca}^{2+}$  can be regulated by stimulation of either the molecular- or granular-cell layer of the cerebellum through  $\alpha_1$ -adrenoreceptor activation (Kulik et al., 1999). However, whether other receptors can be activated by synaptically released neurotransmitters and, therefore, whether they participate in the bidirectional communication between astrocytes and neurons is unknown.

Our present knowledge of bidirectional communication between astrocytes and neurons indicates that astrocytes are activated by neurotransmitters released from immediately adjacent synapses and from axon terminals of neurons belonging to the local circuit in which the astrocytes are immersed (for review, see Araque et al., 1999). However, whether extrinsic axons are able to act on target astrocytes in a different brain area remains unknown.

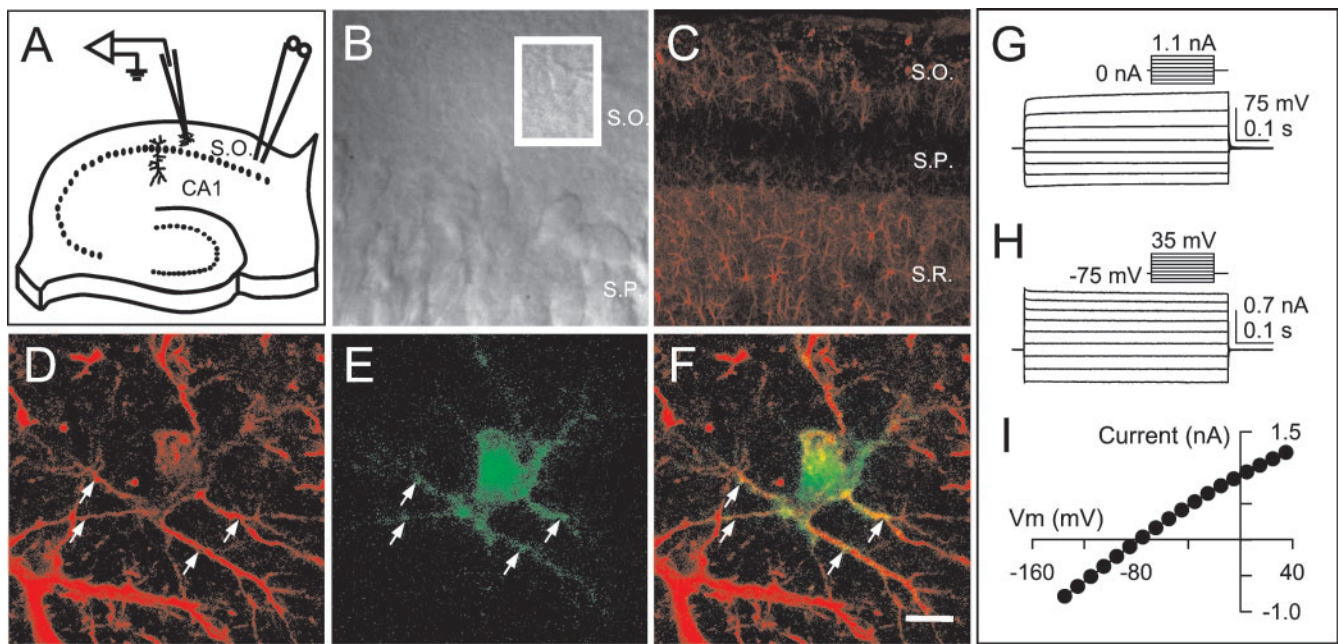
We have investigated whether an extrinsic cholinergic pathway of the hippocampus can signal to hippocampal astrocytes regulating their intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ . Using electrophysiological and

Received Nov. 30, 2001; revised Jan. 7, 2002; accepted Jan. 8, 2002.

This work was supported by Comunidad Autónoma de Madrid (CAM) Grant 08.5/00361998, Dirección General de Investigación Científica y Técnica (DGICYT)/Ministerio de Educación y Cultura (MEC)/Spain Grant PM98-0113, and Ministerio de Ciencia y Tecnología Grant BFI2001-0206. E.D.M. was a CAM postdoctoral fellow. We thank Dr. Philip G. Haydon for his valuable suggestions and comments on the manuscript. We thank Dr. Javier De Felipe (Grant PM99-0105 from DGICYT/MEC/Spain) for the generous gift of antibodies and help with immunocytochemical experiments.

Correspondence should be addressed to Dr. Alfonso Araque, Instituto Cajal, Doctor Arce 37, Madrid 28002, Spain. E-mail: araque@cajal.csic.es.

Copyright © 2002 Society for Neuroscience 0270-6474/02/222443-08\$15.00/0



**Figure 1.** Morphological, immunocytochemical, and electrophysiological identification of astrocytes in the hippocampal stratum oriens is shown. *A*, Schematic drawing of the experimental arrangement showing the position of the stimulating (*right*) and recording (*left*) electrodes in the hippocampal slice preparation. *B*, Infrared differential interference contrast image showing the hippocampal pyramidal layer (*bottom*) and the recorded astrocyte (*top*) (note the recording pipette on the right side of the astrocyte). The fluorescence intensity was collected by the photomultiplier tube from the window depicted by the *box* around the astrocyte. *C*, Fluorescence image of the GFAP-stained CA1 hippocampus. *D*, *E*, Fluorescence images of GFAP-stained cells and a fluo-3-filled cell, respectively, obtained by laser-scanning confocal microscopy constructed from a stack of 15 successive images (1.5  $\mu\text{m}$  deep). *F*, Combination of the images shown in *D* and *E*, showing that the fluo-3-filled cell was GFAP-positive. *Arrows* in *D–F* indicate some dual-labeled processes. *G*, Current-clamp recordings of the astrocytic membrane potential variations evoked by hyperpolarizing and depolarizing current pulses. *H*, Whole-cell currents evoked by hyperpolarizing and depolarizing voltage pulses. *I*, Current–voltage relationship of the steady-state membrane currents. *S.O.*, Stratum oriens; *S.P.*, stratum pyramidale; *S.R.*, stratum radiatum. Scale bars: *B*, 15  $\mu\text{m}$ ; *C*, 75  $\mu\text{m}$ ; *D–F*, 8  $\mu\text{m}$ .

single-cell fluorescence photometric  $\text{Ca}^{2+}$  techniques in hippocampal slices, we have found that stimulation of the stratum oriens/alveus of the hippocampus, which contains cholinergic afferents from the septum and diagonal band of Broca, increased the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  of astrocytes in the stratum oriens through activation of muscarinic cholinergic receptors (mAChRs). These results demonstrate that astrocytes are a target of extrinsic axons arising from a different brain area, adding a new element of complexity to the signaling pathways in the nervous system.

## MATERIALS AND METHODS

**Hippocampal slice preparation.** Acute hippocampal slices were obtained as described previously (Borde et al., 1995). Briefly, Wistar rats (12–17 d of age) were decapitated; brains were removed rapidly and placed in ice-cold artificial CSF (ACSF) gassed with 95%  $\text{O}_2$  and 5%  $\text{CO}_2$ , pH 7.3. Brain slices (350–450  $\mu\text{m}$  thick) were cut with a Vibratome (Pelco 101, Series 1000; Vibratome, St. Louis, MO) and incubated for >1 hr at room temperature (21–24°C) in ACSF. The ACSF contained (in mM): 124 NaCl, 2.69 KCl, 1.25  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2  $\text{MgSO}_4$ , 26  $\text{NaHCO}_3$ , 2  $\text{CaCl}_2$ , and 10 glucose; it was gassed with 95%  $\text{O}_2$  and 5%  $\text{CO}_2$ . Because astrocytic responses were enhanced by 4-aminopyridine (4-AP), in some cases the control ACSF contained 100  $\mu\text{M}$  4-AP. Slices were then transferred to an immersion recording chamber and superfused with gassed ACSF. Cells were visualized under an Olympus (Tokyo, Japan) BX50WI microscope equipped with infrared and differential interference contrast imaging devices, and with a 40 $\times$  water immersion objective.

**Electrophysiology.** Simultaneous fluorescence photometric  $\text{Ca}^{2+}$  measurements (see below) and electrophysiological recordings from astrocytes located in the stratum oriens of the CA1 hippocampal region were made using the whole-cell configuration of the patch-clamp technique. Patch electrodes were fabricated from borosilicate glass capillaries and had resistances of 6–10 M $\Omega$  when filled with the internal solution that contained (in mM): 100  $\text{KMeSO}_4$ , 50 KCl, 10 HEPES, and 4 ATP– $\text{Na}_2$ , pH 7.3. Recordings were obtained with an Axoclamp-2A amplifier (Axon

Instruments, Foster City, CA) either in the current-clamp bridge mode or the continuous single-electrode voltage-clamp mode. Fast and slow whole-cell capacitances were neutralized and series resistance was compensated (~70%). In voltage-clamp experiments, the membrane potential was held at  $V_r$ . Signals were fed to a Pentium-based personal computer through a DigiData 1320 interface board (Axon Instruments). pClamp 8 software (Axon Instruments) was used for stimulus generations and for data display, acquisition, and storage.

Astrocytes were identified according to the following morphological and electrophysiological criteria (Pasti et al., 1997; Bergles and Jahr, 1997, 1998; Bezzi et al., 1998; Bergles et al., 2000): small round soma (<15  $\mu\text{m}$ ) without thick processes (Fig. 1*B*), numerous thin radiating processes (detected after loading the cell with the fluorescent indicator) (Fig. 1*E*), high resting membrane potential ( $V_r = -73 \pm 1$  mV;  $n = 144$ ), high membrane conductance ( $22 \pm 2$  nS;  $n = 144$ ), and absence of action potentials (Fig. 1*G–I*). In some cases, the recorded fluo-3-filled astrocytes were later studied immunocytochemically and examined using laser-scanning confocal microscopy (see below).

Experiments were performed at room temperature (21–24°C). All data are expressed as means  $\pm$  SEM. Statistical differences were established using the Student *t* test.

**Measurement of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  variations.**  $\text{Ca}^{2+}$  levels in single astrocytes were monitored by fluorescence microscopy using the  $\text{Ca}^{2+}$  indicator fluo-3. Patch pipettes were filled with the internal solution containing 10–50  $\mu\text{M}$  fluo-3 (Molecular Probes, Eugene, OR). Cells were illuminated with a xenon lamp at 490 nm using a monochromator Polychrome II (T.I.L.L. Photonics, Planegg, Germany). Fluorescence intensity was collected by a photomultiplier tube (model R928; Hamamatsu, Bridgewater, NJ) from a variable rectangular window (side: 25–50  $\mu\text{m}$ ) containing the recorded cell. Cells were illuminated during 20–200 msec every 500–1000 msec and the fluorescence signal collected was integrated using the T.I.L.L. Photonics photometry system.  $\text{Ca}^{2+}$  variations were estimated as changes of the fluorescence signal over baseline ( $\Delta F/F_0$ ) after background subtraction. Astrocytes were considered to respond to the stimulation when the fluorescence signal increased two times above the SD of the basal signal.

**$\text{Ca}^{2+}$  imaging.** In some cases, fluo-3-filled astrocytes were imaged using a CCD camera (SPOT RT Monochrome; Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI) attached to the Olympus microscope. Quantitative epifluorescence measurements were made using the ImageJ public domain software (developed at the National Institutes of Health, Bethesda, MD).  $\text{Ca}^{2+}$  variations were estimated as  $\Delta F/F_0$  after background subtraction; regions of interest (ROI) were considered to respond to the stimulation when  $\Delta F/F_0$  increased  $>5\%$  for at least two consecutive images.

**Immunocytochemistry.** Recorded cells were initially identified according to their morphological and electrophysiological properties (Fig. 1). After recording, some cells were immunocytochemically studied using a mouse monoclonal antibody against glial fibrillary acidic protein (GFAP) (dilution 1:400; Sigma). Slices were fixed overnight with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer at  $4^\circ\text{C}$ , incubated in GFAP antibody in 0.25% Triton X-100 with 3% normal goat serum in phosphate buffer. GFAP immunoreactivity was visualized using an Alexa 594-conjugated goat secondary antibody (1:1000; Molecular Probes). After washing, slices were mounted in glycerol (50% in phosphate buffer) and examined using laser-scanning confocal microscopy. Recorded cells were identified as astrocytes according to their dual label with fluo-3 and the GFAP antibody. In some cases, control experiments were performed by immunocytochemical processing in the absence of primary antibody; no GFAP-positive staining of fluo-3-filled astrocytes was observed.

**Stimulation.** Bipolar nichrome wire ( $80\ \mu\text{m}$ ) electrodes were connected to a stimulator and isolation unit (Grass S88; Grass Instruments, West Warwick, RI) and placed under visual guidance in the stratum oriens/aleveus near the subiculum area, which contains cholinergic afferents from the diagonal band of Broca and the septum (Lewis and Shute, 1967; Amaral and Witter, 1995). Trains of stimuli at 30 Hz during 5 sec were delivered at  $0.013\ \text{sec}^{-1}$ , unless stated otherwise, and three to five responses were averaged.

**Ionophoresis.** ACh was ionophoretically delivered from a micropipette (5–15 M $\Omega$ ) filled with 0.5 M ACh (in ACSF, pH 6) by 1- to 5-sec-duration current pulses (Microiontophoresis Dual Current Pulse Generator 260; World Precision Instruments, Sarasota, FL). Likewise, glutamate (0.7 M in ACSF, pH 7.5–8) was ionophoretically applied.

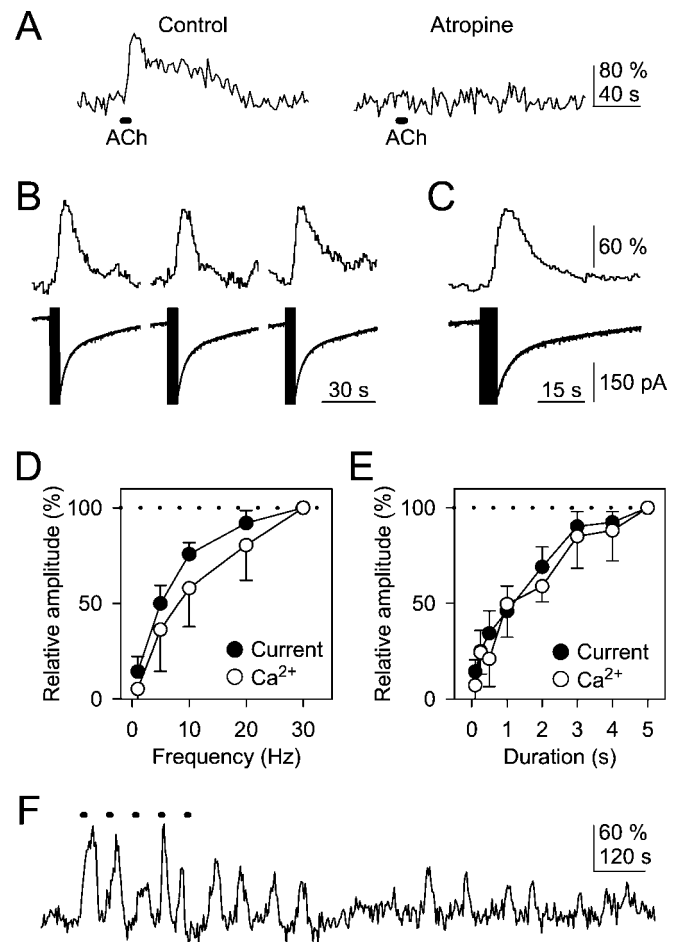
**Drugs.** Thapsigargin, *L-trans*-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate (t-PDC), (*S*)- $\alpha$ -methyl-4-carboxyphenylglycine (MCPG), 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX), and *D*-(-)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (AP-5) were purchased from Tocris Cookson (Bristol, UK); dihydrokainate (DHK) was purchased from Ocean Produce International (Shelburne, Canada). All other drugs were purchased from Sigma.

## RESULTS

Simultaneous intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels and whole-cell currents of morphologically and electrophysiologically identified astrocytes in the stratum oriens were recorded (Fig. 1). It is well established that astrocytes in culture express receptors for numerous neurotransmitters, including ACh (Verkhatsky and Kettenmann, 1996; Porter and McCarthy, 1997). Furthermore, it has been shown that astrocytes located in the hippocampal stratum radiatum region respond to perfused ACh with intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  variations (Shelton and McCarthy, 2000). However, it is not known whether astrocytes located in the stratum oriens, a CA1 hippocampal region that receives abundant cholinergic projections (Amaral and Witter, 1995), respond to ACh.

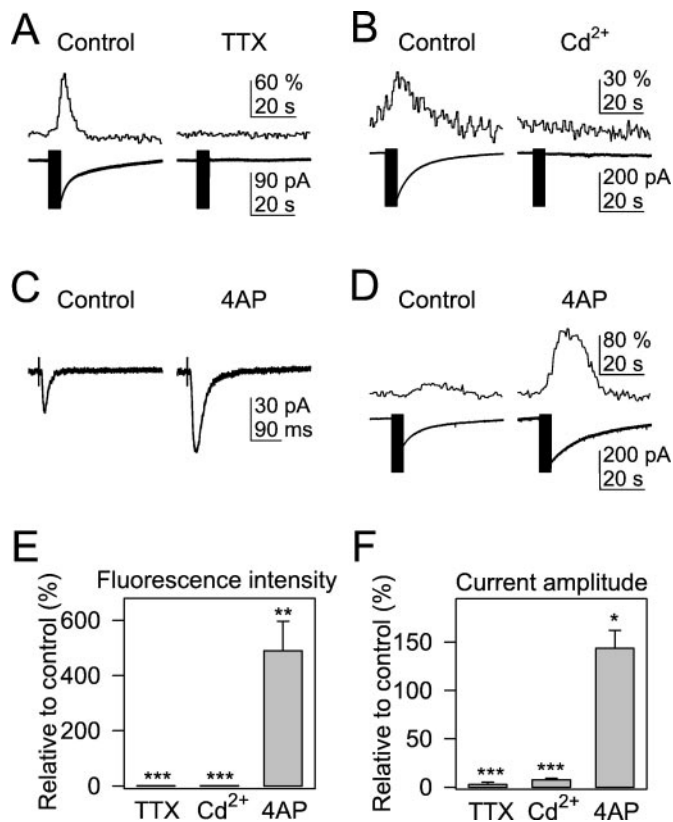
Therefore, we investigated whether stratum oriens astrocytes also responded to exogenously applied ACh. Ionophoretic application of ACh increased the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels in eight of eight recorded astrocytes. This response was inhibited by  $10\ \mu\text{M}$  atropine, an mAChR antagonist (to  $14 \pm 14\%$  from control values;  $n = 3$ ) (Fig. 2*A*), indicating that the ACh-induced  $\text{Ca}^{2+}$  increase was mediated by mAChR activation.

Electrical stimulation of the stratum oriens/aleveus of the hippocampus evoked a long-lasting inward current in astrocytes (the mean amplitude from a representative sample of 68 astrocytes was  $-115.7 \pm 13.3\ \text{pA}$ ) (Fig. 2*B,C*). Furthermore,  $\sim 70\%$  of the



**Figure 2.** Astrocytic responses evoked by ionophoretically applied ACh and nerve-fiber stimulation are shown. *A*, Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels estimated from the fluorescence intensity recorded from a single astrocyte filled with the  $\text{Ca}^{2+}$  indicator fluo-3. ACh, ionophoretically delivered from a micropipette (0.5 M, 5 sec; *bottom line*), increased the astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  levels in control conditions (*left trace*). In the presence of atropine, ionophoretic application of ACh did not modify the  $\text{Ca}^{2+}$  levels (*right trace*). *B*, Representative astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  levels (*top traces*) and whole-cell membrane currents (*bottom traces*) elicited by nerve-fiber stimulation (30 Hz, 5 sec; as in all other figures). Three consecutive responses were evoked at  $0.013\ \text{sec}^{-1}$ . The vertical black columns on the current traces correspond to the stimulus artifact (as in all other figures). *C*, Averaged responses of the traces shown in *B*. *D*, *E*, Dependence of the maximum current amplitude (*solid circles*) and  $\text{Ca}^{2+}$  increase (*open circles*) on the stimulus frequency and duration, respectively. Values are relative to the responses evoked by a stimulus at 30 Hz for 5 sec (*dotted lines*). Each point represents mean values from at least four astrocytes. *F*, In 15% of the recorded astrocytes, repetitive nerve-fiber stimulation (*dotted line*) evoked intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  elevations that were followed by intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations that persisted for several seconds after cessation of the stimulus.

astrocytes (54 from a representative sample of 79 astrocytes) responded to the stimulation with transient, long-lasting elevations in their intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels. Figure 2*D,E* shows the dependence of both astrocytic responses on the frequency and duration of the stimulus. In addition, in 12 of 79 astrocytes, nerve-fiber stimulation evoked repetitive intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations that persisted for several seconds after cessation of the stimulus (Fig. 2*F*). The present work was focused on the transient intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  responses; the occasional subsequent oscillations were not considered further.



**Figure 3.** Astrocytic responses are evoked by synaptically released neurotransmitter. *A, B*, Astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  levels (top traces) and whole-cell membrane currents (bottom traces) evoked by nerve-fiber stimulation in control conditions and in the presence of 1  $\mu\text{M}$  TTX and 100  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$ , respectively. *C*, Averaged ( $n = 15$ ) EPSCs evoked by Schaffer collateral–commissural stimulation and recorded from CA1 pyramidal neurons in controls and in the presence of 100  $\mu\text{M}$  4-AP. *D*, Astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  levels (top traces) and whole-cell membrane currents (bottom traces) evoked by nerve-fiber stimulation in control conditions and after superfusion with 100  $\mu\text{M}$  4-AP. *E, F*, Relative changes from control recordings of the fluorescence intensity and membrane current amplitudes, respectively, evoked by nerve-fiber stimulation in the presence of 1  $\mu\text{M}$  TTX ( $n = 4$ ), 100  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  ( $n = 6$ ), and 100  $\mu\text{M}$  4-AP ( $n = 14$ ). Significant differences were established by the Student *t* test at \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$ .

### Astrocytic responses are evoked by synaptically released neurotransmitter

The stimulus-induced  $\text{Ca}^{2+}$  elevations and inward currents were abolished by the sodium channel antagonist tetrodotoxin (TTX) (1  $\mu\text{M}$ ), which prevents action-potential generation, indicating that both responses depended on neuronal activity ( $n = 4$ ) (Fig. 3*A*). We also tested whether these responses were attributable to synaptic transmitter release by using pharmacological tools that modulate synaptic transmission.

Evoked synaptic transmitter release requires  $\text{Ca}^{2+}$  influx through voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels that can be blocked by extracellular  $\text{Cd}^{2+}$  (Hille, 1992). The astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  variations and the inward current evoked by nerve-fiber stimulation were abolished by 100  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  (Fig. 3*B*). 4-AP is a potassium-channel blocker that enhances the release of neurotransmitter from nerve terminals in hippocampal slices (Thesleff, 1980). To confirm that 4-AP increases synaptic transmitter release, we recorded the EPSCs evoked by Schaffer collateral–commissural stimulation in CA1 pyramidal neurons. The amplitude of the EPSCs was con-

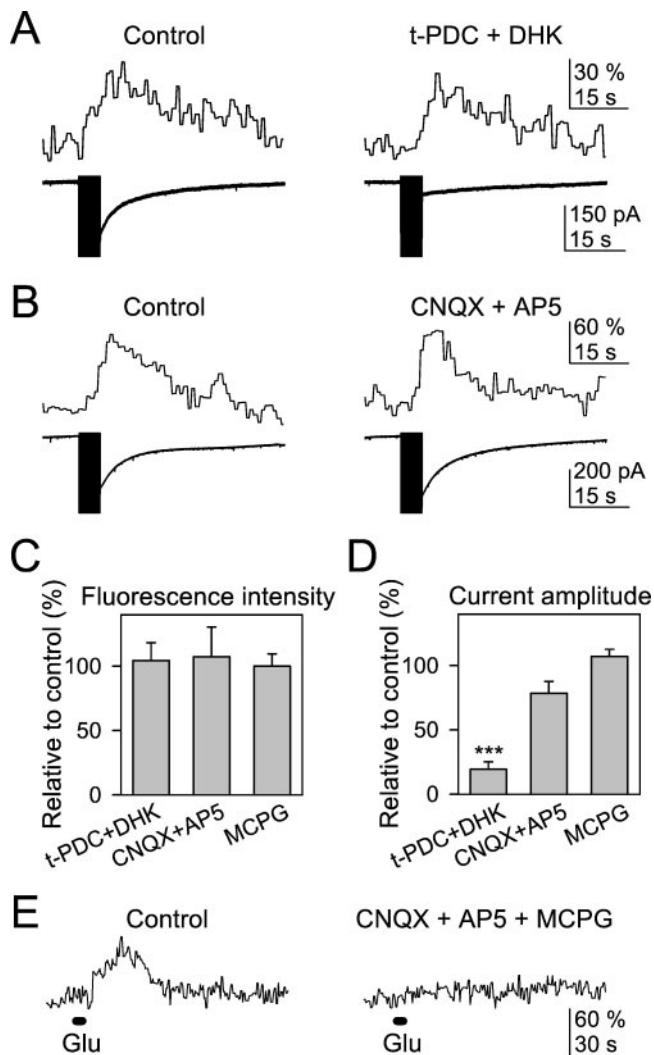
sistently increased by 100  $\mu\text{M}$  4-AP in all cells tested ( $n = 12$ ) (Fig. 3*C*). The astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  elevations evoked by nerve-fiber stimulation were also increased in the presence of 100  $\mu\text{M}$  4-AP ( $n = 14$ ) (Fig. 3*D,E*). Furthermore, the amplitude of the inward current was also increased by 4-AP ( $n = 14$ ) (Fig. 3*D,F*). These results indicate that the astrocytic responses are evoked by synaptic activity and suggest that neurotransmitter release from synaptic terminals is required to elicit these astrocytic responses.

### The astrocytic inward current is mediated by activation of electrogenic glutamate transporters

Astrocytes express high levels of two types of glutamate transporters (GLT-1 and GLAST) responsible for the clearance of glutamate from the extracellular space (Mennerick et al., 1996; Bergles and Jahr, 1997, 1998). It has been shown that glutamate released from Schaffer collateral–commissural synaptic terminals can activate nearby hippocampal astrocytes located in the stratum radiatum of the CA1 region (Bergles and Jahr, 1997, 1998). The activation of these glutamate transporters leads to the electrogenic uptake of glutamate into the astrocyte, which generates a net inward current across the membrane. In addition to cholinergic axons, the stratum oriens/alveus also contains glutamatergic axons (e.g., recurrent collaterals from CA1 pyramidal neurons) that make synaptic contacts in the stratum oriens with CA1 pyramidal neurons and interneurons (Ramón y Cajal, 1904; Klishin et al., 1995; Maccaferri and McBain, 1995). Therefore, it is feasible to think that stimulation of these axons could induce the activation of astrocytic glutamate transporters.

To test this hypothesis, we asked whether the astrocytic inward current evoked by nerve-fiber stimulation was affected by glutamate transporter inhibitors (Fig. 4*A*). After control recordings, slices were superfused with 1 mM DHK, a selective nontransportable antagonist of GLT-1 transporters, plus 0.3 mM t-PDC, a nonselective competitive uptake inhibitor. Although the glutamate transporter antagonists did not modify the amplitude of the stimulation-induced  $\text{Ca}^{2+}$  elevations, they reduced the amplitude of the inward current (to  $19.3 \pm 5.8\%$  from control values;  $n = 4$ ) (Fig. 4*A,C,D*). Furthermore, the replacement of the extracellular sodium by lithium, which inhibits the sodium-dependent glutamate uptake, significantly reduced the amplitude of the inward current (to  $11.2 \pm 5.3\%$  from control values;  $n = 7$ ;  $p < 0.001$ ; data not shown). The remaining residual current observed after glutamate transporter blockade was not significantly changed by cholinergic or glutamatergic receptor antagonists (data not shown). Indeed, after inhibition of the glutamate transporters with DHK plus t-PDC, the relative amplitude of the residual current obtained from control (DHK plus t-PDC) values was  $92.0 \pm 7.4\%$  ( $n = 6$ ) in 50 nM methyllycaconitine (MLA) plus 50  $\mu\text{M}$  atropine, and  $89.3 \pm 10.9\%$  ( $n = 5$ ) in 20  $\mu\text{M}$  CNQX plus 50  $\mu\text{M}$  AP-5 plus 0.8 mM MCPG. These results suggest that the residual current recorded after glutamate uptake blockade is not mediated by cholinergic or glutamatergic receptor activation; rather, it is probably attributable to the extracellular  $\text{K}^{+}$  accumulation during neuronal activity, as described previously in stratum radiatum astrocytes (Bergles and Jahr, 1997, 1998).

Together, these results indicate that the astrocytic inward current was primarily mediated by activation of electrogenic glutamate transporters, suggesting that astrocytes located in the stratum oriens are involved in the clearance of glutamate from the synaptic cleft. Furthermore, the differential sensitivity of the inward current and the  $\text{Ca}^{2+}$  elevation to glutamate transporter



**Figure 4.** Participation of synaptically released glutamate in the astrocytic responses. *A, B*, Astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  levels (*top traces*) and whole-cell membrane currents (*bottom traces*) evoked by nerve-fiber stimulation in control conditions and in the presence of 0.3 mM t-PDC plus 1 mM DHK and 20  $\mu\text{M}$  CNQX plus 50  $\mu\text{M}$  AP-5, respectively. *C, D*, Relative changes from control recordings of the fluorescence intensity and membrane current amplitudes, respectively, evoked by nerve-fiber stimulation in the presence of t-PDC plus DHK ( $n = 4$ ), CNQX plus AP-5 ( $n = 6$ ), and 0.8 mM MCPG ( $n = 6$ ). Significant differences were established by the Student's *t* test at  $***p < 0.001$ . *E*, Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  variations evoked by glutamate ionophoresis estimated from the fluorescence intensity recorded from a single astrocyte filled with fluo-3. The astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  elevations evoked in control conditions (*left trace*) by glutamate ionophoresis (0.7 M; 5 sec; *bottom line*) were prevented in the presence of glutamate receptor antagonists (20  $\mu\text{M}$  CNQX, 50  $\mu\text{M}$  AP-5 plus 0.8 mM MCPG) (*right trace*).

inhibitors suggest that different mechanisms underlie both phenomena.

#### Astrocytic $\text{Ca}^{2+}$ variations are not mediated by activation of glutamate receptors

It has been shown in hippocampal slices that stimulation of glutamatergic Schaffer collaterals evokes  $\text{Ca}^{2+}$  elevations in astrocytes located in the stratum radiatum of the CA1 area (Porter and McCarthy, 1996; Pasti et al., 1997; Bezzi et al., 1998). These  $\text{Ca}^{2+}$  elevations are mediated through activation of metabotropic glutamate receptors (mGluRs), because they are abolished by the

mGluR antagonist MCPG (Porter and McCarthy, 1996; Pasti et al., 1997) and are mimicked by the mGluR agonist *trans*-( $\pm$ )-1-amino-1,3-cyclopentanedicarboxylic acid (Pasti et al., 1997). Moreover, Bergles et al. (2000) have shown that Schaffer collateral–commissural stimulation evokes AMPA-receptor-mediated currents in stratum radiatum oligodendrocyte precursor cells.

Therefore, we investigated whether the  $\text{Ca}^{2+}$  elevations in stratum oriens astrocytes evoked by stratum oriens/alveus stimulation were similarly mediated by the activation of glutamate receptors. The inward current and the  $\text{Ca}^{2+}$  elevations were not significantly affected by either the mGluR antagonist MCPG (0.8 mM) or the ionotropic glutamate receptor antagonists CNQX (20  $\mu\text{M}$ ) and D-AP-5 (50  $\mu\text{M}$ ) (Fig. 4*B–D*), indicating that the astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  elevations induced by nerve-fiber stimulation were not mediated by activation of glutamate receptors.

We also tested the presence of functional glutamate receptors in stratum oriens astrocytes. Ionophoretic application of glutamate increased the astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  levels (eight of nine astrocytes; cf. Shelton and McCarthy, 1999) (Fig. 4*E*), indicating that the insensitivity of the astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  signal to glutamate antagonists was not attributable to the absence of functional glutamate receptors.

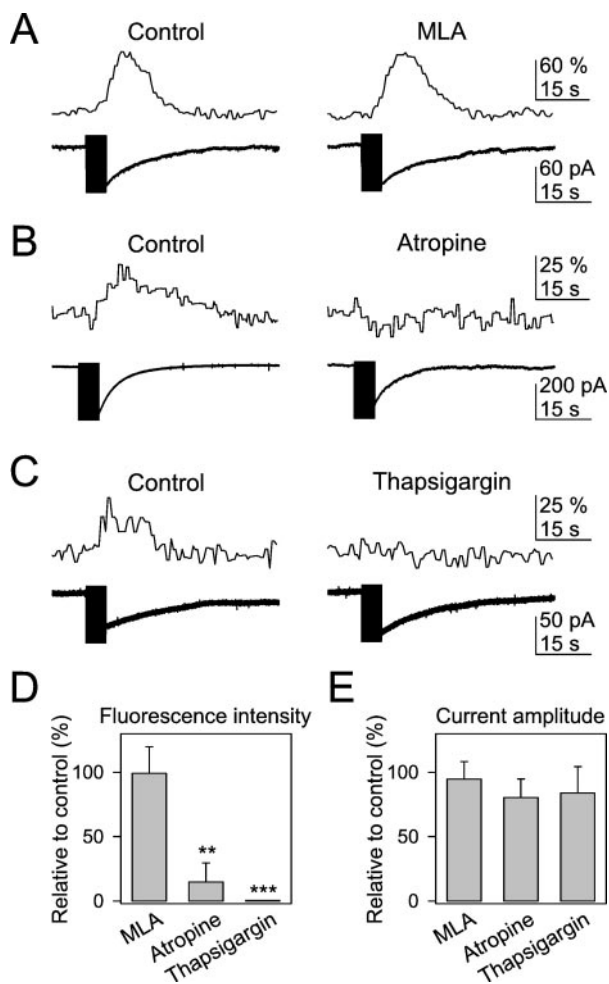
#### Astrocytic $\text{Ca}^{2+}$ variations are mediated by activation of mAChRs

The stratum oriens/alveus of the hippocampus contains cholinergic afferents projecting from the septum and diagonal band of Broca to the CA1 area that make synaptic contacts in the stratum oriens (Lewis and Shute, 1967; Amaral and Witter, 1995). Therefore, we investigated the involvement of cholinergic receptors on the stimulus-induced astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  elevations.

Cultured hippocampal astrocytes express nicotinic cholinergic receptors (nAChRs), which contain the  $\alpha_7$  subunit and increase the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  through a  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$ -release mechanism (Sharma and Vijayaraghavan, 2001), but their functional expression *in situ* remains unknown. Furthermore, synaptic activation of nAChRs has been shown in molluscan glial cells (Smit et al., 2001). To investigate the participation of nAChRs, we tested the sensitivity of the nerve-fiber-evoked astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  responses to 50 nM MLA, an antagonist of the  $\alpha_7$ -containing nAChRs. Both the astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  elevations and the inward current were not significantly affected by 50 nM MLA (Fig. 5*A, D, E*).

We have shown that functional mAChRs are expressed by stratum oriens astrocytes, and it has been reported that mAChRs can increase intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels (Fig. 2*A*) (Shelton and McCarthy, 2000). Therefore, we tested the effects of atropine on the nerve-fiber-evoked astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  responses (Fig. 5*B*). The  $\text{Ca}^{2+}$  elevations were reduced by 50  $\mu\text{M}$  atropine (to  $12.1 \pm 8.2\%$  from control values;  $n = 8$ ) (Fig. 5*B, D*). However, the inward current was not significantly affected (Fig. 5*D*), suggesting that the  $\text{Ca}^{2+}$  signal reduction was not attributable to a reduction in synaptic activity. Therefore, these results indicate that the astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  elevations induced by stratum oriens/alveus stimulation were mediated through the activation of mAChRs.

mAChRs are coupled to G-proteins, and their activation leads to  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization from the internal stores, thus elevating the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels (Porter and McCarthy, 1997; Shelton and McCarthy, 2000). We tested whether intact intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores are required for the astrocytic responses by perfusing the slices with thapsigargin, which depletes the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores by inhibiting the  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase (Charles et al., 1993;



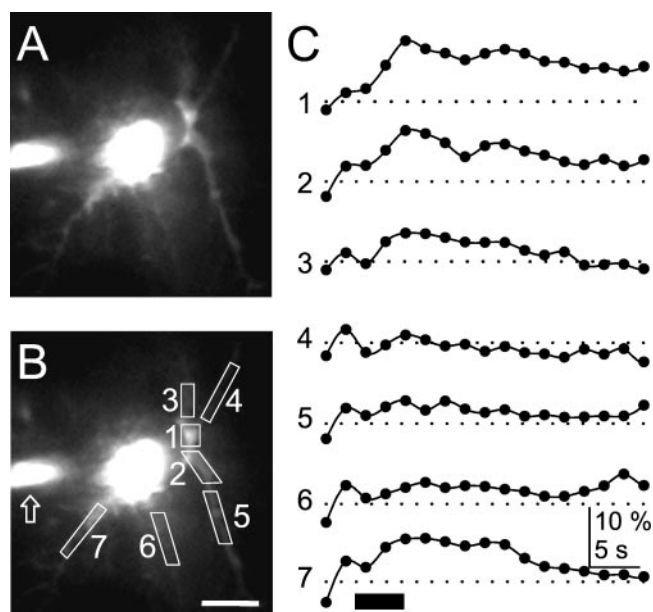
**Figure 5.** Astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  elevations are mediated by activation of mAChRs that mobilize  $\text{Ca}^{2+}$  from the intracellular stores. *A–C*, Astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  levels (top traces) and whole-cell membrane currents (bottom traces) evoked by nerve-fiber stimulation in control conditions and in the presence of 50 nM MLA, 50  $\mu\text{M}$  atropine, and 1  $\mu\text{M}$  thapsigargin, respectively. *D, E*, Relative changes from control recordings of the fluorescence intensity and membrane current amplitudes, respectively, evoked by nerve-fiber stimulation in the presence of 50 nM MLA ( $n = 6$ ), 50  $\mu\text{M}$  atropine ( $n = 8$ ), and 1  $\mu\text{M}$  thapsigargin ( $n = 5$ ). Significant differences were established by the Student's *t* test at \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$ .

Araque et al., 1998a). After control recordings, the slices were perfused with 1  $\mu\text{M}$  thapsigargin for 30–45 min. The stimulus-induced inward currents were not significantly affected by thapsigargin (Fig. 5*C,E*), suggesting that thapsigargin did not modify synaptic transmitter release (cf. Reyes and Stanton, 1996). In contrast, the astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  elevations were abolished by thapsigargin (Fig. 5*C,D*), indicating that the astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  elevations require the presence of intact intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores.

Together, these results indicate that the stimulus-induced intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  elevations in stratum oriens astrocytes are attributable to synaptically released ACh acting on mAChRs that mobilize intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ .

#### Astrocytic $\text{Ca}^{2+}$ variations are spatially defined

Discrete cellular microdomains that respond differentially to synaptically released neurotransmitters have been demonstrated in astrocytes and Bergmann glia (Pasti et al., 1997; Grosche et al., 1999). Therefore, we investigated the spatial cellular distribution



**Figure 6.** Nerve-fiber stimulation evokes local astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  elevations. *A, B*, Fluorescence images of an astrocyte filled with the  $\text{Ca}^{2+}$  indicator fluo-3 included in the patch pipette (left side of the astrocyte; arrow in *B*). White boxes in *B* indicate ROI (15–20  $\mu\text{m}^2$ ) in which fluorescence signals were measured. Scale bar, 9  $\mu\text{m}$ . *C*, Normalized fluorescence intensity in regions shown in *B*. Nerve stimulation at 30 Hz for 5 sec is indicated by the black box in the bottom trace. Dotted lines indicate zero values estimated from the averaged resting values recorded before stimulation. While regions 1, 2, 3, and 7 increased their  $\text{Ca}^{2+}$  signal after nerve stimulation ( $\Delta F/F_0 > 5\%$ ), regions 4–6 did not respond to stimulation.

of the cholinergic-mediated neuron–astrocyte signal. The intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels of fluo-3-filled astrocytes were imaged (Fig. 6*A*). Several ROI of 15–20  $\mu\text{m}^2$ , including different conspicuous processes, were defined (Fig. 6*B*). The stimulus-induced  $\text{Ca}^{2+}$  variations in those regions were analyzed and the ROI were considered to respond to the stimulation when  $\Delta F/F_0$  increased by  $>5\%$  for at least two consecutive images. Figure 6*C* shows the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels of the different ROI defined in Figure 6*A*. Although some regions increased their intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels (ROI 1–3 and 7), other regions failed to respond to the nerve stimulation (ROI 4–6). Therefore, in close agreement with previous results that indicated subcellular microdomains for neuron–glia interaction (Grosche et al., 1999), our results indicate that subcellular regions of astrocytes may respond differentially to the synaptic cholinergic activity.

#### DISCUSSION

Recent data have demonstrated the existence of bidirectional communication between astrocytes and neurons, which is mediated by neurotransmitters released by both neurons and glia. Although astrocytes express numerous neurotransmitter receptors, the ability of synaptically released neurotransmitters to access these astrocytic receptors is largely unknown. We show that hippocampal astrocytes located in the stratum oriens region of the CA1 area, which receives abundant cholinergic input, respond to ACh released by synaptic terminals. The synaptically released ACh acts on mAChRs, releasing  $\text{Ca}^{2+}$  from the internal stores.

Glutamate-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  increases in hippocampal astrocytes located in the stratum radiatum have been shown previously to be responsible for neuron–glia signaling in hippocampal slices

(Porter and McCarthy, 1996; Pasti et al., 1997). However, our data indicate that neuron-evoked  $\text{Ca}^{2+}$  increases in stratum oriens astrocytes are mediated by cholinergic rather than by glutamatergic receptors. The insensitivity of the astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  signaling to glutamate was surprising, because afferent fibers in the stratum oriens/alveus also included glutamatergic axons (Ramón y Cajal, 1904; Klishin et al., 1995; Maccaferri and McBain, 1995). The lack of a glutamate effect on the neuron-evoked astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  signaling was not attributable to the absence of functional glutamate receptors because ionophoretically applied glutamate increased the astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  levels (cf. Shelton and McCarthy, 1999). Furthermore, the recorded glutamate transporter currents demonstrate that astrocytes were able to sense synaptically released glutamate. A possible explanation for the absence of glutamate receptor activation could be a moderate rise in the extracellular concentration of glutamate, sufficient to activate glutamate transporters but not glutamate receptors. However, this seems unlikely, because the affinity of mGluRs and transporters for glutamate is similar (in the micromolar range) (Conn and Pin, 1997; Anderson and Swanson, 2000). Although the affinity of AMPA receptors for glutamate is relatively lower ( $\text{EC}_{50} \sim 0.5$  mM; Patneau and Mayer, 1990), glutamate-induced  $\text{Ca}^{2+}$  elevations in hippocampal astrocytes are primarily mediated by mGluRs (Porter and McCarthy, 1996; Pasti et al., 1997). Alternatively, a spatially restricted localization of glutamate and cholinergic receptors may be the simplest explanation for these results. This interpretation is also supported by the different  $\text{Ca}^{2+}$  signal responses observed in different astrocytic regions after nerve stimulation. Furthermore, although glutamate receptors do not contribute to the neuron-evoked  $\text{Ca}^{2+}$  elevations, our results show simultaneous glutamate-mediated uptake currents and cholinergic-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  elevations. Therefore, together these results suggest the existence of functional astrocytic subcellular domains. This suggestion is in agreement with a recent report that demonstrated that Bergmann glial cells show subcellular microdomains that may respond independently to synaptic activity (Grosche et al., 1999).

Nicotinic responses have been reported recently in cultured astrocytes (Sharma and Vijayaraghavan, 2001). However, our results indicate that the cholinergic signaling found in the stratum oriens is mediated by mAChRs, which is in agreement with many studies that report that the types of cholinergic receptors expressed by glial cells *in situ* are muscarinic (Rochon et al., 2001).

Cholinergic signaling in the nervous system is highly complex; it is mediated by different types of nAChRs and mAChRs that may act presynaptically or postsynaptically. Additional complexity arises from the recently demonstrated ACh-mediated neuron–glia interaction in molluscs, in which synaptically released ACh induces the release of an ACh-binding protein from glial cells that modulate cholinergic transmission (Smit et al., 2001). In addition to the cholinergic neuronal transmission, we show an additional cholinergic communication between neurons and astrocytes, which adds more complexity to the highly complex cholinergic signaling in the CNS.

Because  $\text{Ca}^{2+}$  elevations in astrocytes have been shown to evoke the release of glutamate (Araque et al., 1998a,b, 2000; Bezzi et al., 1998; Parpura and Haydon, 2000), which can modulate the neuronal activity and the glutamatergic and GABAergic transmission (Araque et al., 1998a,b; Kang et al., 1998; Newman and Zahs, 1998), the cholinergic-mediated astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  increases may lead to glutamate release that would modulate synaptic transmission in the hippocampus.

The importance of cholinergic transmission in the physiology of the hippocampus is well established. Several studies suggest that cholinergic inputs play a key role in the generation of the hippocampal theta rhythm, which is extremely relevant in different behavioral states (Vertes and Kocsis, 1997; Leung, 1998). Deficits in cholinergic transmission have been associated with pathophysiological conditions such as Alzheimer's disease (Kasa et al., 1997). Furthermore, hippocampal cholinergic transmission has been proposed to be involved in some forms of synaptic plasticity, such as long-term potentiation, a cellular mechanism thought to underlie processes of learning and memory (Auerbach and Segal, 1996; Yun et al., 2000). Considering the active role of glia in modulating neuronal excitability and synaptic transmission (Araque et al., 1999, 2001; Haydon, 2001), the present demonstration of cholinergic-mediated neuron–astrocyte signaling suggests that astrocytes might participate in such phenomena. Finally, several groups have demonstrated previously the existence of bidirectional communication between astrocytes and neurons, in which astrocytes respond to the activity of synaptic terminals of local circuit neurons (Araque et al., 1999). Here we show that hippocampal astrocytes respond to the activity of axons arising from the septum and diagonal band of Broca, suggesting that astrocytes are a target of axonal inputs between different brain areas, which adds additional complexity to the functional communication pathways in the nervous system.

## REFERENCES

- Amaral DG, Witter MP (1995) Hippocampal formation. In: The rat nervous system, Ed 2 (Paxinos G, ed), pp 443–493. London: Academic.
- Anderson CM, Swanson RA (2000) Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia* 32:1–14.
- Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG (1998a) Glutamate-dependent astrocyte modulation of synaptic transmission between cultured hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 10:2129–2142.
- Araque A, Sanzgiri RP, Parpura V, Haydon PG (1998b) Calcium elevation in astrocytes causes an NMDA receptor-dependent increase in the frequency of miniature synaptic currents in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* 18:6822–6829.
- Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG (1999) Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci* 22:208–215.
- Araque A, Li N, Doyle RT, Haydon PG (2000) SNARE protein-dependent glutamate release from astrocytes. *J Neurosci* 20:666–673.
- Araque A, Carmignoto G, Haydon PG (2001) Dynamic signaling between neurons and glia. *Annu Rev Physiol* 63:795–813.
- Auerbach JM, Segal M (1996) Muscarinic receptors mediating depression and long-term potentiation in rat hippocampus. *J Physiol (Lond)* 492:479–493.
- Bergles DE, Jahr CE (1997) Synaptic activation of glutamate transporters in hippocampal astrocytes. *Neuron* 19:1297–1308.
- Bergles DE, Jahr CE (1998) Glial contribution to glutamate uptake at Schaffer collateral–commissural synapses in the hippocampus. *J Neurosci* 18:7709–7716.
- Bergles DE, Roberts JD, Somogyi P, Jahr CE (2000) Glutamatergic synapses on oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. *Nature* 405:187–191.
- Bezzi P, Carmignoto G, Pasti L, Vesce S, Rossi D, Lodi Rizzini B, Pozzan T, Volterra A (1998) Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. *Nature* 391:281–285.
- Borde M, Cazalets JR, Buño W (1995) Activity-dependent response depression in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons *in vitro*. *J Neurophysiol* 74:1714–1729.
- Carmignoto G (2000) Reciprocal communication systems between astrocytes and neurones. *Prog Neurobiol* 62:561–581.
- Charles AC, Merrill JE, Dirksen ER, Sanderson MJ (1991) Intercellular signaling in glial cells: calcium waves and oscillations in response to mechanical stimulation and glutamate. *Neuron* 6:983–992.
- Charles AC, Dirksen ER, Merrill JE, Sanderson MJ (1993) Mechanisms of intercellular calcium signaling in glial cells studied with dantrolene and thapsigargin. *Glia* 7:134–145.
- Conn PJ, Pin JP (1997) Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37:205–237.
- Cornell-Bell AH, Finkbeiner SM, Cooper MS, Smith SJ (1990) Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science* 247:470–473.

- Dani JW, Chernjavsky A, Smith SJ (1992) Neuronal activity triggers calcium waves in hippocampal astrocyte networks. *Neuron* 8:429–440.
- Grosche J, Matyash V, Moller T, Verkhratsky A, Reichenbach A, Kettenmann H (1999) Microdomains for neuron–glia interaction: parallel fiber signaling to Bergmann glial cells. *Nat Neurosci* 2:139–143.
- Haydon PG (2001) Glia: listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci* 2:185–193.
- Hille B (1992) Ionic channels of excitable membranes, Ed 2. Sunderland, MA: Sinauer.
- Kang J, Jiang L, Goldman SA, Nedergaard M (1998) Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nat Neurosci* 1:683–692.
- Kasa P, Rakonczay Z, Gulya K (1997) The cholinergic system in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 52:511–535.
- Klishin A, Tsintsadze T, Lozovaya N, Krishtal O (1995) Latent *N*-methyl-D-aspartate receptors in the recurrent excitatory pathway between hippocampal CA1 pyramidal neurons:  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent activation by blocking  $\text{A}_1$  adenosine receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:12431–12435.
- Kulik A, Haentzsch A, Luckermann M, Reichelt W, Ballanyi K (1999) Neuron–glia signaling via  $\alpha_1$  adrenoceptor-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  release in Bergmann glial cells *in situ*. *J Neurosci* 19:8401–8408.
- Leung LS (1998) Generation of theta and gamma rhythms in the hippocampus. *Neurosci Biobehav Rev* 22:275–290.
- Lewis PR, Shute CCD (1967) The cholinergic limbic system: projections to hippocampal formation, medial cortex, nuclei of the ascending cholinergic reticular system, and the subfornical organ and supra-optic crest. *Brain* 90:521–540.
- Maccaferri G, McBain CJ (1995) Passive propagation of LTD to stratum oriens–alveus inhibitory neurons modulates the temporoammonic input to the hippocampal CA1 region. *Neuron* 15:137–145.
- Mennerick S, Benz A, Zorumski CF (1996) Components of glial responses to exogenous and synaptic glutamate in rat hippocampal microcultures. *J Neurosci* 16:55–64.
- Newman EA, Zahs KR (1997) Calcium waves in retinal glial cells. *Science* 275:844–847.
- Newman EA, Zahs KR (1998) Modulation of neuronal activity by glial cells in the retina. *J Neurosci* 18:4022–4028.
- Parpura V, Haydon PG (2000) Physiological astrocytic calcium levels stimulate glutamate release to modulate adjacent neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:8629–8634.
- Parpura V, Basarsky TA, Liu F, Jeftinija K, Jeftinija S, Haydon PG (1994) Glutamate-mediated astrocyte–neuron signaling. *Nature* 369:744–747.
- Pastl L, Voltterra A, Pozzan T, Carmignoto G (1997) Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes *in situ*. *J Neurosci* 17:7817–7830.
- Patneau DK, Mayer ML (1990) Structure–activity relationships for amino acid transmitter candidates acting at *N*-methyl-D-aspartate and quisqualate receptors. *J Neurosci* 10:2385–2399.
- Porter JT, McCarthy KD (1996) Hippocampal astrocytes *in situ* respond to glutamate released from synaptic terminals. *J Neurosci* 16:5073–5081.
- Porter JT, McCarthy KD (1997) Astrocytic neurotransmitter receptors *in situ* and *in vivo*. *Prog Neurobiol* 51:439–455.
- Ramón y Cajal S (1904) *Textura del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados*. Madrid: Moya.
- Reyes M, Stanton PK (1996) Induction of hippocampal long-term depression requires release of  $\text{Ca}^{2+}$  from separate presynaptic and postsynaptic intracellular stores. *J Neurosci* 16:5951–5960.
- Robitaille R (1998) Modulation of synaptic efficacy and synaptic depression by glial cells at the frog neuromuscular junction. *Neuron* 21:847–855.
- Rochon D, Rouse I, Robitaille R (2001) Synapse–glia interactions at the mammalian neuromuscular junction. *J Neurosci* 21:3819–3829.
- Sharma G, Vijayaraghavan S (2001) Nicotinic cholinergic signaling in hippocampal astrocytes involves calcium-induced calcium release from intracellular stores. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:4148–4153.
- Shelton MK, McCarthy KD (1999) Mature hippocampal astrocytes exhibit functional metabotropic and ionotropic glutamate receptors *in situ*. *Glia* 26:1–11.
- Shelton MK, McCarthy KD (2000) Hippocampal astrocytes exhibit  $\text{Ca}^{2+}$ -elevating muscarinic cholinergic and histaminergic receptors *in situ*. *J Neurochem* 74:555–563.
- Smit AB, Syed NI, Schaap D, van Minnen J, Klumperman J, Kits KS, Lodder H, van der Schors RC, van Elk R, Sorgedraeger B, Brejc K, Sixma TK, Geraerts WP (2001) A glia-derived acetylcholine-binding protein that modulates synaptic transmission. *Nature* 411:261–268.
- Thesleff S (1980) Aminopyridines and synaptic transmission. *Neuroscience* 5:1413–1419.
- Verkhratsky A, Kettenmann H (1996) Calcium signaling in glial cells. *Trends Neurosci* 19:346–352.
- Vertes RP, Kocsis B (1997) Brainstem–diencephalo–septohippocampal systems controlling the theta rhythm of the hippocampus. *Neuroscience* 81:893–926.
- Yun SH, Cheong MY, Mook-Jung I, Huh K, Lee C, Jung MW (2000) Cholinergic modulation of synaptic transmission and plasticity in entorhinal cortex and hippocampus of the rat. *Neuroscience* 97:671–676.



# Properties of Synaptically Evoked Astrocyte Calcium Signal Reveal Synaptic Information Processing by Astrocytes

Gertrudis Perea and Alfonso Araque

Instituto Cajal, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid 28002, Spain

The synaptic control of the astrocytic intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  is crucial in the reciprocal astrocyte–neuron communication. Using electrophysiological and  $\text{Ca}^{2+}$  imaging techniques in rat hippocampal slices, we investigated the astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  signal modulation induced by synaptic terminals that use glutamate and acetylcholine.  $\text{Ca}^{2+}$  elevations were evoked by glutamate released from Schaffer collaterals and by acetylcholine, but not glutamate, released by alveus stimulation, indicating that astrocytes discriminate the activity of different synapses belonging to different axon pathways. The  $\text{Ca}^{2+}$  signal was modulated bidirectionally by simultaneous activation of both pathways, being depressed at high stimulation frequencies and enhanced at low frequencies. The  $\text{Ca}^{2+}$  modulation was attributable to astrocytic intrinsic properties, occurred at discrete regions of the processes, and controlled the intracellular expansion of the  $\text{Ca}^{2+}$  signal. In turn, astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  signal elicited NMDA receptor-mediated currents in pyramidal neurons. Therefore, because astrocytes discriminate and integrate synaptic information, we propose that they can be considered as cellular elements involved in the information processing by the nervous system.

**Key words:** astrocytes; intracellular calcium; neurotransmitter release; glutamate; synaptic activity; neuron–glia interaction

## Introduction

Evidence obtained during the last few years has established a new concept of the synaptic physiology, the tripartite synapse, in which astrocytes play an active role by exchanging information with the synaptic elements (Araque et al., 1999; Carmignoto, 2000; Haydon and Araque, 2002; Volterra and Bezzi, 2002; Auld and Robitaille, 2003; Newman, 2003). This concept is based on the demonstration that astrocytes display a form of excitability based on intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  variations (Pasti et al., 1997; Verkhratsky et al., 1998; Haydon, 2001; Charles and Giaume, 2002; Haydon and Araque, 2002; Nedergaard et al., 2003), respond to synaptically released neurotransmitters (Porter and McCarthy, 1996; Pasti et al., 1997; Grosche et al., 1999; Latour et al., 2001; Araque et al., 2002), and modulate neuronal excitability and synaptic transmission by releasing neuroactive substances through, at least some of them,  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent mechanisms (Araque et al., 1998a,b; Kang et al., 1998; Newman and Zahs, 1998; Robitaille, 1998; Parri et al., 2001; Beattie et al., 2002; Brockhaus and Deitmer, 2002; Volterra and Bezzi, 2002; Newman, 2003; Zhang et al., 2003; Fiacco and McCarthy, 2004; Liu et al., 2004).

In this loop of information exchange between astrocytes and neurons, the synaptic control of the astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  is a key element. However, the properties and regulation of the synaptically

evoked astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  signal are essentially unknown. We investigated the modulation of the  $\text{Ca}^{2+}$  signal of hippocampal astrocytes induced by activation of two different afferent pathways that use glutamate and acetylcholine (ACh) as neurotransmitters. We found that although stimulation of glutamatergic Schaffer collaterals (SC) elicited  $\text{Ca}^{2+}$  elevations selectively mediated by glutamate receptors (GluRs), stimulation of the alveus, which contains both cholinergic and glutamatergic axons, evoked glutamate transporter currents as well as ACh- but not glutamate-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  elevations, indicating that astrocytes discriminate between the activity of different synaptic terminals belonging to different axon pathways.

Furthermore, we found that the astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  was modulated by interaction of those synaptic inputs (i.e., SC and alveus) because of intrinsic properties of astrocytes and that this regulation was bidirectional, being potentiated or depressed depending on the level of synaptic activity.  $\text{Ca}^{2+}$  responses examined at subcellular regions in astrocytic processes showed similar modulation. Furthermore, the synaptic interaction controlled the propagation of the astrocyte intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signal.

Although the ability of astrocytes to release glutamate through a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent mechanism is well established (Bezzi et al., 1998, 2004; Araque et al., 2000; Parpura and Haydon, 2000; Pasti et al., 2001; Zhang et al., 2004), its consequences on neuronal physiology are not completely determined. We investigated the electrophysiological effects of the astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  signal on CA1 pyramidal neurons, and we found that astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  elevations evoked NMDA receptor (NMDAR)-mediated slow inward currents (SICs) in neurons.

Therefore, the present results show that the astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  signal does not simply reflect synaptic activity but that astrocytes are able to discriminate between the activity of different synapses and to integrate those inputs attributable to the existence of cel-

Received Sept. 24, 2004; revised Jan. 11, 2005; accepted Jan. 13, 2005.

This work was supported by grants from the Ministerio de Ciencia y Tecnología (BFI2001-0206) and Ministerio de Educación y Ciencia (BFU2004-00448), Spain. G.P. is a Consejo Superior de Investigaciones Científicas predoctoral fellow. We thank Drs. W. Buño, P. G. Haydon, J. Lerma, and E. D. Martín for helpful suggestions and comments on drafts of this manuscript.

Correspondence should be addressed to Dr. Alfonso Araque, Instituto Cajal, Doctor Arce 37, Madrid 28002, Spain. E-mail: araque@cajal.csic.es.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.3965-04.2005

Copyright © 2005 Society for Neuroscience 0270-6474/05/252192-13\$15.00/0

lular intrinsic properties, indicating that astrocytes show integrative properties for synaptic information processing.

## Materials and Methods

**Hippocampal slice preparation.** Acute hippocampal slices were obtained as described previously (Araque et al., 2002). All of the procedures for handling and killing animals followed European Commission guidelines (86/609/CEE) and were supervised by the Instituto Cajal veterinary officer. Briefly, Wistar rats (12–17 d old) were anesthetized and then decapitated. The brain was removed rapidly and placed in ice-cold artificial CSF (ACSF). Brain slices (350–450  $\mu\text{m}$  thick) were cut with a Vibratome and incubated for >1 h at room temperature (21–24°C) in ACSF. The ACSF contained (in mM) 124 NaCl, 2.69 KCl, 1.25  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2  $\text{MgSO}_4$ , 26  $\text{NaHCO}_3$ , 2  $\text{CaCl}_2$ , and 10 glucose and was gassed with 95%  $\text{O}_2$ /5%  $\text{CO}_2$ , pH 7.3. Slices were then transferred to an immersion recording chamber and superfused with gassed ACSF. In some cases, the ACSF contained 100  $\mu\text{M}$  4-aminopyridine (4-AP) to enhance astrocytic responses (Porter and McCarthy, 1996; Araque et al., 2002). In experiments designed to optimize NMDAR activation, the extracellular  $\text{Mg}^{2+}$  was equimolarly substituted by  $\text{Ca}^{2+}$ , and 10  $\mu\text{M}$  glycine was added. Cells were visualized under an Olympus BX50WI microscope (Olympus Optical, Tokyo, Japan) equipped with infrared and differential interference contrast imaging devices and with a 40 $\times$  water immersion objective.

**Electrophysiology.** Simultaneous fluorescence photometric  $\text{Ca}^{2+}$  measurements and electrophysiological recordings from astrocytes located in the stratum oriens of the CA1 hippocampal region were made using the whole-cell patch-clamp technique. Patch electrodes were fabricated from borosilicate glass capillaries and had resistances of 6–10  $\text{M}\Omega$  when filled with the internal solution that contained the following (in mM): 100  $\text{KMeSO}_4$ , 50 KCl, 10 HEPES, and 4 ATP- $\text{Na}_2$ , pH 7.3. Recordings were obtained with an Axoclamp-2A amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA) in the continuous single-electrode voltage-clamp mode or a PC-ONE amplifier (Dagan Instruments, Minneapolis, MN). Fast and slow whole-cell capacitances were neutralized, series resistance was compensated (~70%), and the membrane potential was held at resting potential. Signals were fed to a Pentium-based personal computer through a DigiData 1320 interface board (Axon Instruments). pClamp 8 software (Axon Instruments) was used for stimulus generations, data display, acquisition, and storage.

Astrocytes were identified according to morphological and electrophysiological criteria (Bergles and Jahr, 1997; Pasti et al., 1997; Bezzi et al., 1998; Bergles et al., 2000; Araque et al., 2002). In some cases, the recorded cells were later immunocytochemically studied and examined using laser-scanning confocal microscopy. The dual labeling with fluo-3 and GFAP antibody of the recorded cells confirmed their identification as astrocytes (data not shown) (Araque et al., 2002). Bipolar nichrome wire electrodes (80  $\mu\text{m}$  diameter) were connected to a stimulator through isolation units (Grass S88; Grass Instruments, Quincy, MA) and placed in the stratum radiatum near the border of the CA1 pyramidal neurons to stimulate SC–commissural afferents; they were also placed in the stratum oriens/alveus near the subiculum area (for simplicity herein termed alveus), which contains cholinergic axons from diagonal band of Broca and septum (Lewis and Shute, 1967). Trains of stimuli at 30 Hz during 5 s were delivered at 0.013  $\text{s}^{-1}$ , unless stated otherwise. This low-rate train stimulation evoked reliable successive responses (data not shown) (Araque et al., 2002), and in some cases, up to three responses were averaged. In some experiments, either the frequency or the duration of the stimulus was varied, but the stimulation intensities were unchanged throughout the experiment to avoid variations in the amount of fibers stimulated. When the SC and alveus were stimulated independently or simultaneously, the sequence of stimulation was orderless. Because similar results were observed regardless of that sequence, data were pooled together. Experiments were performed at room temperature (21–24°C). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. Statistical differences were established by the Student's *t* test.

**Paired whole-cell recordings from neurons and astrocytes.** In some experiments, we performed paired whole-cell recordings from CA1 pyramidal neurons and stratum oriens astrocytes (distance of the somas, <150  $\mu\text{m}$ ) (see Fig. 6A). In some cases, recorded astrocytes were stimulated with trains of 60–180 mV depolarizing pulses (duration, 100–500

ms) delivered every 1 s for 3–10 min. Mean frequencies of astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  elevations and neuronal SICs were evaluated over 3–10 min periods.

**Measurement of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  variations.**  $\text{Ca}^{2+}$  levels in single astrocytes were monitored by fluorescence microscopy using the  $\text{Ca}^{2+}$  indicator fluo-3. Patch pipettes were filled with the internal solution containing 50  $\mu\text{M}$  fluo-3 (Molecular Probes, Eugene, OR). Cells were illuminated with a xenon lamp at 490 nm using a monochromator Polychrome II (T.I.L.L. Photonics, Planegg, Germany). Fluorescence intensity was collected by a photomultiplier tube (model R928; Hamamatsu Photonic System, Bridgewater, NJ) from a variable rectangular window (side, 25–50  $\mu\text{m}$ ) containing the soma of the recorded astrocyte. Cells were illuminated during 20–200 ms every 0.5–1 s, and the collected fluorescence signal was integrated using the T.I.L.L. Photonics photometry system.  $\text{Ca}^{2+}$  variations were estimated as changes in the fluorescence signal over baseline ( $\Delta F/F_0$ ) after background subtraction. Astrocytes were considered to respond to the stimulation when the fluorescence signal increased two times above the SD of the basal signal.

**$\text{Ca}^{2+}$  imaging.** In some cases, slices were incubated with fluo-3 AM (2–5  $\mu\text{l}$  of 2 mM dye was dropped over the hippocampus, attaining a final concentration of 2–10  $\mu\text{M}$ ) for 20–30 min at room temperature. In these conditions, most of the cells loaded were astrocytes (Kang et al., 1998; Parri et al., 2001; Aguado et al., 2002; Nett et al., 2002; Liu et al., 2004), as confirmed in some cases by their electrophysiological properties (see Fig. 7A, in which fluorescence of the pyramidal layer was very low because of poor neuronal loading). Astrocytes were imaged using a CCD camera (Retiga EX; Qimaging, Burnaby, British Columbia, Canada) attached to the Olympus microscope. Cells were illuminated during 200–500 ms, and images were acquired every 1–2 s. The monochromator Polychrome II and the CCD camera were controlled and synchronized by customized software (Solex Consultores SL, Madrid, Spain). Quantitative epifluorescence measurements were made using ImageJ public domain software (developed at the National Institutes of Health).  $\text{Ca}^{2+}$  variations were estimated as  $\Delta F/F_0$  after background subtraction, and regions of interest were considered to respond to the stimulation when  $\Delta F/F_0$  increased >5% for at least two consecutive images with a delay  $\leq$  15 s after the stimulation. Although nerve stimulation evoked long-lasting, transient  $\text{Ca}^{2+}$  elevations (i.e.,  $\text{Ca}^{2+}$  spikes) (see Fig. 1C), direct depolarization of astrocytes evoked repetitive  $\text{Ca}^{2+}$  spikes (i.e.,  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations) (see Fig. 6E). The parameter used to quantify the astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  signal was the amplitude of the transient  $\text{Ca}^{2+}$  spikes. In addition, in the experiments reported in Figure 6, we analyzed the frequency of the astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  elevations that occurred spontaneously or after membrane depolarization. Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  elevations were observed in astrocytes either spontaneously (Latour et al., 2001; Aguado et al., 2002) (see Fig. 6) or after SC stimulation (see Results). Those astrocytes in which these  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations prevented the unambiguous analysis of the nerve-evoked responses were not considered further.

A concern about the methodology used (short loading times of fluo-3 AM) relates to the high surface loading of the slices, which could result in a preferential loading of superficial damaged astrocytes and high background fluorescence that could mask  $\text{Ca}^{2+}$  fluorescence changes. Incubating the slices for 3 h and in the presence of pluronic acid (0.001%) did not improve the depth of loading, as examined by laser-scanning confocal microscopy ( $43 \pm 4$  and  $45 \pm 3$   $\mu\text{m}$  in five and three slices incubated for 30 min and 3 h, respectively). Hence, some slices were incubated with fluorescent dyes that offer better resolution [i.e., fluo-4 AM (2–10  $\mu\text{M}$ ), Calcium Green-1 AM (10  $\mu\text{M}$ ), and fura-2 AM (10  $\mu\text{M}$ )] and provided similar results to those obtained with fluo-3 ( $n \geq 25$  astrocytes from at least three slices in each condition; data not shown). Whole-cell recordings of astrocytes from either unloaded or fluo-3 AM-loaded slices showed similar membrane resting potential ( $-72.7 \pm 0.9$  and  $-70.2 \pm 1.6$  mV;  $n = 10$ ) and conductance ( $32.4 \pm 3.6$  and  $37.9 \pm 7.4$  nS), suggesting that  $\text{Ca}^{2+}$  signal recordings were likely obtained from undamaged astrocytes. Moreover, similar results were obtained from either fluo-3 AM- or whole-cell-loaded astrocytes, which were not necessarily superficial. Together, these results indicate that astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  signal discrimination and modulation were unlikely because of technical limitations.

**Ionophoresis.** ACh and glutamate were ionophoretically delivered by 1–5 s duration current pulses (MicroIonophoresis Dual Current Pulse

Generator; World Precision Instruments, Sarasota, FL) using a pulled theta capillary, and each compartment was filled separately with ACh (0.5 M in ACSF, pH 6) and Glu (0.7 M in ACSF, pH 8). Likewise, ATP (20 mM in ACSF, pH 7.5–8) was applied. Ionophoretical experiments were performed in 1  $\mu$ M tetrodotoxin (TTX).

**Drugs.** (S)- $\alpha$ -methyl-4-carboxyphenylglycine (MCPG), 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX), D(-)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (AP-5), and L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate (t-PDC) were purchased from Tocris Cookson (Bristol, UK); dihydrokainate (DHK) was purchased from Ocean Produce International (Shelburne, Nova Scotia, Canada). All other drugs were from Sigma (St. Louis, MO).

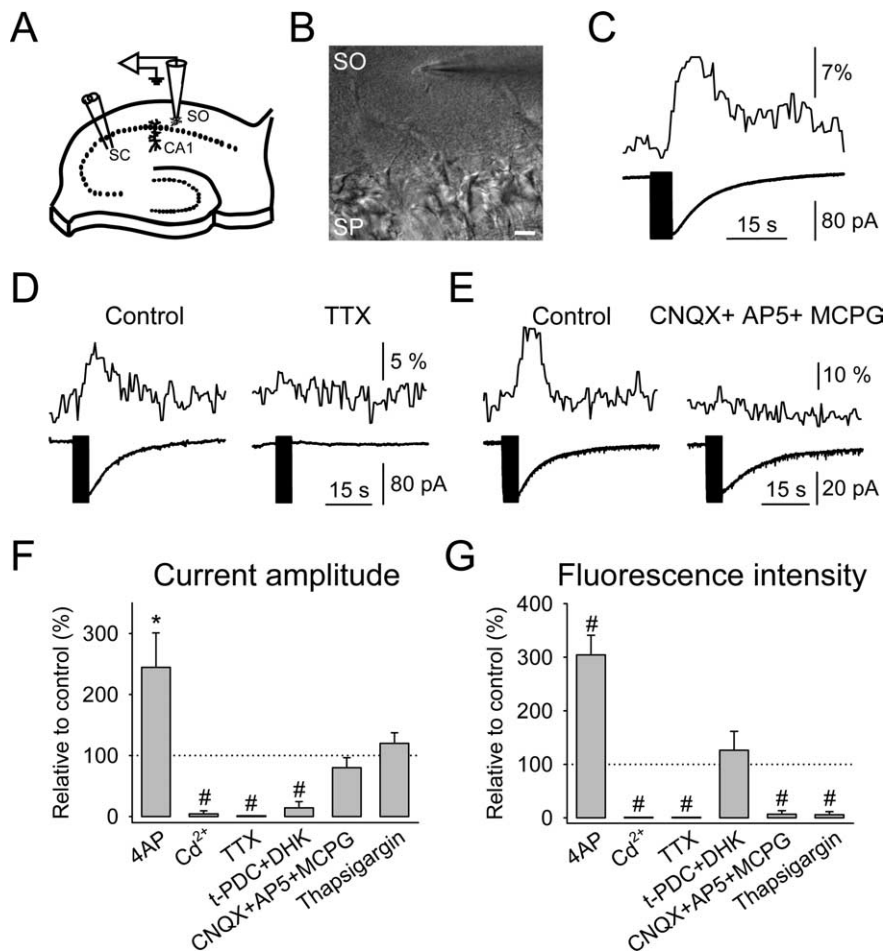
## Results

### Astrocytic responses evoked by the activity of SC synaptic terminals

We recently showed that hippocampal stratum oriens astrocytes responded with  $Ca^{2+}$  elevations to ACh but not to glutamate released after stimulation of the alveus, which contains cholinergic and glutamatergic axons (Araque et al., 2002). Because those astrocytes express functional GluRs (Porter and McCarthy, 1996; Shelton and McCarthy, 1999; Latour et al., 2001; Araque et al., 2002), we investigated whether they responded to a different glutamatergic input (i.e., the SC, which projects to the stratum radiatum and stratum oriens of the CA1 hippocampal region) (Li et al., 1994). We simultaneously recorded intracellular  $Ca^{2+}$  levels and whole-cell currents of morphologically and electrophysiologically identified astrocytes in the stratum oriens of the CA1 hippocampal area (Fig. 1*A,B*). Electrical stimulation of SCs evoked long-lasting inward currents ( $-39.9 \pm 5.5$  pA;  $n = 31$ ) and transient intracellular  $Ca^{2+}$  elevations (in 84% of the astrocytes, from a sample of 31 cells) (Fig. 1*C*). The amplitude of both responses depended on the frequency and duration of the stimulus (data not shown).

In addition to the nerve-evoked transient  $Ca^{2+}$  elevations, astrocytes also displayed  $Ca^{2+}$  oscillations that occurred spontaneously (Latour et al., 2001; Aguado et al., 2002) (see Fig. 6) and that could be elicited by nerve stimulation. These  $Ca^{2+}$  oscillations were modulated by the SC stimulation, increasing their frequency from  $0.2 \pm 0.1$  to  $0.8 \pm 0.1$  min $^{-1}$  before and after the stimulation, respectively ( $n = 41$  astrocytes; data not shown). The present work focused on the transient  $Ca^{2+}$  elevations, and the stimulation-evoked  $Ca^{2+}$  oscillations were not analyzed further.

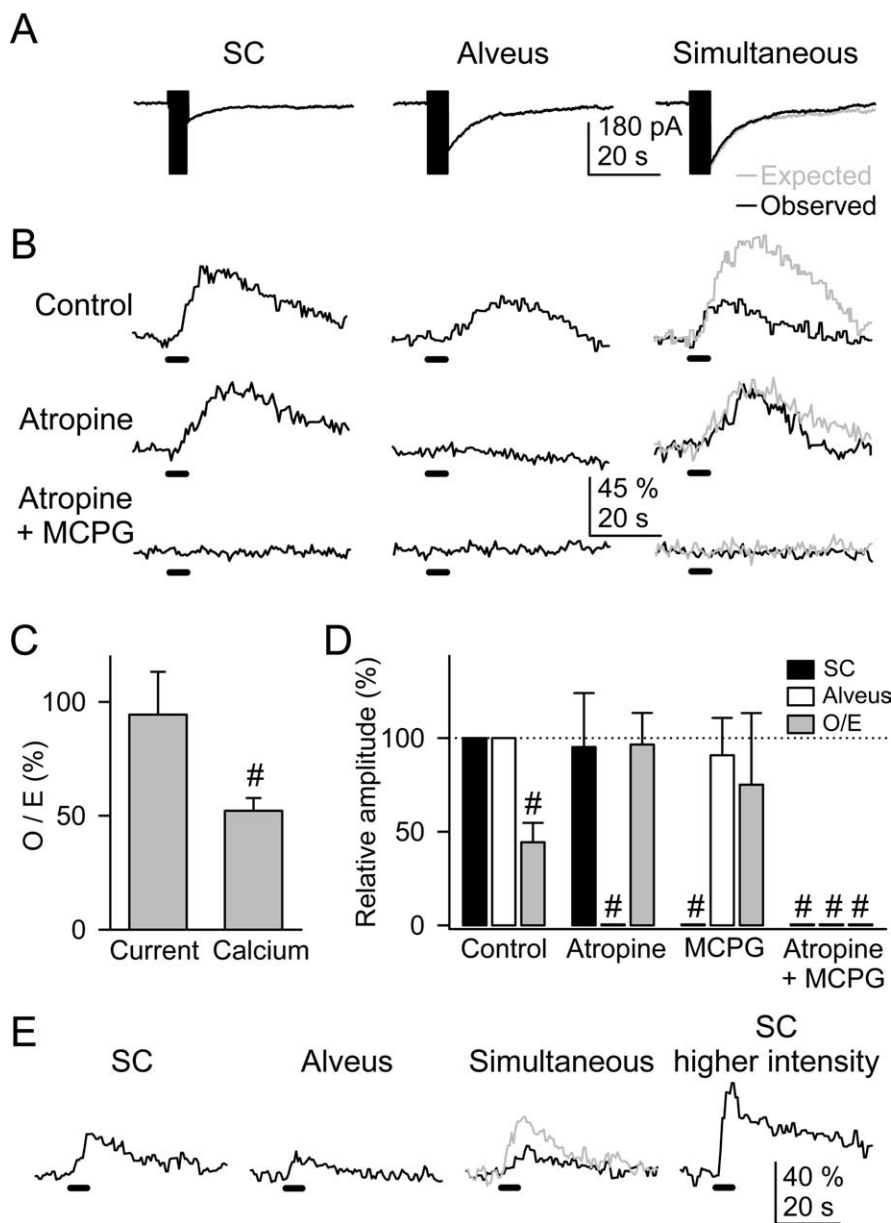
To investigate whether these responses were attributable to synaptically released neurotransmitters, we used pharmacological tools that modulate nerve activity and neurotransmitter release (Fig. 1*D–G*). The SC-induced  $Ca^{2+}$  elevations and inward currents were abolished by the sodium channel antagonist TTX (1  $\mu$ M;  $n = 8$ ), which prevents action potential generation, and by extracellular  $Cd^{2+}$  (100  $\mu$ M;  $n = 6$ ), which blocks the  $Ca^{2+}$  influx



**Figure 1.** Responses evoked by SC stimulation in hippocampal stratum oriens (SO) astrocytes. **A**, Schematic drawing of the experimental arrangement showing the position of the stimulating (left) and recording (right) electrodes in the hippocampal slice preparation. **B**, Infrared differential interference contrast image showing the hippocampal stratum pyramidale (SP) and the recorded astrocyte in the stratum oriens. Note the recording pipette on the right side of the astrocyte. Scale bar, 20  $\mu$ m. **C**, Representative astrocytic  $Ca^{2+}$  levels (top trace) and whole-cell membrane currents (bottom trace) elicited by SC stimulation (30 Hz, 5 s). The vertical black bar on the current trace corresponds to the stimulus artifact (as in all other figures). **D, E**, Astrocyte  $Ca^{2+}$  levels (top traces) and whole-cell membrane currents (bottom traces) evoked by SC stimulation in control conditions and in the presence of 1  $\mu$ M TTX and 20  $\mu$ M CNQX plus 50  $\mu$ M AP-5 plus 0.8 mM MCPG, respectively. **F, G**, Relative changes from control recordings of the membrane current amplitude and fluorescence intensity, respectively, evoked by SC stimulation in the presence of 100  $\mu$ M 4-AP ( $n = 21$ ), 100  $\mu$ M  $Cd^{2+}$  ( $n = 6$ ), 1  $\mu$ M TTX ( $n = 8$ ), 0.3 mM t-PDC plus 1 mM DHK ( $n = 8$ ), 20  $\mu$ M CNQX plus 50  $\mu$ M AP-5 plus 0.8 mM MCPG ( $n = 8$ ), and 1  $\mu$ M thapsigargin ( $n = 5$ ). Significant differences were established by the Student's *t* test at  $*p < 0.05$  and  $\#p < 0.001$ .

through voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels required for evoked neurotransmitter release. Furthermore, 4-AP (100  $\mu$ M;  $n = 21$ ), a potassium channel blocker that enhances the transmitter release, increased both the astrocytic  $Ca^{2+}$  elevations and the inward currents elicited by SC stimulation. These results indicate that the astrocytic responses were evoked by neurotransmitter release from synaptic terminals.

Astrocytes express glutamate transporters responsible for the clearance of glutamate from the extracellular space (Mennerick et al., 1996; Bergles et al., 1999). It is known that glutamate released from SCs can activate nearby stratum radiatum hippocampal astrocytes generating a net inward membrane current attributable to the electrogenic uptake of glutamate (Bergles and Jahr, 1997). We tested whether the SC-induced inward current in stratum oriens astrocytes was attributable to activation of glutamate transporters. The amplitude of the inward current was reduced after superfusion with both 1 mM DHK (a selective inhibitor of



**Figure 2.** The astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  signal was modulated by the simultaneous activity of alveus and SC synaptic terminals. **A**, Representative whole-cell currents elicited by independent or simultaneous stimulation of the SC and alveus (30 Hz, 5 s). In a simultaneous stimulation condition, black and gray traces correspond to the observed and expected responses (i.e., the summation of responses evoked by independent stimulation of both pathways), respectively, as in all other figures. **B**, Astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  levels evoked by independent or simultaneous stimulation of the SC and alveus in control conditions, in the presence of 50  $\mu\text{M}$  atropine, and after the addition of 0.8 mM MCPG. Horizontal lines at the bottom of each trace represent the stimuli, as in all other figures. **C**, Ratio between observed and expected responses. **D**, Relative amplitude of the astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  elevations evoked by independent or simultaneous stimulation of the SC and alveus in controls and in the presence of 50  $\mu\text{M}$  atropine and 0.8 mM MCPG. The responses evoked by simultaneous stimulation were quantified from the O/E ratio (i.e., the ratio between the observed response evoked by simultaneous stimulation and the expected response: the summation of the responses evoked by independent stimulation) (see Results).  $n \geq 5$  for each bar. **E**, Representative example of  $\text{Ca}^{2+}$  elevations evoked by the SC, alveus, simultaneous stimulation at a constant intensity, and after increasing the SC stimulation intensity. Note that the  $\text{Ca}^{2+}$  elevation elicited by SC stimulation at a stronger intensity was higher than the expected  $\text{Ca}^{2+}$  increase under simultaneous stimulation (gray trace). Significant differences were established by the Student's *t* test at  $\#p < 0.001$ .

GLT-1 transporters) and 0.3 mM t-PDC (a nonselective uptake antagonist;  $n = 8$ ) (Fig. 1F) or after replacement of the extracellular sodium by lithium, which inhibits the sodium-dependent glutamate uptake ( $2.4 \pm 1.2\%$  from control;  $n = 6$ ;  $p < 0.001$ ; data not shown). In contrast, the amplitude of the  $\text{Ca}^{2+}$  elevations was not significantly affected by t-PDC plus DHK ( $n = 8$ )

(Fig. 1G). Therefore, the astrocytic inward current was mediated by activation of electrogenic glutamate transporters.

We then pharmacologically investigated the mechanisms underlying the astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  elevations. The SC-induced astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  increases were abolished by GluR antagonists (20  $\mu\text{M}$  CNQX plus 50  $\mu\text{M}$  AP-5 plus 0.8 mM MCPG;  $n = 8$ ) (Fig. 1E,G). Although the expression of ionotropic GluRs has been reported in glial cells including astrocytes (Shelton and McCarthy, 1999; Bergles et al., 2000),  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable GluRs did not contribute substantially to the  $\text{Ca}^{2+}$  elevations because they were unaffected by ionotropic GluR antagonists (20  $\mu\text{M}$  CNQX plus 50  $\mu\text{M}$  AP-5;  $69.5 \pm 11.1\%$ ;  $n = 4$ ;  $p = 0.07$ ; data not shown) but were abolished by the metabotropic GluR (mGluR) antagonist MCPG (0.8 mM;  $n = 8$ ), indicating that the SC-evoked  $\text{Ca}^{2+}$  signal was essentially mediated by mGluRs (Fig. 2B). Consistent with these findings, thapsigargin (1  $\mu\text{M}$ ), a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase inhibitor that depletes internal  $\text{Ca}^{2+}$  stores, abolished the synaptically induced  $\text{Ca}^{2+}$  elevations without affecting the amplitude of the inward current, which reflects the amount of synaptically released glutamate (Bergles and Jahr, 1997; Bergles et al., 1999) ( $n = 5$ ) (Fig. 1F,G). Therefore, the astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  increase was attributable to  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization from internal stores, which further supports that the  $\text{Ca}^{2+}$  signal was mediated by G-protein-coupled mGluRs.

#### Astrocytes discriminate the activity of different synaptic terminals belonging to different axon pathways

Although we previously demonstrated that stratum oriens astrocytes responded with  $\text{Ca}^{2+}$  elevations to ACh but not glutamate released from the alveus synaptic terminals (Araque et al., 2002), present results show that astrocytes can be activated by glutamate released from SCs, suggesting that astrocytes discriminate the activity of different glutamatergic synapses and respond selectively to the activity of either pathway. To further address this issue, we stimulated both pathways while recording from single astrocytes. SC-evoked  $\text{Ca}^{2+}$  elevations were insensitive to the muscarinic cholinergic receptor (mAChR) antagonist atropine (50  $\mu\text{M}$ ) but abolished by MCPG (Fig. 2B,D). Conversely, atropine,

but not MCPG, prevented alveus-evoked  $\text{Ca}^{2+}$  elevations (Fig. 2D).  $\text{Ca}^{2+}$  variations were prevented in the presence of both atropine and MCPG. Therefore,  $\text{Ca}^{2+}$  elevations evoked by either alveus or SC stimulation were selectively mediated by mAChRs and mGluRs, respectively. These results indicate that astrocytic GluRs were activated by glutamate released from SC

terminals but not by glutamate released from alveus axons, which, however, reached the astrocytic membrane as assessed by the recorded glutamate transporter-mediated currents (Fig. 2A) (cf. Araque et al., 2002).

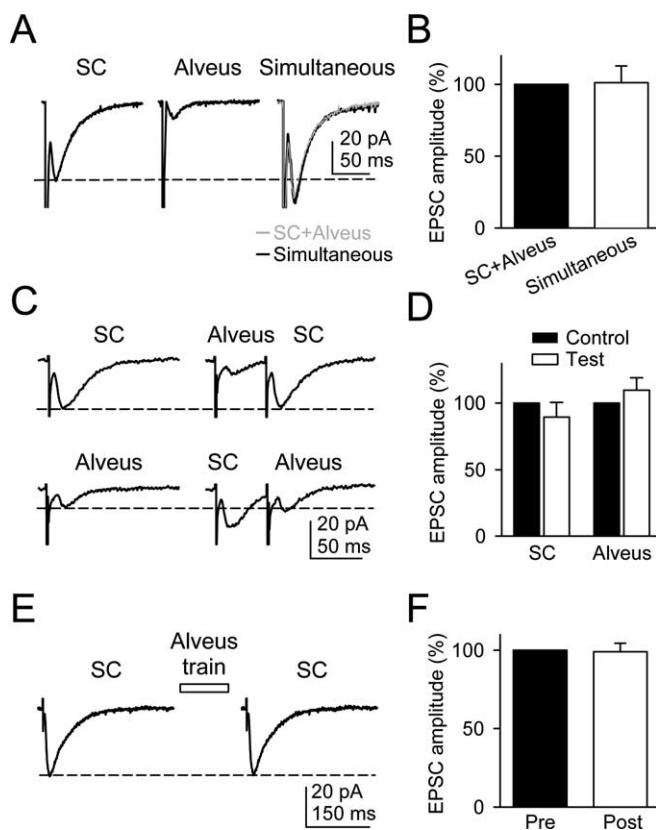
Together, these results indicate that astrocytes specifically respond to different axon pathways that release different neurotransmitters (i.e., ACh and glutamate). Furthermore, because they display  $\text{Ca}^{2+}$  elevations evoked by glutamate released from SCs but not from glutamatergic axons in the alveus, astrocytes discriminate the activity of different synaptic terminals belonging to different axon pathways.

### Astrocyte $\text{Ca}^{2+}$ signal is modulated by interaction of neurotransmitters released by different synaptic inputs

A remarkable feature of neurons is their ability to modulate their cellular excitability by the interaction of different neurotransmitters (McCormick, 1998). Because stratum oriens astrocytes responded with  $\text{Ca}^{2+}$  elevations to the activity of cholinergic and glutamatergic axons, we investigated whether the astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  signal could also be modulated by the interaction of both pathways. We compared the astrocytic responses evoked by either independent or simultaneous stimulation of the alveus and SC. We reasoned that if there was no interaction, the astrocytic responses elicited simultaneously would be the linear summation of the responses evoked independently. The interaction was quantified from the O/E ratio: the ratio between the observed response evoked by simultaneous stimulation and the expected response (i.e., the summation of the responses evoked by independent stimulation). Although the inward current evoked by simultaneous stimulation was not significantly different from the expected response, the  $\text{Ca}^{2+}$  elevation induced by concurrent stimulation was different from the expected one (Fig. 2A–C). In 10 of 77 cases, the  $\text{Ca}^{2+}$  signal evoked by simultaneous stimulation was higher than the summation of the  $\text{Ca}^{2+}$  elevations elicited independently, but in most cases (60 of 77 cells), the  $\text{Ca}^{2+}$  signal was lower (i.e., O/E < 100%). On average, during simultaneous stimulation, the synaptically evoked  $\text{Ca}^{2+}$  signal was reduced  $47.8 \pm 5.6\%$  ( $n = 77$ ) (Fig. 2C).

In the presence of atropine, which abolished the alveus-induced  $\text{Ca}^{2+}$  elevation without affecting the SC-induced response, the amplitude of the observed and expected  $\text{Ca}^{2+}$  signal was similar (Fig. 2B,D). Likewise, in the presence of MCPG, which prevented the SC-induced  $\text{Ca}^{2+}$  elevation without affecting the alveus-evoked response, the observed and expected responses were not significantly different (Fig. 2D). Therefore, the activation of both mAChRs and mGluRs were required to modulate the astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$ .

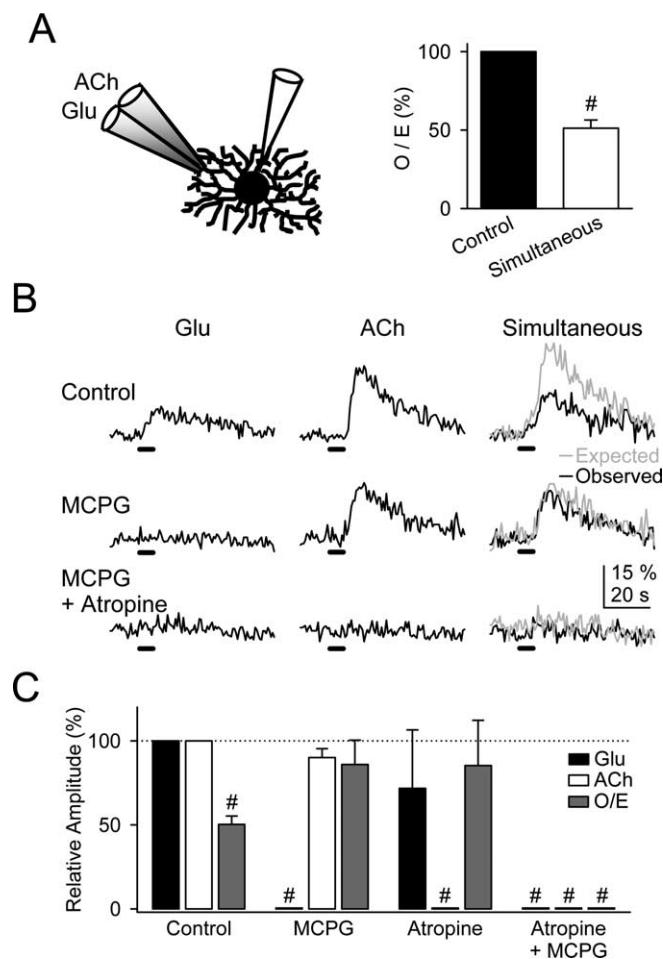
The  $\text{Ca}^{2+}$  signal modulation cannot be accounted for by the saturation of the machinery of  $\text{Ca}^{2+}$  release from internal stores or their partial depletion, because increasing the stimulation intensity (which recruits more axons) increased the  $\text{Ca}^{2+}$  levels beyond the amplitude of the expected response ( $n = 4$ ) (Fig. 2E). Furthermore, the O/E ratio did not correlate with the amplitude of the independently evoked responses ( $r^2 = 0.01$  for both SC- and alveus-induced  $\text{Ca}^{2+}$  elevations; data not shown). Moreover, some astrocytes only showed detectable  $\text{Ca}^{2+}$  elevations to either the alveus (11 of 77 cells) or the SC (24 of 77 cells) stimulation but not to stimulation of the other pathway, probably because  $\text{Ca}^{2+}$  elevations were below our detection level. Nevertheless, these astrocytes also displayed  $\text{Ca}^{2+}$  modulation after simultaneous stimulation (33 of 35 astrocytes), which suggests that practically all of the astrocytes responded to both pathways. More impor-



**Figure 3.** EPSCs evoked by SC and alveus stimulation were unaffected by the activity of either pathway. **A**, Mean EPSCs ( $n = 20$ ) elicited by the SC, alveus, and simultaneous stimulation of both pathways. **B**, Averaged EPSC amplitudes evoked by simultaneous stimulation of the SC and alveus relative to the linear summation of EPSCs evoked independently (SC plus alveus) ( $n = 5$  neurons). **C**, Mean EPSCs ( $n = 20$ ) evoked by the SC and alveus (top and bottom traces, respectively) in controls and after alveus or SC stimulation, respectively. **D**, Averaged relative EPSC amplitudes evoked by the SC and alveus in controls and after stimulation of the alveus and SC (Test), respectively ( $n = 5$  cells). **E**, Mean SC-evoked EPSCs ( $n = 20$ ) before and after stimulation of the alveus with a single train (30 Hz, 5 s). **F**, Averaged relative SC-evoked EPSC amplitudes before (Pre) and after (Post) alveus stimulation ( $n = 8$  neurons).

tant, these results support the notion that the  $\text{Ca}^{2+}$  signal modulation was not attributable to the saturation of the  $\text{Ca}^{2+}$  source.

The reduction in the  $\text{Ca}^{2+}$  signal observed during simultaneous stimulation was unlikely the result of a decrease in neurotransmitter release, because the observed inward current amplitude, which reflects the amount of released glutamate (Mennerick et al., 1996; Bergles and Jahr, 1997; Bergles et al., 1999), was similar to the expected current (Fig. 2A–C). To further address this possibility, we used a more sensitive approach to detect changes in transmitter release by recording SC- and alveus-evoked synaptic currents in CA1 pyramidal neurons. SC and alveus stimulation evoked EPSCs that were abolished by  $20 \mu\text{M}$  CNQX ( $n = 3$ ; data not shown). The synaptic currents evoked by simultaneous stimulation were not significantly different from the summation of EPSCs evoked independently ( $n = 5$ ) (Fig. 3A,B). Furthermore, the SC-evoked EPSC amplitude was not affected when preceded by the alveus-evoked EPSC ( $n = 5$  neurons) (Fig. 3C,D). Likewise, the alveus-evoked EPSC amplitude was unaffected by previous stimulation of SCs ( $n = 5$ ) (Fig. 3C,D). Together, the summation and the absence of cross-regulation of EPSCs indicate that different sets of synapses were activated by each stimulating electrode and that the amount of transmitter released by either the alveus or SC was not modified by the stimulation of the other pathway.

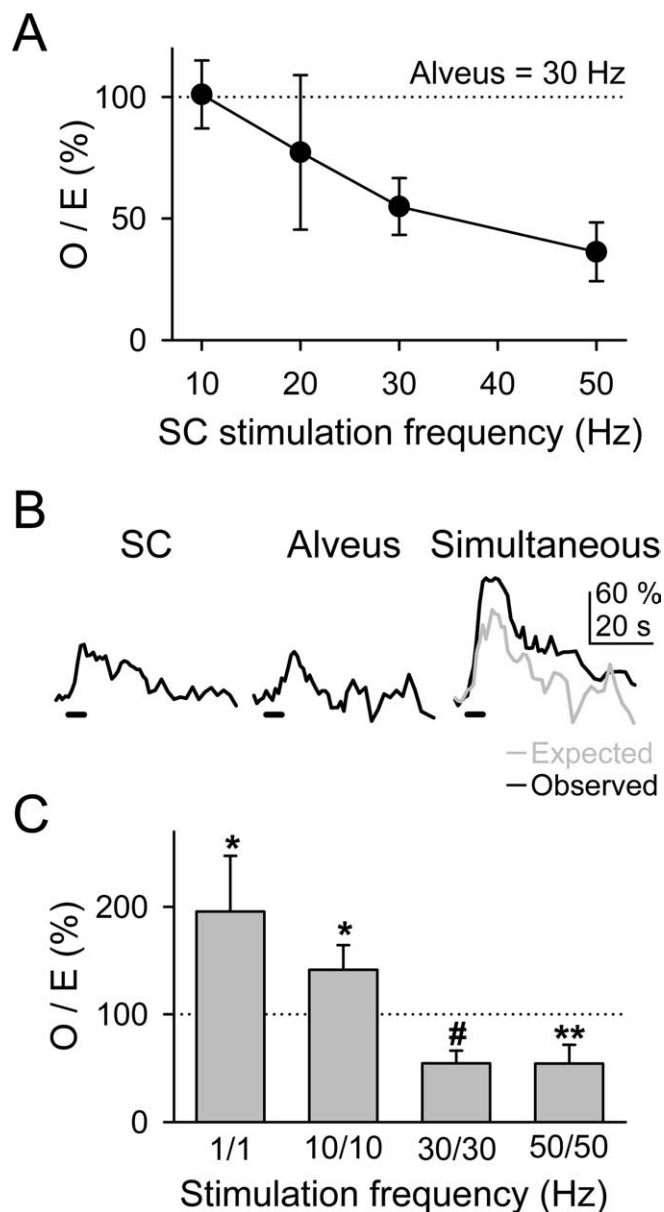


**Figure 4.**  $\text{Ca}^{2+}$  signal modulation depended on astrocytic intrinsic properties. **A**, Schematic drawing showing an astrocyte whole cell filled with fluo-3 and a double-barreled pipette filled with ACh and Glu and  $\text{Ca}^{2+}$  elevations evoked by simultaneous application of Glu and ACh relative to the linear summation of responses elicited independently (control) ( $n = 15$ ). **B**, Astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  levels evoked by independent or simultaneous ionophoresis of Glu and ACh in controls, in 0.8 mM MCPG, and after the addition of 50  $\mu\text{M}$  atropine. **C**, Relative amplitude of the  $\text{Ca}^{2+}$  elevations evoked by ionophoresis of Glu and ACh in control conditions and in 0.8 mM MCPG, 50  $\mu\text{M}$  atropine, or both. Responses evoked by simultaneous stimulation were quantified from the O/E ratio (see Results).  $n \geq 5$  for each bar. Significant differences were established by the Student's *t* test at  $\#p < 0.001$ .

Because ACh may modulate neurotransmitter release, and repetitive long-lasting stimulation of cholinergic afferents induces a slowly developing inhibition of glutamate release from SC terminals (Fernández de Sevilla and Buño, 2003), we investigated whether SC-evoked EPSCs were modulated by stimulation of cholinergic axons in the alveus with a single train of stimuli (30 Hz, 5 s) (i.e., the same parameters used to monitor astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  signal modulation). The mean SC-evoked EPSC amplitude was not significantly different before and after alveus stimulation ( $n = 8$ ) (Fig. 3*E,F*). Together, the analysis of synaptic currents indicates that possible neural network interactions could not account for the modulation of the astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  signal.

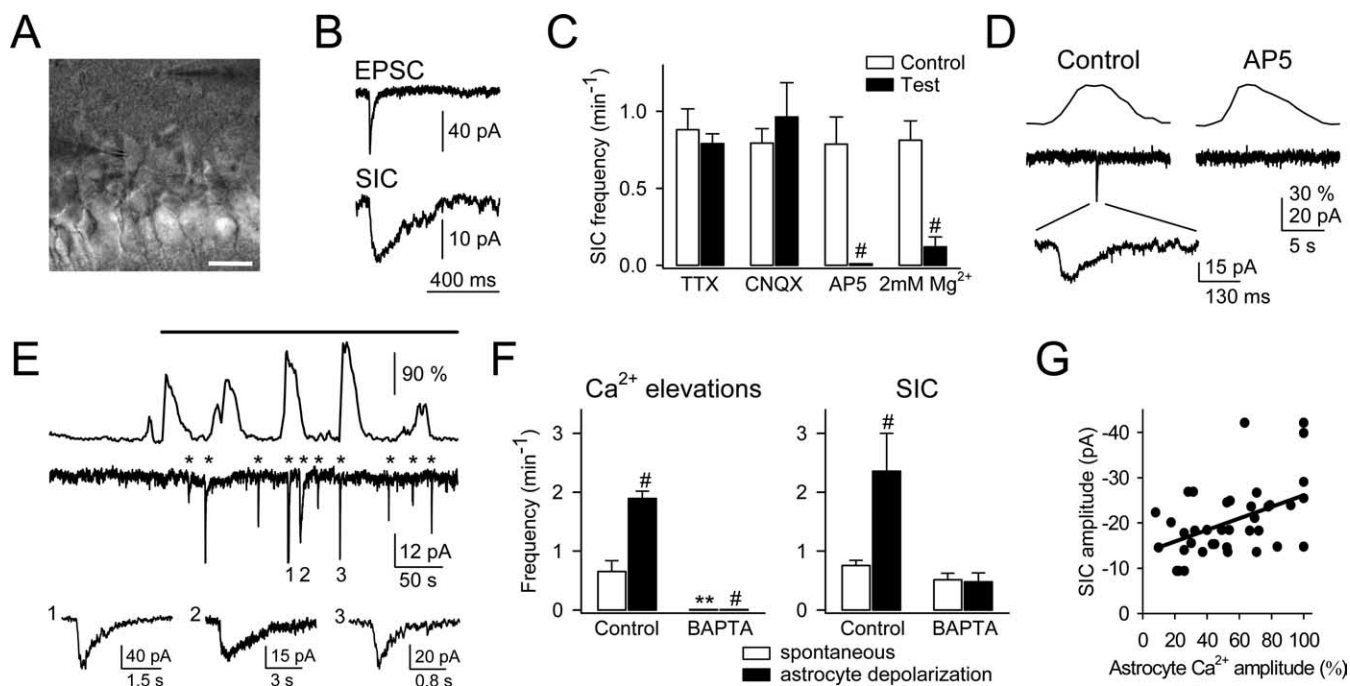
#### $\text{Ca}^{2+}$ signal modulation depends on cellular intrinsic properties of astrocytes

Because the  $\text{Ca}^{2+}$  signal modulation required receptor activation and did not depend on neural network interaction, we predicted that a similar regulation would be elicited by direct application of transmitters. To test this hypothesis, glutamate and ACh were



**Figure 5.** Modulation of the astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  signal depended on the synaptic activity level. **A**, Plot of the O/E ratio versus the SC stimulation frequency. Observed and expected  $\text{Ca}^{2+}$  elevations corresponded with the simultaneous responses and with the linear summation of the independent responses, respectively, evoked by stimulation of the alveus at 30 Hz and of the SC at variable frequencies ( $n \geq 9$  for each value). **B**,  $\text{Ca}^{2+}$  elevations evoked by independent or simultaneous stimulation of the SC and alveus with trains of stimuli at 10 Hz for 5 s. **C**, O/E ratio obtained by varying concurrently the stimulation frequencies of the SC and alveus at 1, 10, 30 and 50 Hz ( $n \geq 10$  for each bar). Significant differences from control values were established by the Student's *t* test at  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ , and  $\#p < 0.001$ .

microionophoretically applied through a double-barreled micropipette positioned close to the recorded astrocyte. Application of either glutamate or ACh for 5 s evoked  $\text{Ca}^{2+}$  elevations that were sensitive to 0.8 mM MCPG ( $n = 6$ ) and 50  $\mu\text{M}$  atropine ( $n = 5$ ), respectively.  $\text{Ca}^{2+}$  elevations evoked by simultaneous ionophoresis of both transmitters were significantly smaller than the expected responses ( $n = 15$ ) (Fig. 4*A,B*). The  $\text{Ca}^{2+}$  signal modulation disappeared when either mGluRs or mAChRs were antagonized (Fig. 4*B,C*). These results, which strongly resemble those obtained by synaptic stimulation, confirm that the  $\text{Ca}^{2+}$  signal modulation was not attributable to neuronal network reg-



**Figure 6.**  $\text{Ca}^{2+}$  elevations in astrocytes evoke NMDAR-mediated SICs in pyramidal neurons. **A**, Infrared differential interference contrast image. Note the recording pipettes to the right of the astrocyte in the stratum oriens (top) and to the left of the neuron in the pyramidal layer (bottom). Scale bar, 25  $\mu\text{m}$ . **B**, Representative EPSC and SIC recorded from a CA1 pyramidal neuron. Note their different time courses. **C**, Mean frequency of a spontaneous SIC recorded for 3–10 min in a  $\text{Mg}^{2+}$ -free condition (control) and in 1  $\mu\text{M}$  TTX, 10  $\mu\text{M}$  CNQX, 50  $\mu\text{M}$  AP-5, or 2 mM  $\text{Mg}^{2+}$  ( $n \geq 5$  for each bar). **D**, Representative  $\text{Ca}^{2+}$  levels (top traces) and whole-cell currents (bottom traces) simultaneously recorded in astrocytes and neurons, respectively. As in 69.2  $\pm$  4.8% of the cases, the neuronal SIC (expanded in the bottom trace) occurred in parallel with a  $\text{Ca}^{2+}$  elevation in an adjacent astrocyte. A concentration of 50  $\mu\text{M}$  AP-5 abolished the SIC but did not affect astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  elevations ( $n = 5$ ). **E**, Representative astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  signal and neuronal current obtained from paired whole-cell recordings in controls and after astrocyte stimulation (top horizontal bar) with 180 mV depolarizing pulses (duration, 100–500 ms) delivered every 1 s. The asterisks indicate neuronal SICs. Some SICs have been truncated, and three are expanded in the bottom traces. Note the frequency increase of both astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  elevation and neuronal SIC after astrocyte stimulation. **F**, Mean frequency of astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  elevations and neuronal SICs recorded spontaneously (□) or during astrocytic depolarization (■) in control conditions or in the presence of 20 mM BAPTA in the recording pipette of the astrocyte ( $n = 6$ ). Significant differences from control values were established by the Student's *t* test at  $***p < 0.01$  and  $\#p < 0.001$ . **G**, Plot of the neuronal SIC amplitude versus the fluorescence amplitude recorded in the soma of the astrocyte ( $n = 39$  from 6 pairs of cells). The fluorescence amplitude was normalized to the highest amplitude for each astrocyte. Only SICs that coincided with  $\text{Ca}^{2+}$  elevations were considered. Points were fitted to a linear regression (straight line;  $r^2 = 0.20$ ).

ulation, but it rather depended on cellular intrinsic properties of astrocytes.

#### Modulation of astrocytic $\text{Ca}^{2+}$ is regulated by the synaptic activity level

We investigated the relationship between the degree of synaptic activity and the modulation of the astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  signal. We first analyzed the O/E ratio at different SC stimulation frequencies (from 10 to 50 Hz; 5 s duration trains) while maintaining the alveus stimulation frequency at 30 Hz. Figure 5A shows that at these frequencies, the O/E ratio decreased as the SC stimulation frequency increased (i.e., the relative depression of the  $\text{Ca}^{2+}$  signal increased as the synaptic activity increased). Because the alveus stimulation used was relatively high (30 Hz), to study the effects of lower frequencies, we used a different stimulation paradigm by changing concomitantly the frequency of both synaptic pathways (Fig. 5B,C) and analyzed the respective O/E ratios. Whereas at high frequencies (30 and 50 Hz) the observed  $\text{Ca}^{2+}$  elevations were significantly smaller than the expected responses, at low frequencies (1 and 10 Hz), the observed responses were significantly higher, indicating the existence of a bidirectional control of the astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  signal by synaptic activity.

#### $\text{Ca}^{2+}$ elevations in astrocytes evoke NMDAR-mediated currents in neurons

To investigate the electrophysiological consequences of the astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  elevations on neuronal excitability, we performed

paired whole-cell recordings of astrocytes and CA1 pyramidal neurons, while simultaneously monitoring astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  levels. Because nerve stimulation could directly induce neuronal responses that could be erroneously identified as astrocyte-mediated events, we rather analyzed the neuronal responses to astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  elevations that occurred spontaneously or after direct depolarizing stimulation (Fig. 6A).

In the absence of extracellular  $\text{Mg}^{2+}$ , to minimize NMDAR blockade, neurons displayed spontaneous EPSCs ( $-39.8 \pm 3.9$  pA;  $n = 35$ ) as well as low-frequency ( $0.79 \pm 0.09$   $\text{min}^{-1}$ ;  $n = 17$ ) SICs ( $-18.3 \pm 1.4$  pA;  $n = 35$ ), which could be distinguished by their onset and decay time courses (EPSCs:  $\tau_{\text{on}} = 2.7 \pm 0.5$  ms, fast  $\tau_{\text{off}} = 3.7 \pm 0.6$  ms, slow  $\tau_{\text{off}} = 30.6 \pm 3.8$  ms; SIC:  $\tau_{\text{on}} = 13.9 \pm 1.7$  ms,  $\tau_{\text{off}} = 72.5 \pm 11.1$  ms;  $n = 35$ ) (Fig. 6B). The SIC frequency was insensitive to TTX ( $n = 6$ ), indicating that it was not mediated by action potential-evoked transmitter release. Furthermore, in this condition, SICs and miniature EPSCs could also be distinguished by their different kinetic properties (10–90% rise time,  $27.9 \pm 8.5$  and  $6.0 \pm 1.0$  ms, respectively; 10–90% decay time,  $193.2 \pm 29.9$  and  $24.5 \pm 3.2$  ms, respectively;  $n = 20$ ).

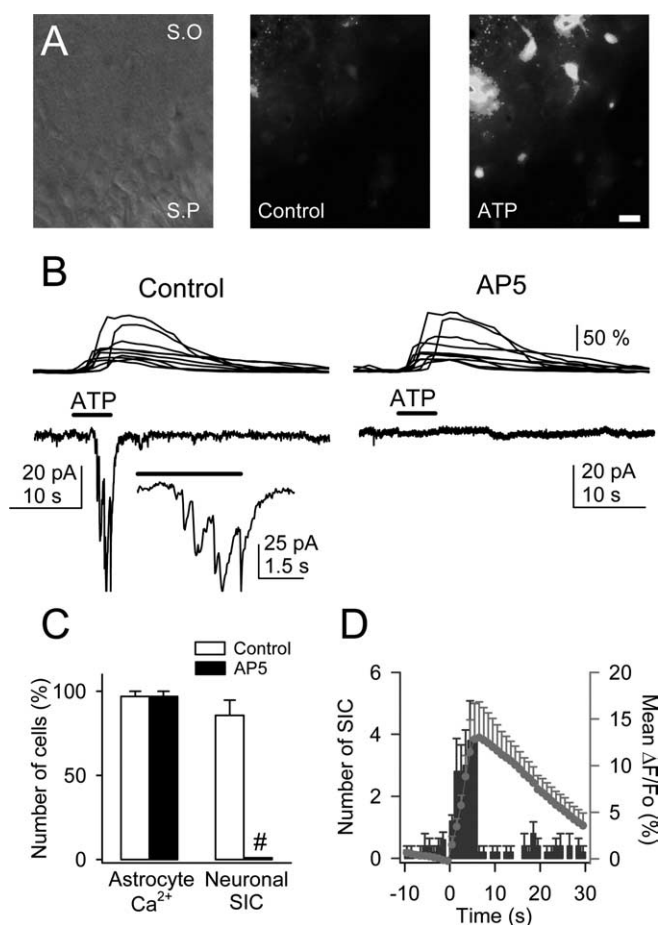
The SIC frequency was unaffected by CNQX (10  $\mu\text{M}$ ;  $n = 5$ ), but it was reduced in the presence of 2 mM  $\text{Mg}^{2+}$  (from  $0.81 \pm 0.12$  in controls to  $0.12 \pm 0.06$   $\text{min}^{-1}$ ;  $n = 6$ ) and abolished by AP-5 (50  $\mu\text{M}$ ;  $n = 5$ ), suggesting that the SIC was selectively mediated by NMDARs (Fig. 6C,D). Unexpectedly, the mean SIC amplitude was not significantly different in controls and in 2 mM  $\text{Mg}^{2+}$  ( $-22.8 \pm 3.2$  and  $-17.0 \pm 1.9$  pA, respectively;  $n = 17$ ;

$p > 0.05$ ), which is probably because of the fact that low-amplitude SICs in 2 mM  $Mg^{2+}$  were below the detection level.

Astrocytes from different brain areas exhibit spontaneous intrinsic  $Ca^{2+}$  elevations that may stimulate the release of glutamate (Pasti et al., 1997; Parri et al., 2001; Aguado et al., 2002; Nett et al., 2002). We investigated the relationship between the appearance of neuronal SIC and the intrinsic astrocytic  $Ca^{2+}$  elevations, which were simultaneously monitored in several astrocytes at a time (usually three to six astrocytes close to the recorded neuron) by previous incubation of the slices with fluo-3 AM. Most SICs ( $69.2 \pm 4.8\%$ ;  $n = 92$  from eight pair cells) were observed during  $Ca^{2+}$  elevations in an adjacent astrocyte (Fig. 6D,E). The absence of total parallelism between the astrocytic  $Ca^{2+}$  and the neuronal SIC is not unexpected, because it is likely that a fraction of the astrocytes experiencing  $Ca^{2+}$  elevations were not monitored (e.g., because they were out of focus or inefficiently loaded with fluo-3). Because stimulation of astrocytes with trains of depolarizing pulses induces  $Ca^{2+}$  elevations and oscillations (Kang et al., 1998; Zonta et al., 2003), to investigate whether the SIC frequency was modulated by the astrocyte  $Ca^{2+}$ , we directly depolarized the astrocyte through the recording pipette while simultaneously recording its  $Ca^{2+}$  levels as well as the neuronal currents. Astrocyte depolarization increased the frequency of occurrence of both astrocyte  $Ca^{2+}$  elevations and SIC ( $n = 8$ ) (Fig. 6E,F). AP-5 abolished the SIC frequency increase without affecting the frequency increase of the astrocyte  $Ca^{2+}$  elevations ( $n = 5$ ) (Fig. 6D), supporting the idea that glutamate released from astrocytes evoked the neuronal SIC. To test whether the astrocyte  $Ca^{2+}$  elevations were necessary to induce the SIC, 20 mM BAPTA was included in the recording pipette of the astrocyte. In this situation, no  $Ca^{2+}$  variations were observed in the astrocyte, either in resting or stimulated conditions, and astrocyte stimulation did not increase the SIC frequency ( $n = 6$ ) (Fig. 6F).

To confirm that  $Ca^{2+}$  elevations in astrocytes caused the neuronal SIC, we synchronized the elevation of  $Ca^{2+}$  levels in a group of astrocytes by ionophoretical application of ATP (Charles and Giaume, 2002; Nedergaard et al., 2003; Newman, 2003). In the presence of TTX, ATP increased astrocyte  $Ca^{2+}$  levels and evoked single or multiple SICs in neurons ( $-77.7 \pm 1.3$  pA;  $n = 40$  from five slices) (Fig. 7A,B). Although SICs were abolished by AP-5, the ATP-evoked  $Ca^{2+}$  elevations were unaffected ( $n = 5$  slices) (Fig. 7B,C), supporting the idea that astrocyte  $Ca^{2+}$  elevations stimulate glutamate release that evoke NMDAR-mediated neuronal currents. Despite the sustained  $Ca^{2+}$  increases, the SIC tended to occur during the rising phase of the astrocyte  $Ca^{2+}$  elevations (Fig. 7D), suggesting that the glutamate release mechanism acts as a detector of intracellular  $Ca^{2+}$  variations. Together, these results indicate that  $Ca^{2+}$  elevations in astrocytes evoke NMDAR-mediated SICs in CA1 pyramidal neurons.

We investigated whether the amplitude of the glutamate-mediated SIC depended on the amplitude of the  $Ca^{2+}$  signal detected at the astrocytic soma. We selected pairs of simultaneous neuronal SICs and astrocytic  $Ca^{2+}$  elevations (occurring spontaneously or after astrocyte depolarization) (i.e., when the recorded SIC occurred during the astrocyte  $Ca^{2+}$  elevation) and plotted the SIC amplitude against the relative fluorescence amplitude recorded in the soma of the astrocyte (Fig. 6G). The SIC amplitude was only weakly correlated with the astrocytic  $Ca^{2+}$  at the soma ( $r^2 = 0.20$ ;  $n = 39$  from six cell pairs), which would favor the idea that glutamate-mediated astrocyte-to-neuron signaling is a highly localized event occurring on restricted cellular regions



**Figure 7.** ATP-induced  $Ca^{2+}$  elevations in astrocytes evoked NMDAR-mediated SICs in pyramidal neurons. **A**, Infrared differential interference contrast image and pseudocolor images representing fluorescence intensities of a fluo-3-filled slice before and after ionophoretical application of ATP for 5 s. Note the lower relative fluorescence at the pyramidal layer. S.O., Stratum oriens; S.P., stratum pyramidale. Scale bar, 30  $\mu$ m. **B**, Astrocyte  $Ca^{2+}$  levels (top traces) and whole-cell neuronal currents (bottom traces) during ionophoretical application of ATP (horizontal bar) in TTX and without  $Mg^{2+}$  (control) and after perfusion with 50  $\mu$ M AP-5. Inset, Expanded current trace illustrating the multiple NMDAR-mediated SICs. **C**, Relative number of astrocytes and neurons that showed  $Ca^{2+}$  elevations and SICs, respectively, after application of ATP in controls and after perfusion with AP-5 ( $n = 35$  astrocytes and 5 neurons from 5 slices). Significant differences were established by the Student's *t* test at  $\#p < 0.001$ . **D**, Mean number of neuronal SICs (blue bars) and averaged astrocyte  $Ca^{2+}$  elevations (red circles) versus time ( $n = 5$  slices). Time 0 corresponds to the beginning of the ATP application (5 s).

called microdomains (Pasti et al., 1997; Grosche et al., 1999; Carmignoto, 2000; Araque et al., 2002; Haydon and Araque, 2002; Nett et al., 2002; Fiacco and McCarthy, 2004). We therefore investigated whether the  $Ca^{2+}$  signal modulation was also present at astrocytic restricted regions (Fig. 8). We were not able to identify functional microdomains [i.e., subcellular regions that respond independently to synaptic activity (Grosche et al., 1999)] because under high-frequency stimulation, which was required to depress the astrocytic response, the  $Ca^{2+}$  signal propagated throughout the cell (see below). Nevertheless, we measured the fluorescence in restricted regions of the processes with the defined magnitude of microdomains in Bergmann glia (i.e., 20–50  $\mu$ m<sup>2</sup>), and we analyzed a single region per process (Fig. 8C). Most subcellular regions (20 of 24, from 14 astrocytes) displayed  $Ca^{2+}$  signal modulation by simultaneous activation of the SC and alveus as indicated by the corresponding O/E ratio. Indeed, although the simultaneously evoked  $Ca^{2+}$  signal was reduced in 17



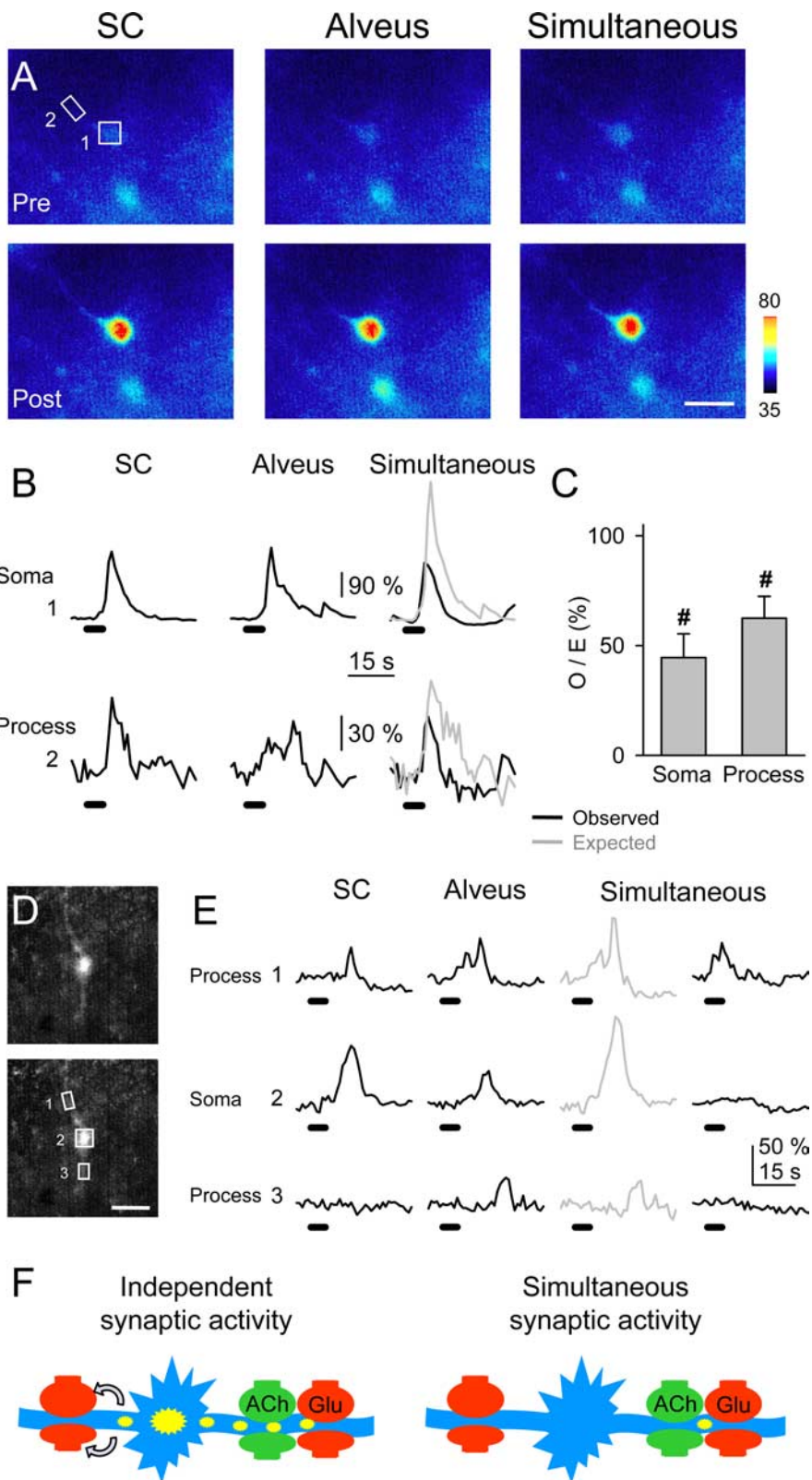
of 24 restricted regions, it was potentiated or unchanged in three and four cases, respectively, indicating that the Ca<sup>2+</sup> signal modulation is not only manifested in the soma but also in the processes.

We studied the effects of the Ca<sup>2+</sup> signal modulation on the intracellular Ca<sup>2+</sup> signal propagation. In some cases [12 of 14 cells (86%)], astrocytic responses evoked by afferent stimulation could be observed as a Ca<sup>2+</sup> elevation that initiated in a process and eventually propagated to the soma and other processes (cf. Porter and McCarthy, 1996; Pasti et al., 1997; Kang et al., 1998; Grosche et al., 1999; Parri et al., 2001). In 10 of those 14 cells (i.e., 71%), the simultaneous stimulation controlled the propagation of the synaptically evoked Ca<sup>2+</sup> signal. Indeed, Figure 8, *D* and *E*, shows an example in which alveus stimulation evoked a Ca<sup>2+</sup> increase in region 1 that later propagated with delay to the soma and region 3. After simultaneous stimulation, the observed Ca<sup>2+</sup> signal was not only relatively depressed from the expected values, but it was also confined to region 1, failing to propagate to the soma and region 3, indicating that simultaneous activity of different synapses not only modulated the amplitude of the Ca<sup>2+</sup> signal in astrocytic processes but also controlled its intracellular propagation.

Together, these results support the idea that the astrocytic subcellular microdomains are the elementary units underlying the reciprocal communication between astrocytes and neurons. Furthermore, the synaptic control of the intracellular Ca<sup>2+</sup> propagation may have important consequences on brain function by regulating the spatial range of astrocyte influence on synaptic terminals.

### Discussion

We investigated the properties of the synaptic-induced astrocytic Ca<sup>2+</sup> signal, which is a key element in reciprocal astrocyte–neuron communication. We show that hippocampal astrocytes discriminate



**Figure 8.** Astrocytic subcellular regions exhibited synaptic-mediated Ca<sup>2+</sup> modulation. *A*, Pseudocolor images representing fluorescence intensities of a fluo-3-filled astrocyte before (Pre) and 10 s after (Post) independent or simultaneous stimulation of the SC and alveus (30 Hz, 5 s). Scale bar, 15 μm. *B*, Fluorescence intensity changes in the astrocytic soma and a restricted region of the astrocytic process marked with boxes 1 and 2, respectively, in *A*. *C*, Ratio between observed and expected Ca<sup>2+</sup> elevations in the soma (*n* = 14) and restricted regions at the processes (*n* = 24). Significant differences from control values were established by the Student's *t* test at #*p* < 0.001. *D*, Fluorescent images of a fluo-3-filled astrocyte. Scale bar, 15 μm. *E*, Fluorescence intensity changes in restricted regions of two astrocytic processes (1 and 3) and soma (2) marked with boxes in *D*, evoked by independent or simultaneous stimulation of the SC and alveus (30 Hz, 5 s). Note that after alveus stimulation, Ca<sup>2+</sup> increased in region 1 and

later propagated with delay to regions 2 and 3. After simultaneous stimulation, Ca<sup>2+</sup> increased in region 1 but failed to propagate to regions 2 and 3. *F*, Schematic drawing representing a hypothetical consequence of the Ca<sup>2+</sup> signal modulation. Under independent high-frequency synaptic activity of either pathway (left), astrocyte Ca<sup>2+</sup> elevations initiate in specific processes and then propagate to the soma and other processes, eventually leading to long-distance neuromodulation by Ca<sup>2+</sup>-dependent release of glutamate (arrows). However, simultaneous high-frequency synaptic activity prevents the intracellular propagation of the astrocyte Ca<sup>2+</sup> signal and its long-distance neuromodulatory effects.

the activity of different synaptic terminals belonging to different axon pathways and that the astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  signal is bidirectionally modulated by interaction of different synaptic inputs because of cellular intrinsic properties, indicating that astrocytes integrate synaptic information.

Indeed, present data indicate that astrocytes discriminate between the activity of cholinergic and glutamatergic synapses as well as between the activity of different synapses belonging to different axon pathways (i.e., they distinguish between glutamate released from SC or alveus terminals). Furthermore, the astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  signal is modulated by the simultaneous activity of different synaptic inputs, and this regulation occurs in the absence of neural network interaction indicating that astrocytes display cellular intrinsic properties that control their excitability. We show that this modulation depended on the level of activity of synaptic terminals, being potentiated and depressed at low and high synaptic activity frequencies, respectively. This bidirectional modulation of the  $\text{Ca}^{2+}$  signal adds further complexity and degrees of freedom to the neuron–astrocyte communication and suggests that astrocytes integrate synaptic information. Furthermore, the modulation of the responses was observed also at the level of selected regions of the processes, supporting the idea that they represent the elementary units involved in neuron–astrocyte reciprocal communication (Grosche et al., 1999; Haydon and Araque, 2002; Nett et al., 2002; Fiacco and McCarthy, 2004). Finally, the simultaneous activity of different synapses also controlled the spatial extension of the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signal.

The discrimination between glutamate released from SC terminals but not from glutamatergic axons in the alveus suggests the existence of astrocytic functional domains that grant a localized neuron–astrocyte communication resulting from a highly selective synaptic activation of astrocytic receptors. Although the underlying mechanism is unknown, it can be hypothesized that GluRs and transporters are specifically located in the membrane (e.g., GluRs may be placed close to SC terminals but not to glutamatergic axons in the alveus). This inhomogeneous spatial distribution of receptors and transporters may establish extracellular pathways that allow the selective activation of astrocytic GluRs by specific synaptic terminals. In the CA1 region of the hippocampus, this discrimination would promote feedforward versus feedback glutamatergic neuron–astrocyte communication, because although astrocytes responded to glutamatergic SCs (i.e., CA3 to CA1 signaling), they did not respond to glutamatergic axons in the alveus (e.g., CA1 to CA1 signaling provided by recurrent collaterals from CA1 pyramidal neurons). Therefore, astrocyte discrimination of neurotransmitters represents a cellular property that defines signaling pathways between neurons and astrocytes.

On the other hand, considering that the astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  can be selectively increased in different processes and that astrocytes release glutamate through a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent mechanism, the discrimination between two different transmitters (glutamate and ACh) grants a specific spatial distribution of the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent neuromodulatory effects on different synapses. For instance, although during theta rhythm both glutamatergic and cholinergic terminals from axons originated in the septum and diagonal band of Broca might be active,  $\text{Ca}^{2+}$  would increase only in astrocytic processes that respond to ACh, and only synapses close to those processes would be selectively modulated (unless the  $\text{Ca}^{2+}$  signal propagates along the astrocyte), whereas synapses close to glutamate-responding processes would be unaffected.

The ability of most neurotransmitters to increase astrocytic

$\text{Ca}^{2+}$  levels is firmly established (Porter and McCarthy, 1997; Verkhratsky et al., 1998). Recent reports have shown that astrocytic receptor activation by exogenously applied transmitters may have synergistic effects that increase the  $\text{Ca}^{2+}$  signal (Fatatis et al., 1994; Cormier et al., 2001; Sul et al., 2004). Although previous studies only reported synaptic-induced increases or synergistic enhancements of the astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  signal, the existence of neuronal signaling that reduces  $\text{Ca}^{2+}$  levels was unknown. Here we show that the simultaneous activity of cholinergic and glutamatergic synapses may induce the relative reduction of the  $\text{Ca}^{2+}$  signal, which indicates that negative cooperative actions of neurotransmitters may occur and that the astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  signal is susceptible of relative depression, which might represent a form of inhibition. Therefore, the existence of positive and negative cooperative actions of neurotransmitters confers a higher degree of complexity to the properties of the information transfer between neurons and astrocytes.

Numerous  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent cellular phenomena may be regulated by the astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  signal modulation. Regarding astrocyte–neuron communication, it may be crucial in the regulation of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent release of transmitters, such as glutamate, and therefore in their neuromodulatory effects. Furthermore, although low-frequency synaptic activity usually leads to  $\text{Ca}^{2+}$  elevations that remain restricted to individual astrocytic processes, high-frequency evoked  $\text{Ca}^{2+}$  elevations initiate in specific processes and then propagate to the soma and other processes (Porter and McCarthy, 1996; Pasti et al., 1997; Kang et al., 1998; Grosche et al., 1999). This has been proposed to be the basis of a code for neuron–astrocyte communication that is decoded into feedback and feedforward signals that define the spatial extension of astrocyte-induced neuromodulation (Fellin and Carmignoto, 2004). Present findings, however, show that the astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  modulation controls the intracellular propagation of the  $\text{Ca}^{2+}$  signal, indicating that the characteristics of the neuron–astrocyte communication is not only determined by the synaptic activity level but also by the spatiotemporal features of the activity of the different incoming synaptic inputs. Furthermore, considering the demonstration that astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  evokes NMDAR-mediated currents in CA1 pyramidal neurons, which supports the neuromodulatory role of glutamate released by astrocytes, the synaptic control of the  $\text{Ca}^{2+}$  signal propagation may have important consequences on brain function by regulating the spatial range of astrocyte influence on synaptic terminals and cerebral microcirculation.

Although we did not attempt to determine the cellular mechanisms responsible for the  $\text{Ca}^{2+}$  signal modulation, current data suggest that this mechanism does not rely on neural network interaction, rather it results from regulatory phenomena at the intracellular level, supporting the existence of cellular intrinsic properties. Although we cannot discard the existence of undetected  $\text{Ca}^{2+}$  signal, the fact that this regulation did not seem to require detectable  $\text{Ca}^{2+}$  elevations evoked by both pathways suggests that the limiting factor modulating the  $\text{Ca}^{2+}$  signal may not depend on the  $\text{Ca}^{2+}$  itself and that it resides upstream the  $\text{Ca}^{2+}$  release from the internal stores. Nevertheless, additional studies aimed at determining the possible interaction between the intracellular signaling pathways are required to elucidate the underlying molecular mechanism.

$\text{Ca}^{2+}$  elevations in astrocytes stimulate the release of glutamate, which acting on presynaptic or postsynaptic receptors modulates synaptic transmission and neuronal excitability (Araque et al., 1998a,b; Kang et al., 1998; Parri et al., 2001; Pasti et al., 2001; Brockhaus and Deitmer, 2002; Fiacco and McCarthy,

2004; Liu et al., 2004). Here we show that  $\text{Ca}^{2+}$  elevations in astrocytes induced slowly developing and long-lasting NMDAR-dependent currents in hippocampal pyramidal neurons. Similar currents, originally described in cultured cells and termed SIC (Araque et al., 1998a), have been recorded during spontaneous astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  elevations in thalamic neurons, where they are thought to play some role in neural network maturation (Parri et al., 2001). Furthermore, while the present manuscript was in preparation, two recent articles have reported the presence of neuronal NMDAR-mediated SICs that can be triggered by stimuli that evoke  $\text{Ca}^{2+}$  elevations in astrocytes (Angulo et al., 2004; Fellin et al., 2004) and that can serve to synchronize neuronal activity. Our results describing the cellular mechanisms of the astrocyte-induced SICs in neurons are in close agreement with those findings. The differences between the mean SIC amplitude described here and that reported by Fellin et al. (2004) may partially be attributable to the different experimental conditions. Indeed, although this group analyzed SICs after strong SC stimulation or perfusion with (*RS*)-3,5-dihydroxyphenylglycine (i.e., when many astrocytes were activated), we studied SICs that occurred spontaneously or after depolarization of a single astrocyte, suggesting that the SICs reported here correspond to unitary events. Consistent with this idea, we show that local application of ATP, which stimulates numerous astrocytes (Fig. 7), evoked SICs of higher amplitude. Therefore, the different number of stimulated astrocytes in the different conditions could account for the observed differences in the SIC amplitudes. Nevertheless, the mean amplitude of the spontaneous SICs reported by Fellin et al. (2004) is also significantly higher than the mean amplitude of those described here. The origin of this difference is unknown but might be simply attributable to different detection criteria. Nevertheless, the similar pharmacological and kinetic properties of the spontaneous SICs recorded by Fellin et al. (2004) and by us suggest that they correspond to the same type of events.

The occurrence of SICs during a synaptic-evoked astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  signal was not investigated because nerve stimulation could directly induce neuronal responses that could be erroneously identified as astrocyte-mediated SICs. Therefore, these SICs are not necessarily linked to a neuron-evoked  $\text{Ca}^{2+}$  signal. Although it might seem likely that stimuli that evoked  $\text{Ca}^{2+}$  elevations may lead to similar consequences, additional studies are required to characterize the dependence of SICs on a neuron-evoked astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  signal.

Although we did not explore the physiological meaning of the SICs reported here, the fact that they represent NMDAR-mediated responses, suggests that, besides the reported neuronal synchronization, the astrocyte–neuron communication may serve to the postsynaptic neuron as a coincidence detection mechanism between synaptic and astrocytic signaling.

Cholinergic transmission plays an important role in the physiology of the hippocampus, being involved in the generation of the hippocampal theta rhythm and in some forms of synaptic plasticity, such as long-term potentiation, by interacting with glutamatergic transmission (Auerbach and Segal, 1996; Buzsáki, 2002). The current demonstration that the astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  signal is modulated by the simultaneous activity of both glutamatergic and cholinergic synapses suggests that astrocytes might participate in these phenomena. Furthermore, we show that astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  signal is potentiated when both types of synaptic terminals are coincidentally active at relative low frequencies (between 1 and 10 Hz) that are in the range of the theta rhythm. Therefore, it is tempting to speculate that astrocytes may act as coincidence detector elements potentiating their intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signal during the theta

rhythm, being thus possibly involved in this functional state of the hippocampus.

In conclusion, the ability of astrocytes to discriminate between the activity of different synapses belonging to different axon pathways, the bidirectional modulation of the astrocytic cellular excitability by the synaptic activity, and the expression of cellular intrinsic properties indicate that astrocytes are endowed with cellular computational characteristics that integrate synaptic information. Therefore, in addition to neurons, astrocytes could also be considered as cellular elements involved in the information processing by the nervous system.

## References

- Aguado F, Espinosa-Parrilla JF, Carmona MA, Soriano E (2002) Neuronal activity regulates correlated network properties of spontaneous calcium transients in astrocytes in situ. *J Neurosci* 22:9430–9444.
- Angulo MC, Kozlov AS, Charpak S, Audinat E (2004) Glutamate released from glial cells synchronizes neuronal activity in the hippocampus. *J Neurosci* 24:6920–6927.
- Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG (1998a) Glutamate-dependent astrocyte modulation of synaptic transmission between cultured hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 10:2129–2142.
- Araque A, Sanzgiri RP, Parpura V, Haydon PG (1998b) Calcium elevation in astrocytes causes an NMDA receptor-dependent increase in the frequency of miniature synaptic currents in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* 18:6822–6829.
- Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG (1999) Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci* 22:208–215.
- Araque A, Li N, Doyle RT, Haydon PG (2000) SNARE protein-dependent glutamate release from astrocytes. *J Neurosci* 20:666–673.
- Araque A, Martin ED, Perea G, Arellano JI, Buño W (2002) Synaptically released acetylcholine evokes  $\text{Ca}^{2+}$  elevations in astrocytes in hippocampal slices. *J Neurosci* 22:2443–2450.
- Auerbach JM, Segal M (1996) Muscarinic receptors mediating depression and long-term potentiation in rat hippocampus. *J Physiol (Lond)* 492:479–493.
- Auld DS, Robitaille R (2003) Glial cells and neurotransmission: an inclusive view of synaptic function. *Neuron* 40:389–400.
- Beattie EC, Stellwagen D, Morishita W, Bresnahan JC, Ha BK, Von Zastrow M, Beattie MS, Malenka RC (2002) Control of synaptic strength by glial TNF $\alpha$ . *Science* 295:2282–2285.
- Bergles DE, Jahr CE (1997) Synaptic activation of glutamate transporters in hippocampal astrocytes. *Neuron* 19:1297–1308.
- Bergles DE, Diamond JS, Jahr CE (1999) Clearance of glutamate inside the synapse and beyond. *Curr Opin Neurobiol* 9:293–298.
- Bergles DE, Roberts JD, Somogyi P, Jahr CE (2000) Glutamatergic synapses on oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. *Nature* 405:187–191.
- Bezzi P, Carmignoto G, Pasti L, Vesce S, Rossi D, Rizzini B, Pozzan T, Volterra A (1998) Prostaglandins stimulate  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent glutamate release in astrocytes. *Nature* 391:281–285.
- Bezzi P, Gundersen V, Galbete JL, Seifert G, Steinhauser C, Pilati E, Volterra A (2004) Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. *Nat Neurosci* 7:613–620.
- Brockhaus J, Deitmer JW (2002) Long-lasting modulation of synaptic input to Purkinje neurons by Bergmann glia stimulation in rat brain slices. *J Physiol (Lond)* 545:581–593.
- Buzsáki G (2002) Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron* 33:325–340.
- Carmignoto G (2000) Reciprocal communication systems between astrocytes and neurons. *Prog Neurobiol* 62:561–581.
- Charles AC, Giaume C (2002) Intercellular calcium waves in astrocytes: underlying mechanisms and functional significance. In: *The tripartite synapse: glia in synaptic transmission* (Volterra A, Magistretti PJ, Haydon PG, eds), pp 110–126. New York: Oxford UP.
- Cormier RJ, Mennerick S, Melbostad H, Zorumski CF (2001) Basal levels of adenosine modulate mGluR5 on rat hippocampal astrocytes. *Glia* 33:24–35.
- Fatatis A, Holtzclaw LA, Avidor R, Brenneman DE, Russell JT (1994) Vasoactive intestinal peptide increases intracellular calcium in astroglia: syn-

- ergism with alpha-adrenergic receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:2036–2040.
- Fellin T, Carmignoto G (2004) Neuron-to-astrocyte signaling in the brain represents a distinct multifunctional unit. *J Physiol (Lond)* 559:3–15.
- Fellin T, Pascual O, Gobbo S, Pozzan T, Haydon PG, Carmignoto G (2004) Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors. *Neuron* 43:729–743.
- Fernández de Sevilla D, Buño W (2003) Presynaptic inhibition of Schaffer collateral synapses by stimulation of hippocampal cholinergic afferent fibers. *Eur J Neurosci* 17:555–558.
- Fiacco TA, McCarthy KD (2004) Intracellular astrocyte calcium waves *in situ* increase the frequency of spontaneous AMPA receptor currents in CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* 24:722–732.
- Grosche J, Matyash V, Moller T, Verkhratsky A, Reichenbach A, Kettenmann H (1999) Microdomains for neuron-glia interaction: parallel fiber signaling to Bergmann glial cells. *Nat Neurosci* 2:139–143.
- Haydon PG (2001) Glia: listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci* 2:185–193.
- Haydon PG, Araque A (2002) Astrocytes as modulators of synaptic transmission. In: *The tripartite synapse: glia in synaptic transmission* (Volterra A, Magistretti PJ, Haydon PG, eds), pp 185–198. New York: Oxford UP.
- Kang J, Jiang L, Goldman SA, Nedergaard M (1998) Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nat Neurosci* 1:683–692.
- Latour I, Gee CE, Robitaille R, Lacaille JC (2001) Differential mechanisms of Ca<sup>2+</sup> responses in glial cells evoked by exogenous and endogenous glutamate in rat hippocampus. *Hippocampus* 11:132–145.
- Lewis PR, Shute CCD (1967) The cholinergic limbic system: projections to hippocampal formation, medial cortex, nuclei of the ascending cholinergic reticular system, and the subfornical organ and supra-optic crest. *Brain* 90:521–540.
- Li X-G, Somogyi P, Ylinen A, Buzsáki G (1994) The hippocampal CA3 network: an *in vivo* intracellular labeling study. *J Comp Neurol* 339:181–208.
- Liu QS, Xu Q, Arcuino G, Kang J, Nedergaard M (2004) Astrocyte-mediated activation of neuronal kainate receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:3172–3177.
- McCormick DA (1998) Membrane properties and neurotransmitter actions. In: *The synaptic organization of the brain* (Shepherd GM, ed), pp 37–75. New York: Oxford UP.
- Mennerick S, Benz A, Zorumski CF (1996) Components of glial responses to exogenous and synaptic glutamate in rat hippocampal microcultures. *J Neurosci* 16:55–64.
- Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA (2003) New roles for astrocytes: Redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci* 26:523–530.
- Nett WJ, Oloff SH, McCarthy KD (2002) Hippocampal astrocytes *in situ* exhibit calcium oscillations that occur independent of neuronal activity. *J Neurophysiol* 87:528–537.
- Newman EA (2003) New roles for astrocytes: regulation of synaptic function. *Trends Neurosci* 26:536–542.
- Newman EA, Zahs KR (1998) Modulation of neuronal activity by glial cells in the retina. *J Neurosci* 18:4022–4028.
- Parpura V, Haydon PG (2000) Physiological astrocytic calcium levels stimulate glutamate release to modulate adjacent neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:8629–8634.
- Parri HR, Gould TM, Crunelli V (2001) Spontaneous astrocytic Ca<sup>2+</sup> oscillations *in situ* drive NMDAR-mediated neuronal excitation. *Nat Neurosci* 4:803–812.
- Pasti L, Volterra A, Pozzan T, Carmignoto G (1997) Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes *in situ*. *J Neurosci* 17:7817–7830.
- Pasti L, Zonta M, Pozzan T, Vicini S, Carmignoto G (2001) Cytosolic calcium oscillations in astrocytes may regulate exocytotic release of glutamate. *J Neurosci* 21:477–484.
- Porter JT, McCarthy KD (1996) Hippocampal astrocytes *in situ* respond to glutamate released from synaptic terminals. *J Neurosci* 16:5073–5081.
- Porter JT, McCarthy KD (1997) Astrocytic neurotransmitter receptors *in situ* and *in vivo*. *Prog Neurobiol* 51:439–455.
- Robitaille R (1998) Modulation of synaptic efficacy and synaptic depression by glial cells at the frog neuromuscular junction. *Neuron* 21:847–855.
- Shelton MK, McCarthy KD (1999) Mature hippocampal astrocytes exhibit functional metabotropic and ionotropic glutamate receptors *in situ*. *Glia* 26:1–11.
- Sul JY, Orosz G, Givens RS, Haydon PG (2004) Astrocytic connectivity in the hippocampus. *Neuron Glia Biol* 1:3–11.
- Verkhratsky A, Orkand RK, Kettenmann H (1998) Glial calcium: homeostasis and signaling function. *Physiol Rev* 78:99–141.
- Volterra A, Bezzi P (2002) Release of transmitters from glial cells. In: *The tripartite synapse: glia in synaptic transmission* (Volterra A, Magistretti PJ, Haydon PG, eds), pp 164–184. New York: Oxford UP.
- Zhang J, Wang H, Ye C, Ge W, Chen Y, Jiang Z, Wu C, Poo M, Duan S (2003) ATP released by astrocytes mediates glutamatergic activity-dependent heterosynaptic suppression. *Neuron* 40:971–982.
- Zhang Q, Fukuda M, Van Bockstaele E, Pascual O, Haydon PG (2004) Synaptotagmin IV regulates glial glutamate release. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:9441–9446.
- Zonta M, Angulo MC, Gobbo S, Rosengarten B, Hossmann KA, Pozzan T, Carmignoto G (2003) Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat Neurosci* 6:43–50.

# Glial calcium signaling and neuron–glia communication

Gertrudis Perea, Alfonso Araque\*

*Instituto Cajal, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Doctor Arce 37, Madrid 28002, Spain*

Received 20 June 2005; accepted 28 June 2005

## Abstract

The existence of bidirectional signaling between astrocytes and neurons has revealed an important active role of astrocytes in the physiology of the nervous system. As a consequence, there is a new concept of the synaptic physiology—“the tripartite synapse”, where astrocytes exchange information with the pre- and postsynaptic elements and participate as dynamic regulatory elements in neurotransmission. The control of the  $\text{Ca}^{2+}$  excitability in astrocytes is a key element in this loop of information exchange. The ability of astrocytes to respond to neuronal activity and discriminate between the activity of different synapses, the modulation of the astrocytic cellular excitability by the synaptic activity, and the expression of cellular intrinsic properties indicate that astrocytes are endowed with cellular computational characteristics that process synaptic information. Therefore, we propose that astrocytes can be considered as cellular elements involved in the information processing by the nervous system.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

*Keywords:* Astrocyte–neuron communication; Calcium signal modulation; Neurotransmitters release; Information processing

## 1. Introduction

Since the initial studies of the nervous system, neurons were recognized as the cellular elements responsible for the information processing of the nervous system, while glial cells were considered to play a simple supportive role for neurons. The fundamental attribute of neurons is their cellular electrical excitability, which is based on the expression of a plethora of ligand- and voltage-gated membrane channels that give rise to prominent membrane currents and membrane potential variations that represent the biophysical substrate underlying the transfer and integration of information at the cellular level. In contrast, glial cells are non-electrically excitable because, being able to express most of the membrane channels expressed by neurons, the level of expression of some key channels is relatively low to grant active electrical behaviors in response to different stimuli. Nevertheless, glial cells display a form of excitability that is based on variations of the  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in the cytosol rather than electrical changes in the membrane. This excitability may

serve as a cellular information element, which suggest the ability of glia to play more active roles in the nervous system previously thought.

Glial cells in the central nervous system (CNS) have been classified in two major cell groups, macroglia and microglia. Microglia are phagocytic cells involved in inflammatory responses. Macroglia are composed of oligodendrocytes, astrocytes, and ependymoglia cells (a specialized glia that line the ventricles). Oligodendrocytes—and their equivalent in the peripheral nervous system (PNS), Schwann cells—form the myelin ensheaths that enwrap axons. Astrocytes may display different morphologies and phenotypes, such as Müller cells in the retina, Bergmann glia in the cerebellum, protoplasmic astrocytes in the gray matter, fibrous astrocytes in the white matter tracts, perivascular astrocytes that form extensive endfoot that contact with blood vessels, etc. (for a comprehensive description of glial cells, see [1]). Among the different types of glial cells, astrocytes have received special attention, probably because their intimate spatial relationship with neurons and synapses in the CNS. Although the importance of other glial cells on nervous system function must not be diminished, present review will focus on recent findings regard-

\* Corresponding author. Tel.: +34 91 585 4712; fax: +34 91 585 4754.  
E-mail address: araque@cajal.csic.es (A. Araque).

ing the characteristics of the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in astrocytes.

In addition to the well-known functions of astrocytes in different physiological processes of the nervous system, such as differentiation, proliferation and trophic support and survival of neurons, new findings have recently proposed the existence of bidirectional communication between astrocytes and neurons, where the astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  signal plays a crucial role (for reviews see [2–5]). We will center our discussion on the synaptic control and the consequences on neuronal physiology of the astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  signal, which serving as a key element in this new form of intercellular communication in the nervous system indicates that astrocytes actively participate in brain physiology.

## 2. Intracellular $\text{Ca}^{2+}$ variations represent the biophysical substrate of the cellular excitability in astrocytes

Unlike neurons, glial cells are non-electrically excitable, and consequently they were classically considered not to be involved as active elements in the information processing of the nervous system—a function that remained exclusively attributed to neurons. The development and application of imaging techniques that allowed the monitoring of the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  was decisive to revive the interest for glial cells, and to establish new investigation pathways in the physiology of astrocytes and their potential interaction with neurons. The original demonstration that astrocytes display a form of excitability based on changes in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration [6] constituted a challenging observation that prompted a re-examination of the actual role of astrocytes in the brain function.

Cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  serves as an intracellular signal that is responsible for controlling a plethora of cellular processes. In the nervous system, it is well known the role of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  in numerous physiological processes in neurons, e.g., controlling neuronal excitability, neurotransmitter release or synaptic plasticity. In addition, astrocytes show intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  variations that can be observed either spontaneously or in response to different neurotransmitters and that may serve as an intracellular and intercellular signal with relevant functional consequences in the nervous system. The cellular  $\text{Ca}^{2+}$  signal is manifested as elevations of cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  and relies on the existence of a relatively low concentration of free  $\text{Ca}^{2+}$  inside the cells. While electrically excitable cells may use the electrochemical gradient across the plasma membrane to effectively increase the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels due to the high expression of specific ligand- and voltage-gated ionic channels that allow the rapid and massive influx of  $\text{Ca}^{2+}$  ions, non-electrically excitable cells use the  $\text{Ca}^{2+}$  stored in the endoplasmic reticulum as the main source for cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  signal.  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization from the internal stores mainly depends on activation of two types of receptors: ryanodine receptors, sensitive to  $\text{Ca}^{2+}$ , ryanodine and caffeine;

and inositol 1,4,5,-triphosphate ( $\text{IP}_3$ ) receptors, that are sensitive to  $\text{IP}_3$  produced by activation of phospholipase C (PLC) (a comprehensive description of these intracellular signaling pathways are reviewed elsewhere in this special issue).

The astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  signal can be manifested as  $\text{Ca}^{2+}$  elevations with different temporal patterns (Fig. 1). In some cases, astrocytes display a single relatively fast transient  $\text{Ca}^{2+}$  elevation (i.e., spike) that eventually can be followed by a more sustained response (i.e., plateau). In other cases, astrocytes exhibit irregular  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations that can be modulated in amplitude, duration and frequency by different stimuli including the synaptic activity level [7–11]. The astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  elevation may act as intra and intercellular signal that can propagate within and between astrocytes, signaling to different regions of the cell and to different cells. Moreover, this cellular excitability may be present spontaneously, or can be elicited and modulated by the synaptic activity [7,9,10,12–19].

## 3. Astrocytes display endogenous $\text{Ca}^{2+}$ excitability: spontaneous $\text{Ca}^{2+}$ oscillations

Astrocytes display an endogenous excitability manifested as spontaneous intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations that occur in the absence of neuronal activity (Fig. 1D). These spontaneous  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations have been observed in situ in astrocytes from different brain areas, such as ventrobasal thalamus [12,18], hippocampus [12,17], cerebellum [12,20], and neocortex [12,21]. They are developmentally regulated and depend on the  $\text{Ca}^{2+}$  release from the  $\text{IP}_3$ -sensitive intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores [12,17,18]. Although the functional significance of these spontaneous  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations remains to be fully explored, some evidences support the appealing idea that they may serve to the proper development and maturation of the neural network [18]. Indeed,  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations in thalamic astrocytes correlate with the presence of NMDA receptor-mediated currents in thalamic neurons [18], which is consistent with  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent glutamate release from astrocytes (see below). Hence, it has been proposed that astrocytes could serve as an autonomous source of glutamate for generation and modulation of neuronal activity [18].

## 4. Intercellular $\text{Ca}^{2+}$ waves: astrocyte-to-astrocyte communication

Pioneering studies performed in cultured astrocytes demonstrated that  $\text{Ca}^{2+}$  elevations originated in one astrocyte can propagate non-decrementally to neighboring astrocytes, forming a  $\text{Ca}^{2+}$  wave that can extend for several hundreds micrometers [6,8,22] (Fig. 1A). Therefore,  $\text{Ca}^{2+}$  elevations that form  $\text{Ca}^{2+}$  waves may serve as a form of long-range intercellular communication between astrocytes. The mechanisms underlying the propagation of the  $\text{Ca}^{2+}$  waves have been extensively investigated and the proposed hypothesis

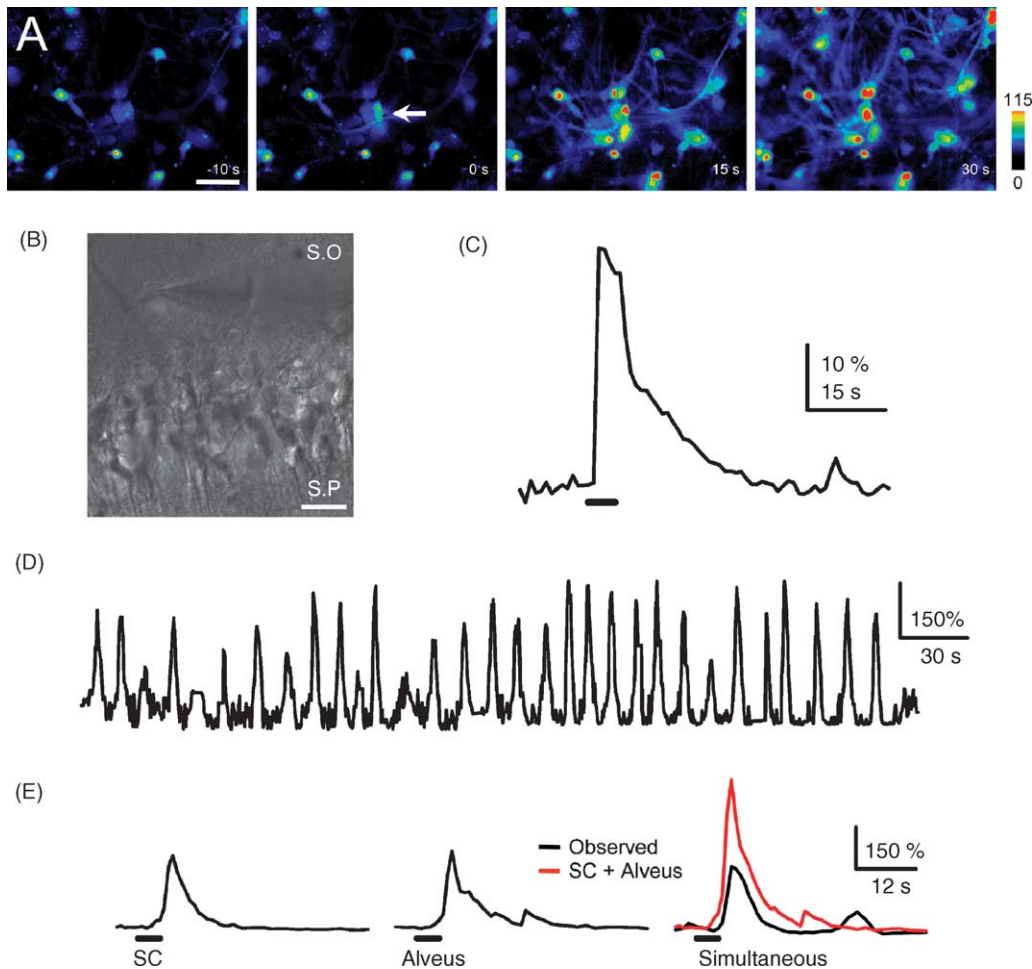


Fig. 1. Representative  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in astrocytes. (A) Intercellular  $\text{Ca}^{2+}$  wave in culture rat hippocampal astrocytes. Astrocytes were bulk loaded with  $\text{Ca}^{2+}$  indicator  $\text{Ca}^{2+}$ -Green 1 to monitor the stimulus-induced  $\text{Ca}^{2+}$  elevations in astrocytes. Images in pseudocolor mode represent fluorescence intensity of  $\text{Ca}^{2+}$ -Green 1 emission taken during and after mechanical stimulation of a cell (indicated by arrow) at the times indicated. Zero time corresponds to the time of stimulation. Mechanical stimulation increased intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  in the directly stimulated cell as well as in neighbouring unstimulated astrocytes, forming a  $\text{Ca}^{2+}$  wave. Scale bar,  $40\ \mu\text{m}$ . (B) Infrared differential interference contrast (DIC) image of a hippocampal slice, showing the stratum pyramidale (SP) and the recorded astrocyte in the stratum oriens (SO). Note the recording pipette on the right side of the astrocyte. Scale bar,  $25\ \mu\text{m}$ . (C) Representative astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  elevations elicited in hippocampal slices by synaptic stimulation. Horizontal line at the bottom of the trace represents the stimulus (30 Hz, 5 s), as in other figures. (D) Representative  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations in one astrocyte in hippocampal slice. (E) The astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  signal was modulated by the simultaneous activity of alveus and SC synaptic terminals (30 Hz, 5 s). In simultaneous stimulation condition, black and red traces correspond to the observed responses and the summation of the responses evoked by independent stimulation of both pathways (SC + Alveus).

have been largely debated and revised. Three different models are currently proposed (for a thorough description see [23]): (1)  $\text{IP}_3$  diffusion through gap junction channels;  $\text{IP}_3$  produced in the stimulated cell would diffuse through gap junctions to interconnected neighboring astrocytes. (2) Regenerative ATP; ATP released either through connexin hemichannels or  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent exocytosis would act as extracellular messenger activating purinergic receptors in neighboring cells and initiating a cascade that would involve PLC activation,  $\text{IP}_3$  production and  $\text{Ca}^{2+}$  elevations, which would result in subsequent ATP release that regeneratively would propagate the wave. (3) Point source ATP release; the activation of purinergic receptors in neighboring cells by the extracellular diffusion of ATP released exclusively from the stimulated cell would be responsible for the wave. It is noteworthy that these

mechanisms are not necessarily mutually exclusive; rather it is feasible that they might coexist in different brain areas or under different conditions.

While  $\text{Ca}^{2+}$  waves have been clearly demonstrated and thoroughly characterized in cell culture preparations (e.g., [6,8,24–26]), in the vertebrate retina [22], and in organotypic brain slices [27], their existence in more intact preparations, such as acute brain slices, has been scarcely studied and is still controversial. Intercellular  $\text{Ca}^{2+}$  waves have been observed in corpus callosum glial cells [28], and in rat cortical slices [21] where they have been associated with the cortical spreading depression, a pathological phenomenon evoked in ischemia and brain trauma that is characterized by a slowly propagating wave of neuronal depolarization in the mammalian brain [29]. Temporal correlation between astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations has

also been reported in hippocampal and cortical slices [12], although such correlation may not be necessarily due to the existence of  $\text{Ca}^{2+}$  waves, but to the synchronization induced by the neuronal activity. The latter interpretation is supported by studies that reported the absence of  $\text{Ca}^{2+}$  waves between adjacent astrocytes in hippocampal [17,30] and neocortical slices [18], where spontaneous  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations seems to be independent of the neuronal activity, which suggest that at least this oscillatory activity does not propagate between neocortical astrocytes. Recently, Sul et al. [31] showed in hippocampal slices that  $\text{Ca}^{2+}$  elevations in single astrocytes evoked may spread to some, but not all, neighboring cells, and that the number of responding astrocytes may be regulated by the simultaneous exogenous application of different transmitters, suggesting the existence of plastic functional circuits between astrocytes [31].

### 5. Astrocyte $\text{Ca}^{2+}$ signal is evoked by synaptic activity: neuron-to-astrocyte communication

Astrocytes express both in vitro and in situ a wide variety of functional receptors for many neurotransmitters (including glutamate, adenosine, norepinephrine, GABA, histamine, ATP, acetylcholine, etc.) (e.g., [1,19]). Most of the receptors expressed by astrocytes are metabotropic receptors associated with G proteins that upon activation stimulate phospholipase C and the formation of  $\text{IP}_3$ , which increases the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration through the  $\text{Ca}^{2+}$  release from the  $\text{IP}_3$ -sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  stores [7,9,13–15,19]. While these receptors can be experimentally activated by exogenous application of agonists, the demonstration that they also can be activated by neurotransmitters released from presynaptic terminals eliciting  $\text{Ca}^{2+}$  elevations in astrocytes is extremely relevant because it implies the existence of neuron-to-astrocyte communication, which represents a new form of intercellular signaling between neurons and astrocytes in the CNS [7,9,10,14].

The synaptic control of the glial  $\text{Ca}^{2+}$  signal has been demonstrated in representative brain areas, such as the retina [32], cerebellum [16,20], hippocampus [7,9,10,13,19], and cortex [21] (Fig. 1B and C). However, further studies are required to elucidate the existence and properties of this phenomenon in other brain areas. Likewise, while the responsiveness of astrocytes to some neurotransmitters released by synaptic terminals, such as glutamate, GABA, acetylcholine, noradrenaline or nitric oxide, is well documented [7,9,10,13–16,19,20], the possible control of astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  by synapses that use other neurotransmitter systems remains to be fully investigated.

Although the synaptic-evoked  $\text{Ca}^{2+}$  signaling has been more intensively studied in astrocytes, other glial cell types may also respond with  $\text{Ca}^{2+}$  elevations to different stimuli, which may have strong impacts in the function of the nervous system. Involvement of  $\text{Ca}^{2+}$  signaling has been shown for instance in oligodendrocytes and oligodendrocytes precursor

cells that regulate myelin formation [33], in microglial cells that are involved in response to injury [28,34], or in perisynaptic Schwann cells—a type of glial cells—that respond to and regulate the neurotransmitter release from the motor endplates in the PNS [35].

### 6. Intracellular $\text{Ca}^{2+}$ waves in astrocytes

An elegant study of Kettenmann's group [20] that combined ultrastructural analysis, three-dimensional reconstruction and physiological studies showed that the cellular processes of the Bergmann glial cells—a specialized type of astrocytes in the cerebellum—are composed by numerous morphological and functional subcellular compartments called microdomains. These microdomains have a complex surface that wraps synapses between parallel fiber axon terminals and Purkinje neuron spines and may respond independently with  $\text{Ca}^{2+}$  elevations to the stimulation of parallel fibers [16,20]. The compartmentalization of the  $\text{Ca}^{2+}$  signal has also been observed in Bergmann glia after stimulation of molecular or granular layers [15], and in hippocampal astrocytes following Schaffer collaterals or alveus stimulation [7,9,10]. Furthermore, spontaneous  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations in astrocytes have been shown to initiate within discrete regions of astrocyte processes [17,18,36]. Whether  $\text{Ca}^{2+}$  elevations occur spontaneously or after synaptic activity, they are initiated in restricted areas of the astrocyte processes, and can remain in these regions or propagate along the process to other areas of the cell generating an intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  wave. Therefore, the astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  signal can be spatially localized and compartmentalized in restricted regions of the cell—the subcellular microdomains—, that constitute the elementary units of the  $\text{Ca}^{2+}$  elevations [7,9,20]. Interestingly, the intracellular extension of the astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  signal depends on the synaptic activity level. Indeed, while the synaptic-evoked  $\text{Ca}^{2+}$  signal remains spatially confined at low frequency of synaptic stimulation, it propagates throughout the cell when evoked by relatively high levels of synaptic activity [9,20]. The cellular mechanisms that control the intracellular expansion of the  $\text{Ca}^{2+}$  signal, i.e., determining whether the astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  signal remains locally restricted or whether it extends throughout the process or to adjacent processes may be of great functional significance because they would control the extent of the astrocyte-to-neuron communication (see below).

### 7. Modulation of the $\text{Ca}^{2+}$ signal: astrocytes process synaptic information

While the neuron-to-astrocyte communication is firmly established by the demonstration of the synaptic control of the astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  signal, one relevant question is whether this communication presents properties of complex information processing that are classically considered to be exclusive of neuron-to-neuron communication. In other words, do astro-



cyte  $\text{Ca}^{2+}$  signal simply reflects the synaptic activity level? Or, in contrast, can astrocytes integrate synaptic information, responding with a complex non-linear behavior to the incoming information from adjacent synapses? Following paragraphs will discuss recent data that indicate that astrocytes are indeed endowed with cellular intrinsic properties that allow the processing of the synaptic information [10].

A pioneering study of Carmignoto's group [9] showed that hippocampal astrocytes increased the  $\text{Ca}^{2+}$  oscillation frequency after successive episodes of SC synaptic activity. These results suggested that the potentiation of astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  response could represent a form of cellular memory and demonstrated the ability of astrocytes to respond in a plastic form to synaptic activity [9].

As discussed above, astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  elevations can be elicited by different neurotransmitters, but can astrocytes integrate the information of different synaptic inputs that use different neurotransmitters? We have recently addressed this issue by analyzing the responses of hippocampal astrocytes to the activity of different synaptic terminals that release acetylcholine (ACh) and glutamate (glu) as neurotransmitters. We have shown that hippocampal astrocytes respond to alveus synaptic activity (that contains glutamatergic and cholinergic axons coming from septum and diagonal band of Broca), with  $\text{Ca}^{2+}$  elevations exclusively mediated by ACh but not by glu, in spite of the fact that these astrocytes express functional glutamate receptors in their plasma membrane and that they sense the synaptically released glu as assessed by the recorded activation of glutamate transporters [7]. However, those astrocytes responded to glu when it is released by a different glutamatergic input, i.e., the SC synaptic terminals [10]. Two main conclusions can be drawn from these results. First, astrocytes selectively respond to different synapses that use different neurotransmitters, i.e., glu and ACh. Second, astrocytes can discriminate between the activity of different pathways that use the same neurotransmitter, i.e., glutamatergic axons of the SC and alveus [10].

To further investigate if astrocytes can integrate information from different synaptic inputs, we studied the astrocytic responses to the simultaneous activity of those synaptic pathways, i.e., SC and alveus. We reasoned that the integration of synaptic inputs would be manifested as a non-linear modulation of the synaptically evoked  $\text{Ca}^{2+}$  signal. We found that the simultaneous stimulation of both pathways evoked astrocytic responses that were inconsistent with the fact that astrocytes responded passively to synaptic stimulation. Indeed, the  $\text{Ca}^{2+}$  elevation evoked by simultaneous stimulation of both pathways was significantly different than the linear summation of the  $\text{Ca}^{2+}$  signals evoked by the independent stimulation (Fig. 1E). Therefore, the astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  signal was modulated by the simultaneous activity of cholinergic and glutamatergic synapses. Moreover, this  $\text{Ca}^{2+}$  signal regulation was bidirectionally dependent on the synaptic activity level, being potentiated or depressed at relative low and high synaptic activity frequencies, respectively. A similar  $\text{Ca}^{2+}$  signal modulation was observed in the absence of synaptic activ-

ity by exogenous application of transmitters, glu and ACh. Taken together, these results indicate that astrocytes integrate the information of incoming inputs and that this integration depends on the existence of cellular intrinsic properties of astrocytes [10].

The astrocyte processes are constituted by hundreds of microdomains that represent the elementary units of the astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  signal, from where it can eventually propagate to other regions of the cell [7,9,20]. Our results also show that the  $\text{Ca}^{2+}$  signal modulation occur at discrete regions of the astrocytic processes [10], suggesting that information processing of different inputs takes place at subcellular microdomains.

According to the most basic model of a neuron, the soma and dendrites correspond to the input region where the synaptic information is received and processed, while the output region resides in the axon that conveys the information to the presynaptic terminals. Each of these neuronal compartments has specific intrinsic membrane properties to receive, integrate, and transfer information. In contrast, astrocytes have a cell body and numerous thin processes—some of them intimately associated with synapses—, but do not show an evident polarity responsible for a determined direction of the information. Whether the information flows in astrocytes according to an unknown dynamic polarization law, as Cajal proposed for neurons [37], is still unknown. Moreover, whether the reciprocal information transfers between neurons and astrocytes, i.e., the information input, processing and output, occur in the same or different astrocytic cellular regions also remains unknown. Nevertheless, we have shown that the simultaneous activity of cholinergic and glutamatergic synapses not only modulated the amplitude of the astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  signal in astrocytic processes but also controlled its intracellular propagation throughout the cell [10]. Considering that a single astrocyte can wrap  $\sim 140,000$  synapses, and their processes are intimately associated with synapses, the synaptic control of the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signal propagation may have relevant consequences on brain function by regulating the spatial range of astrocyte influence on synaptic terminals.

In summary, the ability of astrocytes to discriminate between the activity of different synapses belonging to different axon pathways, the bidirectional modulation of the astrocytic cellular excitability by the synaptic activity, and the expression of cellular intrinsic properties indicate that astrocytes are endowed with cellular computational characteristics that process synaptic information.

## 8. Consequences of the astrocyte $\text{Ca}^{2+}$ signal on neuronal physiology: astrocyte-to-neuron communication

One of the most exciting topics on current neurobiology is the functional consequence of the astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  signal on neuronal physiology. In addition to respond to synapti-

cally released neurotransmitters, it is well established that astrocytes may release different gliotransmitters such as glutamate, D-serine, TNF $\alpha$ , or ATP. Some of these transmitters have been shown to be released in a Ca<sup>2+</sup>-dependent manner (for a review see [38]), and to constitute feedback signals from astrocytes that modulate neuronal excitability, synaptic transmission [5,24,25,39–43], and cerebrovascular microcirculation [44,45]. The detailed description of the modulatory effects of the astrocyte Ca<sup>2+</sup> signal on neuronal physiology is out of the scope of present review. They will be briefly summarized in the following paragraph, but the reader is referred to recent reviews that have discussed the topic [46–49].

Modulation of synaptic transmission has been well characterized in cultures of hippocampal cells, where Ca<sup>2+</sup> elevations in astrocytes were shown to stimulate the glutamate release that induce a transient reduction of both evoked excitatory and inhibitory synaptic currents mediated by activation of metabotropic glutamate receptors (mGluRs), probably located in presynaptic terminals [24]. In addition, Ca<sup>2+</sup>-dependent glutamate release from astrocytes increased the frequency of miniature synaptic currents through the activation of presynaptic NMDA receptors [25]. Astrocyte-induced regulation of synaptic transmission has also been shown in more intact preparations. In hippocampal slices, astrocytic Ca<sup>2+</sup> elevations have shown that cause a glutamate-dependent increase of the frequency of miniature IPSCs in pyramidal neurons [14]. Glutamate released by astrocytes may activate group I mGluRs to facilitate the release of glutamate from excitatory presynaptic buttons, increasing the frequency of spontaneous EPSCs in CA1 pyramidal neurons [36]. In this preparation, adenosine, which results from the degradation of the ATP released by astrocytes, mediates the activity-dependent heterosynaptic depression of synaptic transmission [43]. A glia-induced long-lasting depression of spontaneous synaptic currents on Purkinje neurons has also been shown in cerebellar slices [50]. Newman's group has demonstrated glial modulation of neuronal excitability in the retina, where Ca<sup>2+</sup> elevations in Müller cells and astrocytes modulate the output of retinal ganglion cells [22,32]. Robitaille's group has demonstrated that neurotransmitters released by the motor nerve terminal activate the perisynaptic Schwann cell, which in turn feeds back to the terminal, modulating the neurotransmitter release [4,35]. Finally, more indirect regulation of synaptic transmission can also be achieved by other gliotransmitters. D-Serine that is exclusively synthesized and released by astrocytes in the CNS act as the endogenous agonist of the glycine-binding site of the NMDA receptors [51,52]. On the other hand, astrocytes may increase the surface expression of neuronal AMPA receptors through the release TNF $\alpha$  [41].

Neuronal excitability has also been shown to be modulated by astrocytes both *in vitro* and *in situ*. Indeed, astrocyte-induced glutamate-mediated slow inward currents initially described in cultured neurons have been also recently demonstrated in neurons in thalamic [18] and hippocampal slices [10,53,54].

While it is clear that astrocytes can release several transmitter signals that can influence synaptic transmission and neuronal excitability, a considerable amount of work is still needed to fully understand the properties and mechanisms of this modulation in different synaptic connections and brain regions, as well as its actual impact on brain function.

Nevertheless, a great amount of evidence has demonstrated that neurotransmitters released by presynaptic terminals during synaptic activity increase intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration in adjacent glial cells, which in turn, may release different transmitters that can feed back to neuronal synaptic elements, regulating the postsynaptic neuronal excitability and modulating neurotransmitter release from presynaptic terminals. Consequently, we can consider now firmly established the new concept of the synaptic physiology—the tripartite synapse—in which glial cells play an active role as dynamic regulatory elements in neurotransmission [3].

## 9. Conclusions

The evidence obtained by several groups has prompted a reconsideration of the actual role of astrocytes in the physiology of the CNS, based on the demonstration of the existence of reciprocal communication between astrocytes and neurons. The control of the intracellular Ca<sup>2+</sup> excitability of astrocytes is a key element in this loop of information exchange. Considering the intricate spatial relationships between astrocytes and synapses, the spatial characteristics of the astrocyte Ca<sup>2+</sup> signal, the number of different gliotransmitters, the synaptic-evoked astrocyte Ca<sup>2+</sup> signal modulation, and their multiple possible effects on different synapses, we can begin to understand the complex properties of the neuron-astrocyte intercellular signaling, which may have extremely important implications in the physiology of the brain. The ability of astrocytes to process synaptic information adds further complexity and degrees of freedom to the intercellular communication in the brain, increasing the power of the nervous system to process information.

## Acknowledgment

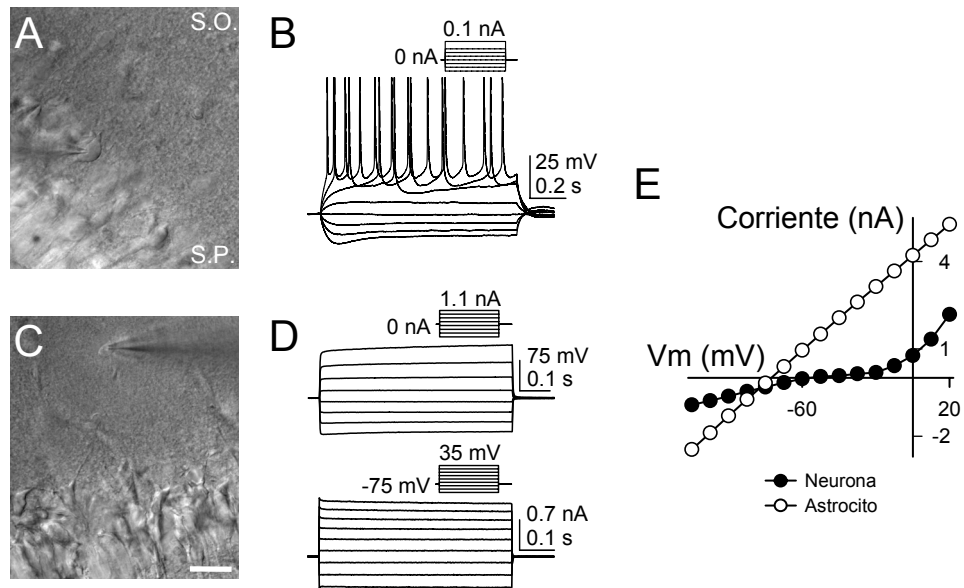
This work was supported by Ministerio de Educación y Ciencia (BFU2004-00448), Spain. G.P. is a CSIC predoctoral fellow.

## References

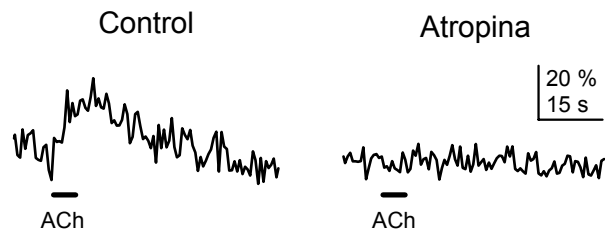
- [1] H. Kettenmann, B.R. Ransom, *Neuroglia*, second ed., Oxford University Press, New York, 2005.
- [2] A. Araque, G. Carmignoto, P.G. Haydon, Dynamic signaling between neurons and glia, *Annu. Rev. Physiol.* 63 (2001) 795–813.
- [3] A. Araque, V. Parpura, R.P. Sanzgiri, P.G. Haydon, Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner, *Trends Neurosci.* 22 (1999) 208–215.

- [4] D.S. Auld, R. Robitaille, Glial cells and neurotransmission: an inclusive view of synaptic function, *Neuron* 40 (2003) 389–400.
- [5] P.G. Haydon, A. Araque, Astrocytes as modulators of synaptic transmission, in: A. Volterra, P.J. Magistretti, P.G. Haydon (Eds.), *The Tripartite Synapse: Glia in Synaptic Transmission*, Oxford University Press, New York, 2002, pp. 185–198.
- [6] A.H. Cornell-Bell, S.M. Finkbeiner, M.S. Cooper, S.J. Smith, Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling, *Science* 247 (1990) 470–473.
- [7] A. Araque, E.D. Martin, G. Perea, J.I. Arellano, W. Buño, Synaptically-released acetylcholine evokes  $\text{Ca}^{2+}$  elevations in astrocytes in hippocampal slices, *J. Neurosci.* 22 (2002) 2443–2450.
- [8] A.C. Charles, J.E. Merrill, E.R. Dirksen, M.J. Sanderson, Intercellular signaling in glial cells: calcium waves and oscillations in response to mechanical stimulation and glutamate, *Neuron* 6 (1991) 983–992.
- [9] L. Pasti, A. Volterra, T. Pozzan, G. Carmignoto, Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes in situ, *J. Neurosci.* 17 (1997) 7817–7830.
- [10] G. Perea, A. Araque, Properties of synaptically evoked astrocyte calcium signal reveal synaptic information processing by astrocytes, *J. Neurosci.* 25 (2005) 2192–2203.
- [11] J.W. Deitmer, A.J. Verkhratsky, C. Lohr, Calcium signalling in glial cells, *Cell Calcium* 24 (1998) 405–416.
- [12] F. Aguado, J.F. Espinosa-Parrilla, M.A. Carmona, E. Soriano, Neuronal activity regulates correlated network properties of spontaneous calcium transients in astrocytes in situ, *J. Neurosci.* 22 (2002) 9430–9444.
- [13] P. Bezzi, G. Carmignoto, L. Pasti, S. Vesce, D. Rossi, B. Rizzi, T. Pozzan, A. Volterra, Prostaglandins stimulate  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent glutamate release in astrocytes, *Nature* 391 (1998) 281–285.
- [14] J. Kang, L. Jiang, S.A. Goldman, M. Nedergaard, Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission, *Nat. Neurosci.* 1 (1998) 683–692.
- [15] A. Kulik, A. Haentzsch, M. Luckermann, W. Reichelt, K. Ballanyi, Neuron–glia signaling via  $\alpha 1$  adrenoceptor-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  release in Bergmann glial cells in situ, *J. Neurosci.* 19 (1999) 8401–8408.
- [16] V. Matyash, V. Filippov, K. Mohrhagen, H. Kettenmann, Nitric oxide signals parallel fiber activity to Bergmann glial cells in the mouse cerebellar slice, *Mol. Cell. Neurosci.* 18 (2001) 664–670.
- [17] W.J. Nett, S.H. Oloff, K.D. McCarthy, Hippocampal astrocytes in situ exhibit calcium oscillations that occur independent of neuronal activity, *J. Neurophysiol.* 87 (2002) 528–537.
- [18] H.R. Parri, T.M. Gould, V. Crunelli, Spontaneous astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations in situ drive NMDAR-mediated neuronal excitation, *Nat. Neurosci.* 4 (2001) 803–812.
- [19] J.T. Porter, K.D. McCarthy, Astrocytic neurotransmitter receptors in situ and in vivo, *Prog. Neurobiol.* 51 (1997) 439–455.
- [20] J. Grosche, V. Matyash, T. Moller, A. Verkhratsky, A. Reichenbach, H. Kettenmann, Microdomains for neuron–glia interaction: parallel fiber signaling to Bergmann glial cells, *Nat. Neurosci.* 2 (1999) 139–143.
- [21] O. Peters, C.G. Schipke, Y. Hashimoto, H. Kettenmann, Different mechanisms promote astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  waves and spreading depression in the mouse neocortex, *J. Neurosci.* 23 (2003) 9888–9896.
- [22] E.A. Newman, K.R. Zahs, Calcium waves in retinal glial cells, *Science* 275 (1997) 844–847.
- [23] M.L. Cotrina, M. Nedergaard, Intracellular calcium control mechanisms in glia, in: H. Kettenman, B. Ransom (Eds.), *Neuroglia*, Oxford University Press, New York, 2005, pp. 229–239.
- [24] A. Araque, V. Parpura, R.P. Sanzgiri, P.G. Haydon, Glutamate-dependent astrocyte modulation of synaptic transmission between cultured hippocampal neurons, *Eur. J. Neurosci.* 10 (1998) 2129–2142.
- [25] A. Araque, R.P. Sanzgiri, V. Parpura, P.G. Haydon, Calcium elevation in astrocytes causes an NMDA receptor-dependent increase in the frequency of miniature synaptic currents in cultured hippocampal neurons, *J. Neurosci.* 18 (1998) 6822–6829.
- [26] A.C. Charles, C. Giaume, Intercellular calcium waves in astrocytes: underlying mechanisms and functional significance, in: A. Volterra, P.J. Magistretti, P.G. Haydon (Eds.), *The Tripartite Synapse: Glia in Synaptic Transmission*, Oxford University Press, New York, 2002, pp. 110–126.
- [27] M.E. Harris-White, S.A. Zanotti, S.A. Frautschy, A.C. Charles, Spiral intercellular calcium waves in hippocampal slice cultures, *J. Neurophysiol.* 79 (1998) 1045–1052.
- [28] C.G. Schipke, C. Boucsein, C. Ohlemeyer, F. Kirchhoff, H. Kettenmann, Astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  waves trigger responses in microglial cells in brain slices, *FASEB J.* 16 (2002) 255–257.
- [29] M. Nedergaard, A.J. Hansen, Characterization of cortical depolarizations evoked in focal cerebral ischemia, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 13 (1993) 568–574.
- [30] A. Tashiro, J. Goldberg, R. Yuste, Calcium oscillations in neocortical astrocytes under epileptiform conditions, *J. Neurobiol.* 50 (2002) 45–55.
- [31] J.Y. Sul, G. Orosz, R.S. Givens, P.G. Haydon, Astrocytic connectivity in the hippocampus, *Neuron Glia Biol.* 1 (2004) 3–11.
- [32] E.A. Newman, Glial cell inhibition of neurons by release of ATP, *J. Neurosci.* 23 (2003) 1659–1666.
- [33] S.K. Agrawal, R. Nashmi, M.G. Fehlings, Role of L- and N-type calcium channels in the pathophysiology of traumatic spinal cord white matter injury, *Neuroscience* 99 (2000) 179–188.
- [34] C. Verderio, M. Matteoli, ATP mediates calcium signaling between astrocytes and microglial cells: modulation by IFN- $\gamma$ , *J. Immunol.* 166 (2001) 6383–6391.
- [35] R. Robitaille, Modulation of synaptic efficacy and synaptic depression by glial cells at the frog neuromuscular junction, *Neuron* 21 (1998) 847–855.
- [36] T.A. Fiacco, K.D. McCarthy, Intracellular astrocyte calcium waves in situ increase the frequency of spontaneous AMPA receptor currents in CA1 pyramidal neurons, *J. Neurosci.* 24 (2004) 722–732.
- [37] S. Ramón y Cajal, *Textura del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados*, Tomo I, N. Moya, Madrid, 1899.
- [38] A. Volterra, J. Meldolesi, Quantal release of transmitter: not only for neurons but from astrocytes as well? in: H. Kettenman, B. Ransom (Eds.), *Neuroglia*, Oxford University Press, New York, 2005, pp. 190–201.
- [39] A. Araque, N. Li, R.T. Doyle, P.G. Haydon, SNARE protein-dependent glutamate release from astrocytes, *J. Neurosci.* 20 (2000) 666–673.
- [40] G. Arcuino, J.H. Lin, T. Takano, C. Liu, L. Jiang, Q. Gao, J. Kang, M. Nedergaard, Intercellular calcium signaling mediated by point-source burst release of ATP, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99 (2002) 9840–9845.
- [41] E.C. Beattie, D. Stellwagen, W. Morishita, J.C. Bresnahan, B.K. Ha, M. Von Zastrow, M.S. Beattie, R.C. Malenka, Control of synaptic strength by glial TNF $\alpha$ , *Science* 295 (2002) 2282–2285.
- [42] P. Bezzi, V. Gundersen, J.L. Galbete, G. Seifert, C. Steinhauser, E. Pilati, A. Volterra, Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate, *Nat. Neurosci.* 7 (2004) 613–620.
- [43] J. Zhang, H. Wang, C. Ye, W. Ge, Y. Chen, Z. Jiang, C. Wu, M. Poo, S. Duan, ATP released by astrocytes mediates glutamatergic activity-dependent heterosynaptic suppression, *Neuron* 40 (2003) 971–982.
- [44] S.J. Mulligan, B.A. MacVicar, Calcium transients in astrocyte endfeet cause cerebrovascular constrictions, *Nature* 431 (2004) 195–199.
- [45] M. Zonta, M.C. Angulo, S. Gobbo, B. Rosengarten, K.A. Hossmann, T. Pozzan, G. Carmignoto, Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation, *Nat. Neurosci.* 6 (2003) 43–50.
- [46] A. Araque, G. Perea, Glial modulation of synaptic transmission in culture, *Glia* 47 (2004) 241–248.

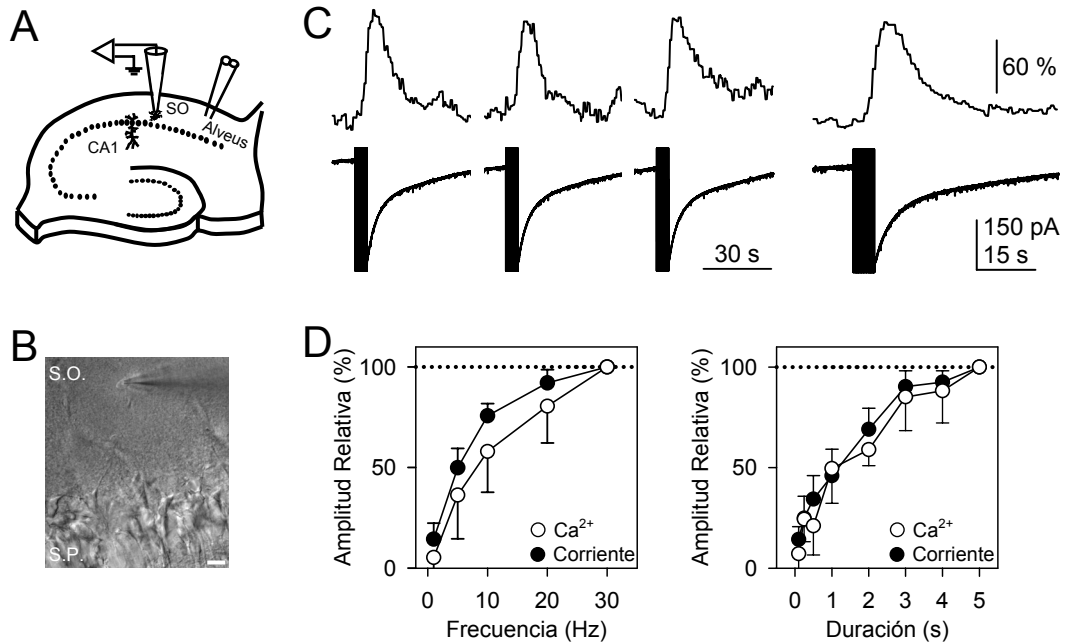
- [47] A. Colomar, R. Robitaille, Glial modulation of synaptic transmission at the neuromuscular junction, *Glia* 47 (2004) 284–289.
- [48] S.H. Oliet, R. Piet, D.A. Poulain, D.T. Theodosis, Glial modulation of synaptic transmission: insights from the supraoptic nucleus of the hypothalamus, *Glia* 47 (2004) 258–267.
- [49] A. Volterra, C. Steinhauser, Glial modulation of synaptic transmission in the hippocampus, *Glia* 47 (2004) 249–257.
- [50] J. Brockhaus, J.W. Deitmer, Long-lasting modulation of synaptic input to Purkinje neurons by Bergmann glia stimulation in rat brain slices, *J. Physiol.* 545 (2002) 581–593.
- [51] R.F. Miller, D-Serine as a glial modulator of nerve cells, *Glia* 47 (2004) 275–283.
- [52] J.P. Mothet, L. Pollegioni, G. Ouanounou, M. Martineau, P. Fossier, G. Baux, Glutamate receptor activation triggers a calcium-dependent and SNARE protein-dependent release of the gliotransmitter D-serine, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 102 (2005) 5606–5611.
- [53] M.C. Angulo, A.S. Kozlov, S. Charpak, E. Audinat, Glutamate released from glial cells synchronizes neuronal activity in the hippocampus, *J. Neurosci.* 24 (2004) 6920–6927.
- [54] T. Fellin, O. Pascual, S. Gobbo, T. Pozzan, P.G. Haydon, G. Carmignoto, Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors, *Neuron* 43 (2004) 729–743.



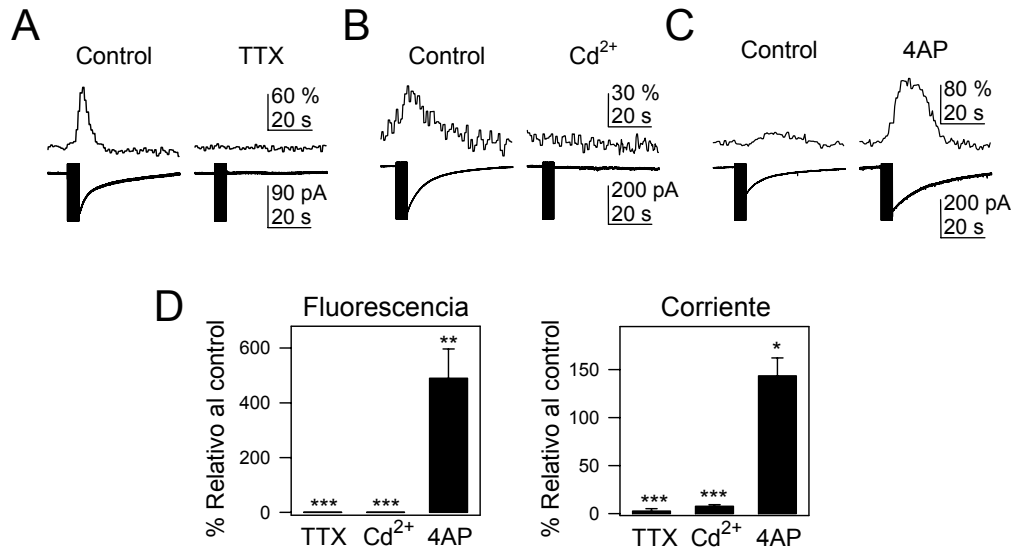
**Figura 1. Identificación morfológica y electrofisiológica de neuronas piramidales de CA1 y astrocitos de *stratum oriens* de hipocampo.** (A, C) Imágenes de microscopía de infrarrojo con contraste de fase mostrando el *stratum pyramidale* (SP) y el *stratum oriens* (SO) en rodajas de hipocampo, la imagen A muestra una neurona piramidal y la imagen C un astrocito localizado en el SO, nótese las pipetas de registro a la izquierda en el caso de la figura A y a la derecha para el caso del registro del astrocito. Barra de calibración: 25  $\mu$ m. (B) Registro en fijación de corriente de las variaciones del potencial de membrana inducidas por pulsos de corriente hiperpolarizantes y despolarizantes en la neurona piramidal. (D) Registro en fijación de corriente de las variaciones del potencial de membrana inducidas por pulsos de corriente hiperpolarizantes y despolarizantes (panel superior), y registro de corrientes en la configuración de célula entera en respuesta a pulsos de voltaje (panel inferior). Nótese la ausencia de potenciales de acción en el astrocito. (E) Relación corriente-voltaje medidas en el estado estacionario de las corrientes en el astrocito y la neurona. Los astrocitos muestran una relación corriente-voltaje totalmente lineal, indicando un comportamiento pasivo frente a cambios de potencial de membrana.



**Figura 2. Los astrocitos de *stratum oriens* presentan receptores funcionales de ACh.** La aplicación de ACh (0.5 M, 5 s) por ionoforesis provoca aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en los astrocitos de la región de *stratum oriens* de hipocampo. Estos aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  desaparecen en presencia de Atropina, indicando que los astrocitos presentan en su membrana receptores funcionales de ACh de tipo metabotrópico. Las barras horizontales debajo de cada trazo representan el estímulo.

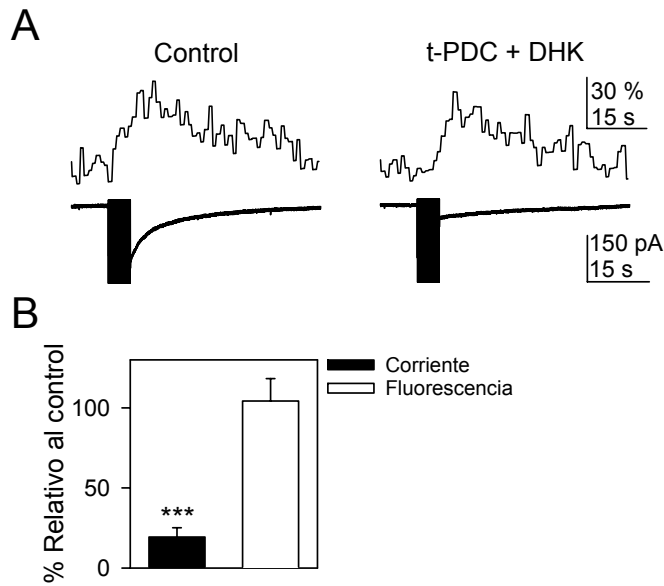


**Figura 3. Respuestas astrocitarias inducidas por la estimulación eléctrica de las fibras de alveus.** (A) Esquema del diseño experimental mostrando la posición del electrodo de estimulación (derecha) y registro (izquierda) en rodajas de hipocampo. (B) Imagen de microscopía de infrarrojo con contraste de fase mostrando el *stratum pyramidale* (SP) y el astrocito registrado en *stratum oriens* (SO), la pipeta de registro está situada a la derecha del astrocito. Barra de calibración: 20  $\mu$ m. (C) Respuestas representativas inducidas por la estimulación de alveus (30 Hz, 5 s), variaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  (trazo superior) y corriente de membrana (trazo inferior). La barra vertical en el trazo de corriente corresponde al artefacto de estimulación (igual para el resto de las figuras). Se muestran tres respuestas consecutivas generadas por la estimulación repetida de las fibras de alveus y las respuestas promedio (trazos localizados a la derecha del panel). (D) Dependencia de las respuestas astrocitarias, corrientes de membrana y aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, de la frecuencia y duración de estimulación, respectivamente. Los valores representados están normalizados a las respuestas obtenidas con estímulos de 30 Hz, 5 s (línea de puntos). Cada punto está representado por el promedio de las respuestas en al menos 4 astrocitos.

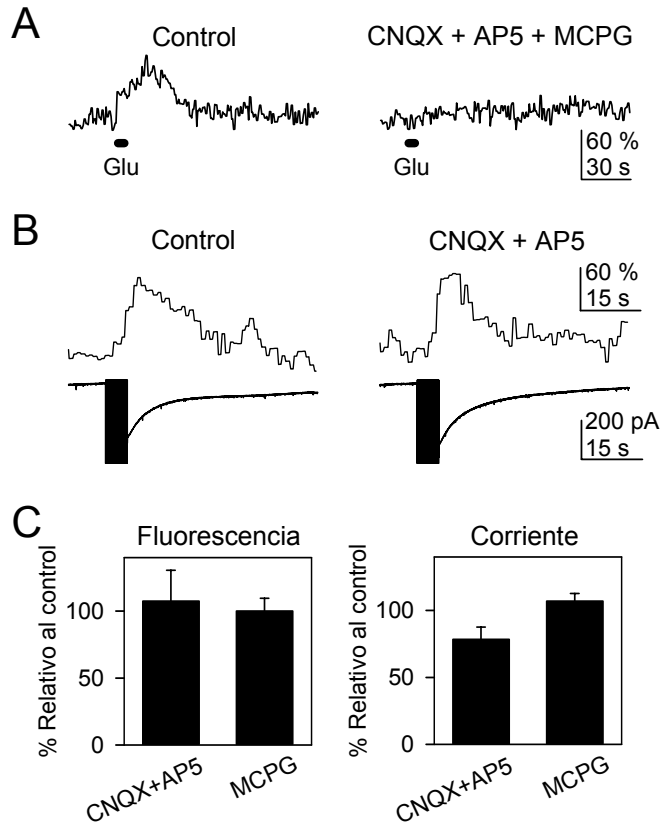


**Figura 4. Las respuestas astrocitarias están mediadas por la liberación de neurotransmisor de las terminales sinápticas.** (A, B, C) Variaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  (trazo superior) y corrientes de membrana (trazo inferior) generadas por la estimulación de alveus en situación control, en presencia de  $1 \mu\text{M}$  TTX,  $100 \mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  y  $100 \mu\text{M}$  4-AP. (D) Cambios relativos a los valores control de la intensidad de fluorescencia y las corrientes de membrana, respectivamente, generados por la actividad de alveus en presencia de  $1 \mu\text{M}$  TTX ( $n = 4$ ),  $100 \mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  ( $n = 6$ ) y  $100 \mu\text{M}$  4-AP ( $n = 14$ ). Las diferencias significativas se establecieron usando el test t de Student con  $p < 0.05$  (\*), y  $p < 0.001$  (\*\*).

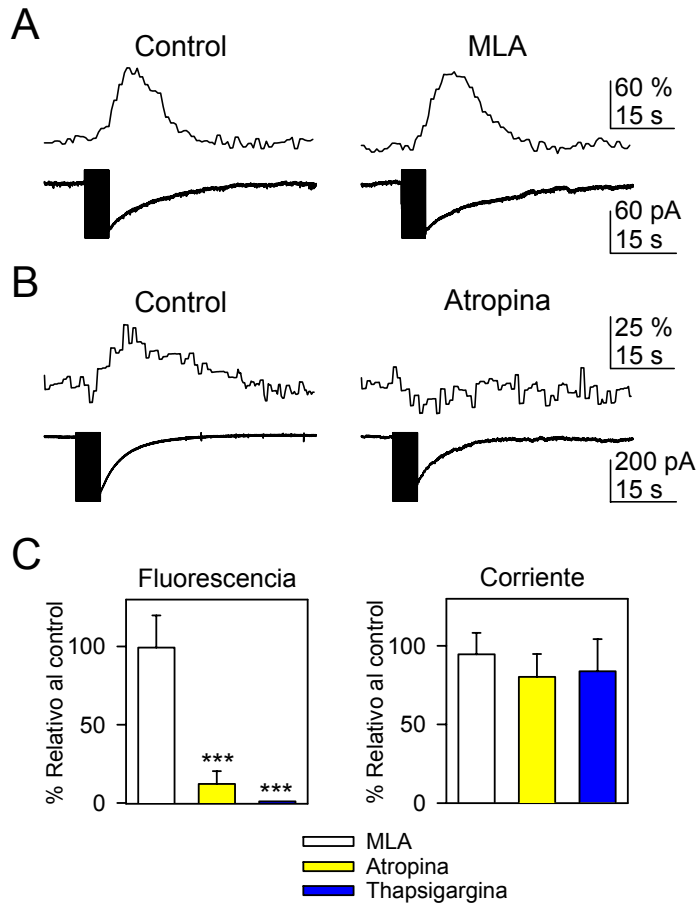




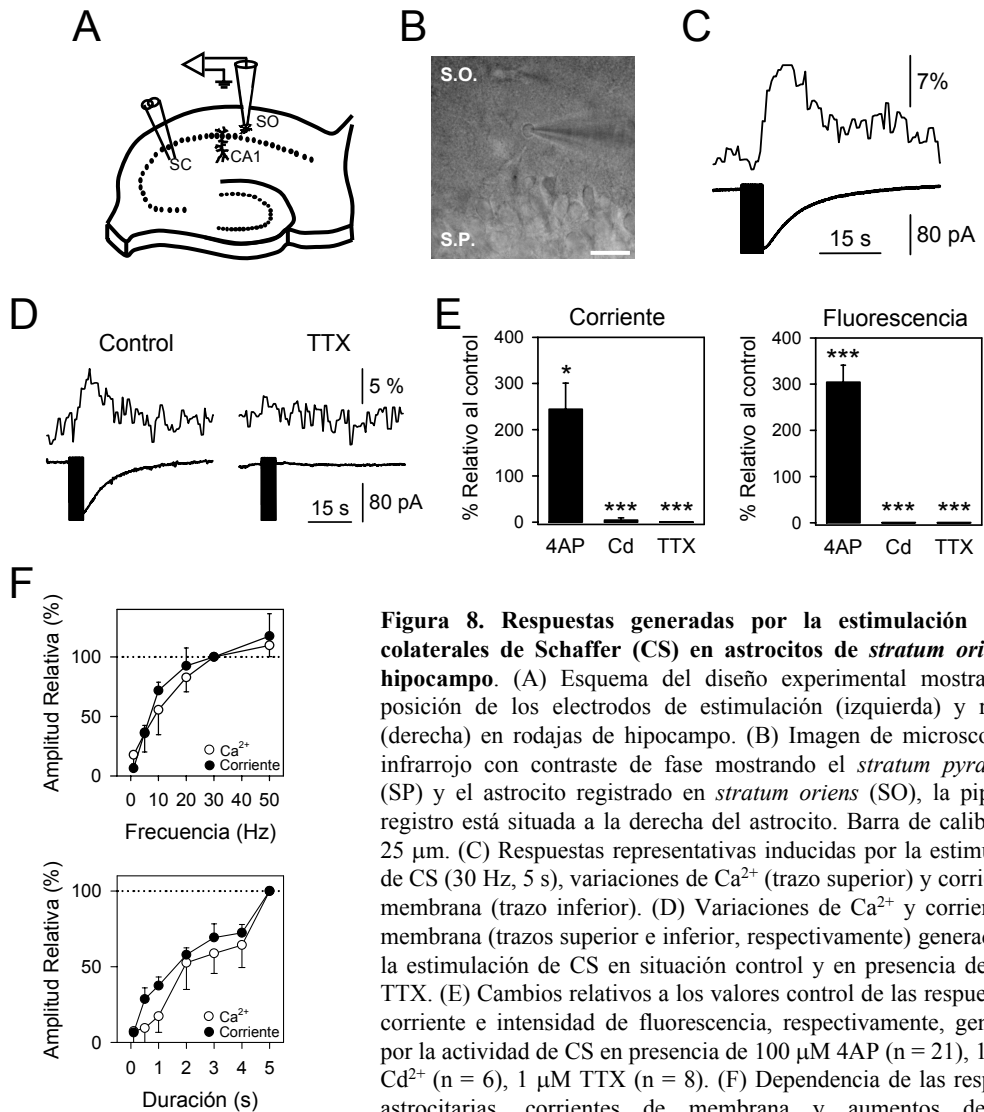
**Figura 5. Participación de los transportadores de glutamato en las corrientes transmembrana.** (A) Respuestas de Ca<sup>2+</sup> y corrientes transmembrana generadas por la estimulación de alveus en situación control y en presencia de inhibidores de los transportadores de glutamato: 1 mM DHK + 0.3 mM t-PDC. (B) Cambios relativos a los valores control de la intensidad de fluorescencia (104.3 ± 14.04%) y las corrientes de membrana (19.3 ± 5.8%), respectivamente, generados por la actividad de alveus en presencia de DHK + t-PDC (n = 4). Las diferencias significativas se establecieron con p < 0.001 (\*\*\*).



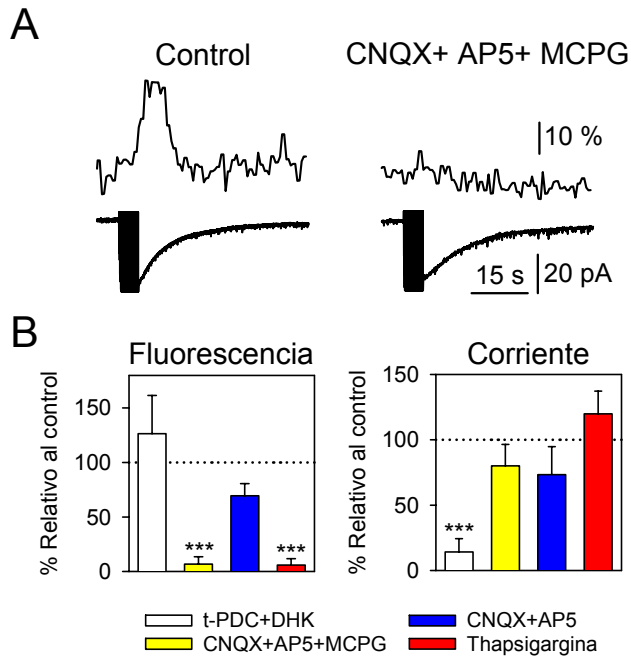
**Figura 6. Participación de glutamato liberado sinápticamente en las respuestas de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitarias.** (A) Los astrocitos de *stratum oriens* presentan receptores funcionales de glutamato. La aplicación de glutamato (0.7 M, 5 s) por ionoforesis provoca aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en los astrocitos localizados en esta región. Estos aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  desaparecen en presencia de antagonistas de receptores de glutamato (20  $\mu\text{M}$  CNQX + 50  $\mu\text{M}$  AP5 + 0.8 mM MCPG (n = 4). (B, C) Las variaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  inducidas por la estimulación de alveus no están mediadas por la activación de receptores de glutamato. (B) Respuestas de  $\text{Ca}^{2+}$  y corrientes transmembrana generadas por la estimulación de alveus en situación control y en presencia de antagonistas de receptores ionotrópicos (20  $\mu\text{M}$  CNQX + 50  $\mu\text{M}$  AP5). (C) Cambios relativos a los valores control de la intensidad de fluorescencia y las corrientes de membrana, respectivamente, generados por la actividad de alveus en presencia de 20  $\mu\text{M}$  CNQX + 50  $\mu\text{M}$  AP5 (n = 6) y 0.8 mM MCPG (n = 6).



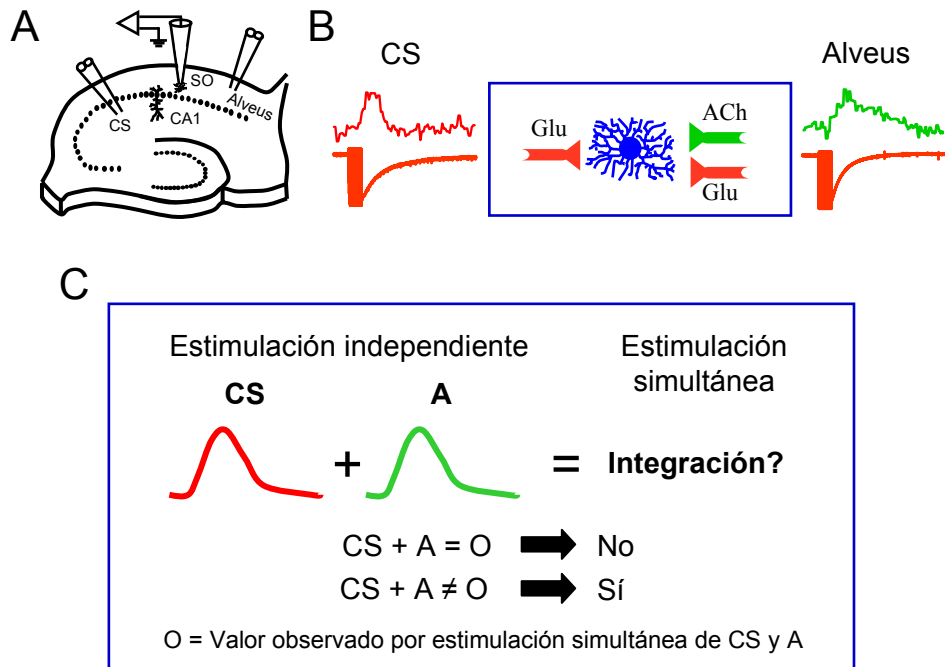
**Figura 7. Los aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitario están mediados por la activación de receptores metabotrópicos de ACh que inducen la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de los reservorios intracelulares.** (A, B) Variaciones de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  y corrientes transmembrana en respuesta a la estimulación de alveus en condiciones control y en presencia de MLA (50 nM) y atropina (50  $\mu\text{M}$ ), respectivamente. (C) Cambios relativos a los valores control de la intensidad de fluorescencia y las corrientes de membrana, respectivamente, generados por la actividad de alveus en presencia de 50 nM MLA (n = 6), 50  $\mu\text{M}$  atropina (n = 8) y 1  $\mu\text{M}$  thapsigargina (n = 5). Las diferencias significativas se establecieron con  $p < 0.001$  (\*\*\*)



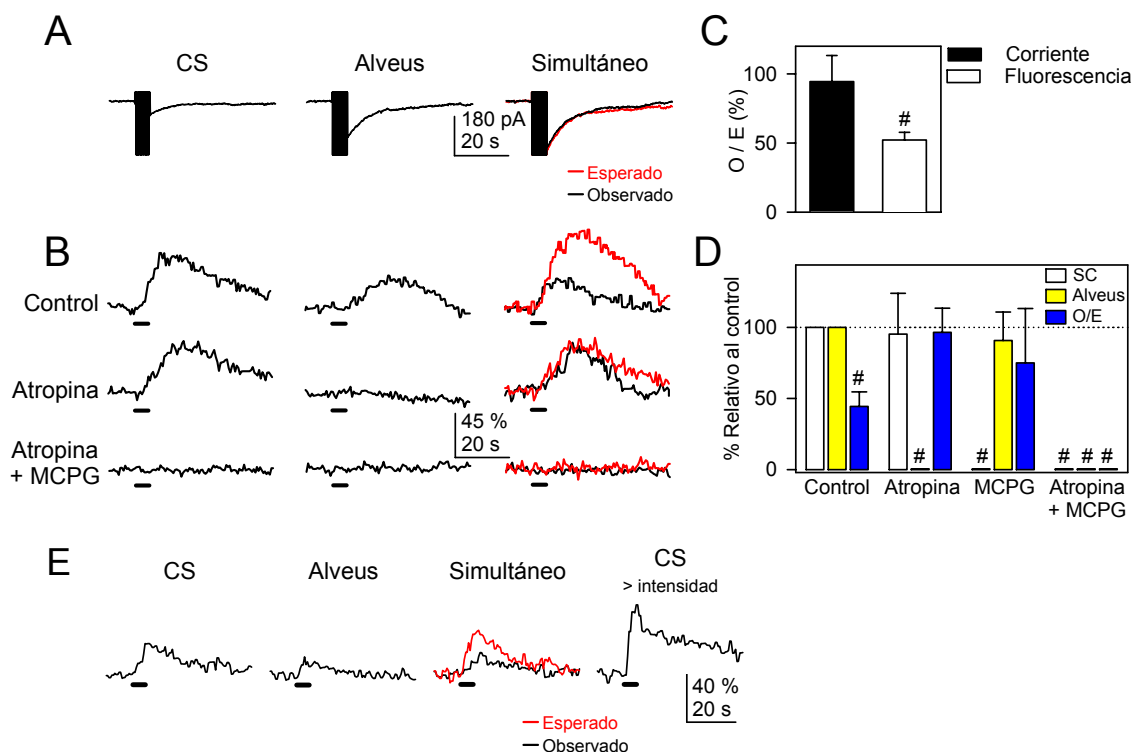
**Figura 8. Respuestas generadas por la estimulación de las colaterales de Schaffer (CS) en astrocitos de *stratum oriens* de hipocampo.** (A) Esquema del diseño experimental mostrando la posición de los electrodos de estimulación (izquierda) y registro (derecha) en rodajas de hipocampo. (B) Imagen de microscopía de infrarrojo con contraste de fase mostrando el *stratum pyramidale* (SP) y el astrocito registrado en *stratum oriens* (SO), la pipeta de registro está situada a la derecha del astrocito. Barra de calibración: 25  $\mu\text{m}$ . (C) Respuestas representativas inducidas por la estimulación de CS (30 Hz, 5 s), variaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  (trazo superior) y corriente de membrana (trazo inferior). (D) Variaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  y corrientes de membrana (trazos superior e inferior, respectivamente) generadas por la estimulación de CS en situación control y en presencia de 1  $\mu\text{M}$  TTX. (E) Cambios relativos a los valores control de las respuestas de corriente e intensidad de fluorescencia, respectivamente, generados por la actividad de CS en presencia de 100  $\mu\text{M}$  4AP ( $n = 21$ ), 100  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  ( $n = 6$ ), 1  $\mu\text{M}$  TTX ( $n = 8$ ). (F) Dependencia de las respuestas astrocitarias, corrientes de membrana y aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, de la frecuencia y duración de estimulación, respectivamente. Los valores representados están normalizados a las respuestas obtenidas con estímulos de 30 Hz, 5 s (línea de puntos). Cada punto está representado por el promedio de las respuestas en al menos 5 astrocitos.



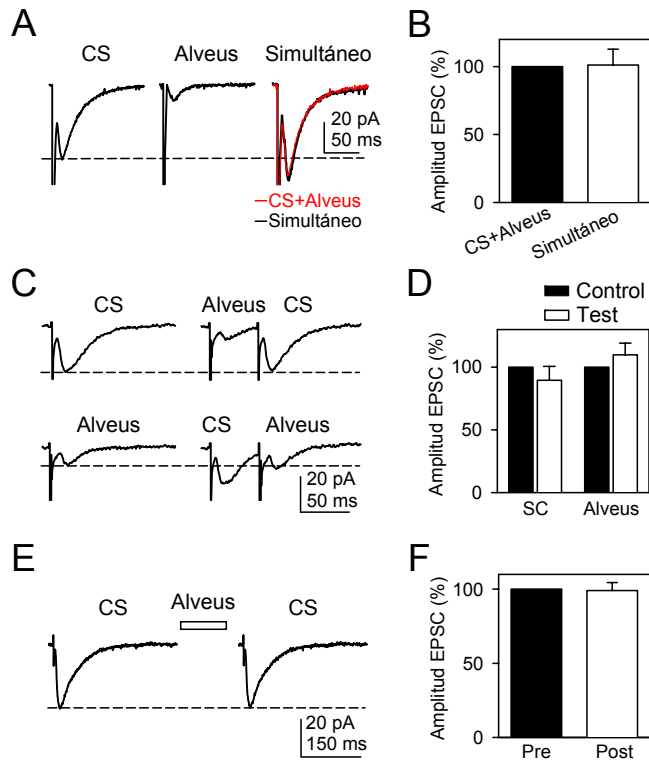
**Figura 9. Participación de glutamato liberado sinápticamente por las CS en las respuestas astrocitarias.** (A) Variaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  y corrientes de membrana (trazos superior e inferior, respectivamente) generadas por la estimulación de CS en situación control y en presencia de antagonistas de receptores de glutamato ( $20 \mu\text{M}$  CNQX +  $50 \mu\text{M}$  AP5 +  $0.8 \text{ mM}$  MCPG). (B) Cambios relativos a los valores control de la intensidad de fluorescencia y las corrientes transmembrana generados por la actividad de CS en presencia de  $0.3 \text{ mM}$  t-PDC +  $1 \text{ mM}$  DHK ( $n = 8$ ),  $20 \mu\text{M}$  CNQX +  $50 \mu\text{M}$  AP5 +  $0.8 \text{ mM}$  MCPG ( $n = 8$ ),  $20 \mu\text{M}$  CNQX +  $50 \mu\text{M}$  AP5 ( $n = 4$ ),  $0.8 \text{ mM}$  MCPG ( $n = 8$ ) y  $1 \mu\text{M}$  thapsigargina ( $n = 5$ ). Las diferencias significativas se establecieron con  $p < 0.001$  (\*\*\*)



**Figura 10. Discriminación de la actividad de distintas terminales sinápticas.** (A) Esquema del diseño experimental mostrando la posición de los electrodos de estimulación en las CS (izquierda) y en alveus (derecha), y el electrodo de registro (centro) en rodajas de hipocampo. (B) Esquema de la discriminación de la actividad de las terminales sinápticas glutamatérgicas de las CS y las terminales colinérgicas de alveus. En rojo se representan las respuestas mediadas por glutamato liberado sinápticamente. En verde se representan las respuestas mediadas por ACh liberada sinápticamente. (C) Esquema de la integración de información sináptica en los astrocitos en respuesta a la activación simultánea de dos sinapsis (CS y alveus).

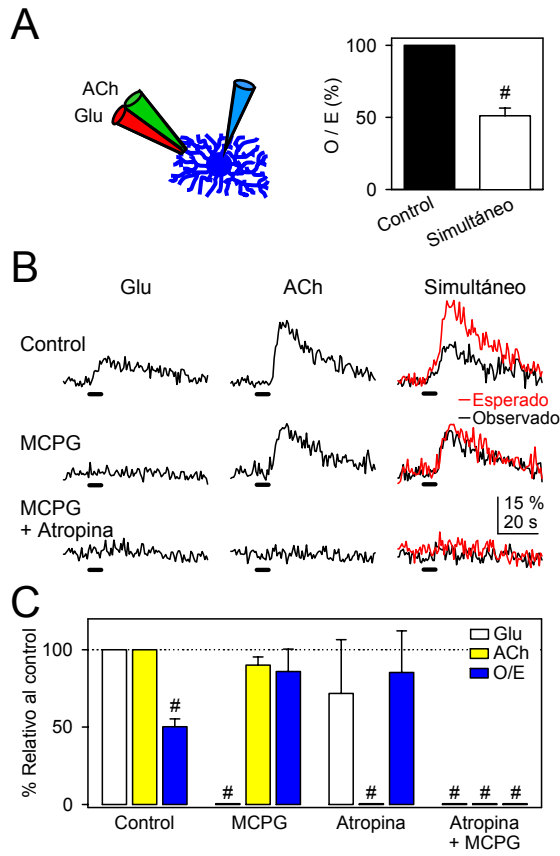


**Figura 11. La señal de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitaria es modulada por la actividad simultánea de alveus y CS.** (A) Corrientes representativas inducidas por la actividad independiente o simultánea de CS y alveus (30 Hz, 5 s). En la condición de estimulación simultánea los trazos de color negro y rojo corresponden a la respuesta observada y esperada, respectivamente (igual para el resto de las figuras) ( $n = 28$ ). (B) Variaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  generadas por estimulación independiente y simultánea de CS y alveus, en condiciones control y en presencia de atropina (50  $\mu\text{M}$ ) y la posterior aplicación de MCPG (0.8 mM). Las barras horizontales debajo de cada trazo representan el estímulo (igual para el resto de las figuras). (C) Relación entre las respuestas observadas (O) y las esperadas (E) ( $n = 77$ ). (D) Amplitud relativa de las respuestas de  $\text{Ca}^{2+}$  inducidas por estimulación independiente o simultánea de CS y alveus, en situación control y en presencia de atropina (50  $\mu\text{M}$ ) y MCPG (0.8 mM). Las respuestas generadas por estimulación simultánea fueron cuantificadas como la relación O/E (ver resultados);  $n \geq 5$  para cada barra,  $p < 0.001$  (#). (E) Ejemplo de respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por CS, alveus y estimulación simultánea a una intensidad de estimulación dada, y después de aumentar la intensidad de estimulación de CS. Destacar que la respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  generada por una mayor intensidad en CS fue superior a la respuesta esperada por estimulación simultánea (trazo rojo;  $n = 4$ ).

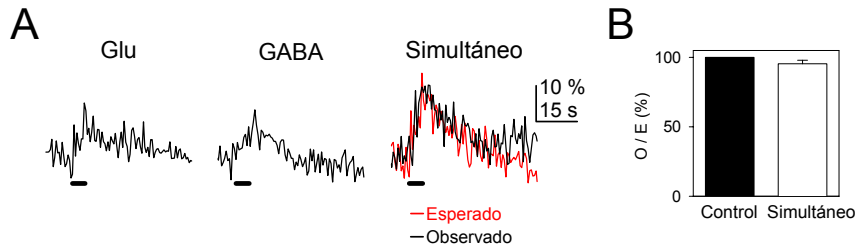


**Figura 12. EPSCs inducidos por la estimulación de CS y alveus no resultan afectados por la estimulación de la otra vía.** (A) EPSCs promedio ( $n = 20$ ) generados por la estimulación de CS, alveus y la estimulación simultánea de ambas vías. (B) Promedio de amplitudes de EPSCs inducidas por la estimulación simultánea de CS y alveus y amplitud relativa de la suma de EPSCs generados por estimulación independiente (CS + alveus) ( $n = 5$  neuronas). (C) Promedio de EPSCs ( $n = 20$ ) inducidos por CS y alveus (trazos superiores e inferiores) en control y después de la estimulación de alveus y CS, respectivamente. (D) Promedio de amplitudes de EPSCs inducidas por la estimulación de CS y alveus en control y después de la estimulación de alveus y CS (Test), respectivamente ( $n = 5$  células). (E) Promedio de EPSCs ( $n = 20$ ) generados por CS antes y después de un único tren de estímulos en alveus (30 Hz, 5 s). (F) Promedio de amplitudes de EPSCs inducidas por CS antes (Pre) y después (Post) de la estimulación en alveus ( $n = 8$  neuronas).

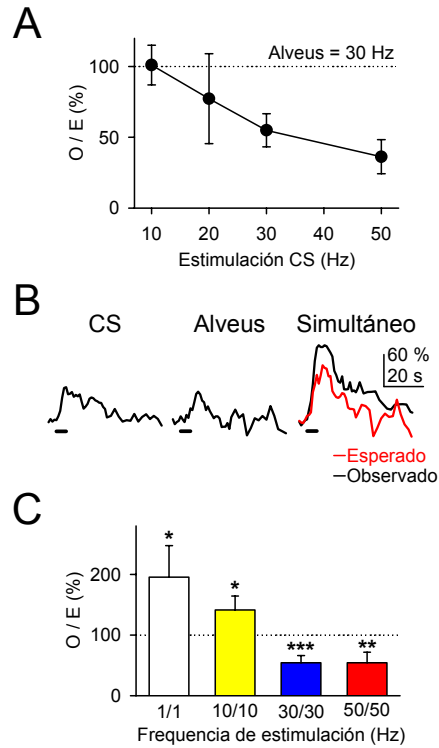




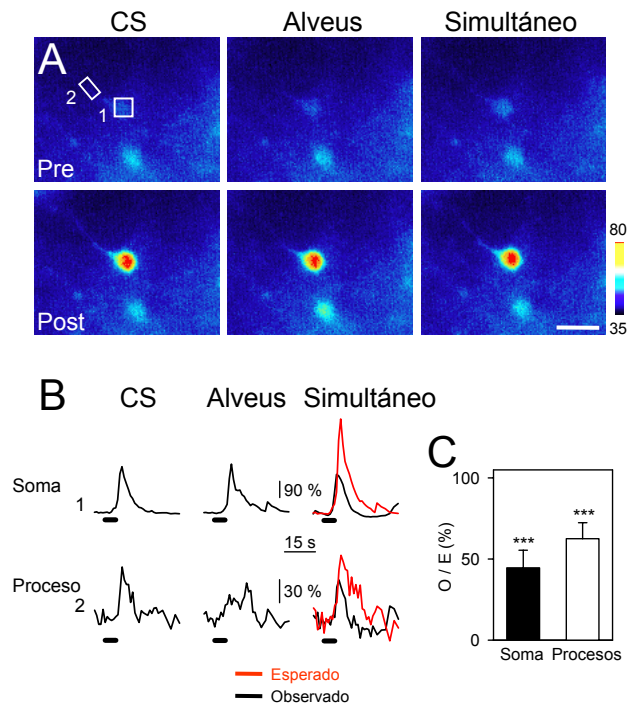
**Figura 13. La modulación de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  depende de propiedades intrínsecas de los astrocitos.** (A) Esquema mostrando un astrocito llenado con fluo-3 mediante la pipeta de registro y una pipeta septada rellena con ACh y glutamato (Glu), y las respuestas de  $\text{Ca}^{2+}$  inducidas por la aplicación simultánea de Glu (0.7 M) y ACh (0.5 M) frente a las respuestas esperadas por la aplicación independiente (control) ( $n = 15$ ). (B) Respuestas de  $\text{Ca}^{2+}$  generadas por la aplicación ionofórica independiente o simultánea de Glu y ACh en control, en 0.8 mM de MCPG y después de la aplicación de 50  $\mu\text{M}$  de atropina. (C) Amplitud relativa de los aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  por la aplicación de Glu y ACh en condiciones control y en presencia de 0.8 mM de MCPG, 50  $\mu\text{M}$  de atropina o ambos. Las respuestas generadas por la aplicación simultánea de los dos transmisores fue cuantificada como la relación entre O/E (ver resultados);  $n \geq 5$  para cada barra,  $p < 0.001$  (#).



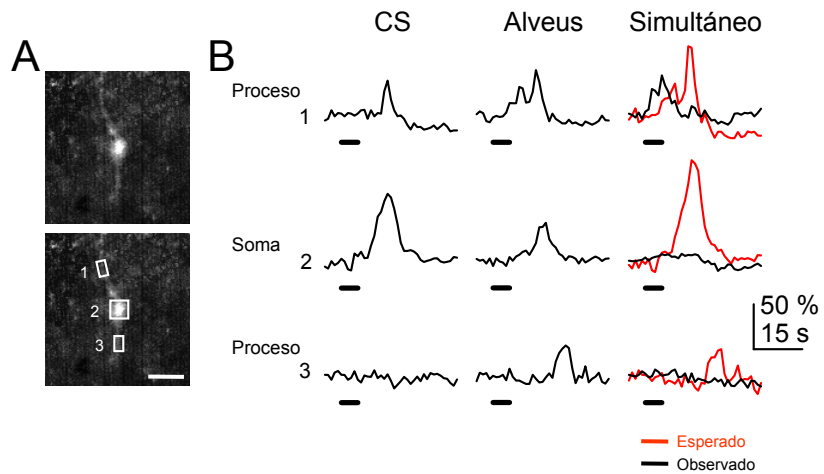
**Figura 14. La modulación de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  depende de los neurotransmisores involucrados.** (A) Respuestas representativas de  $\text{Ca}^{2+}$  inducidas por la aplicación ionofórica independiente o simultánea de Glu (0.7 M) y GABA (0.3 M). (B) Respuestas de  $\text{Ca}^{2+}$  inducidas por la aplicación simultánea de Glu y GABA frente a las respuestas esperadas por la aplicación independiente, cuantificada como la relación entre O/E (n = 4).



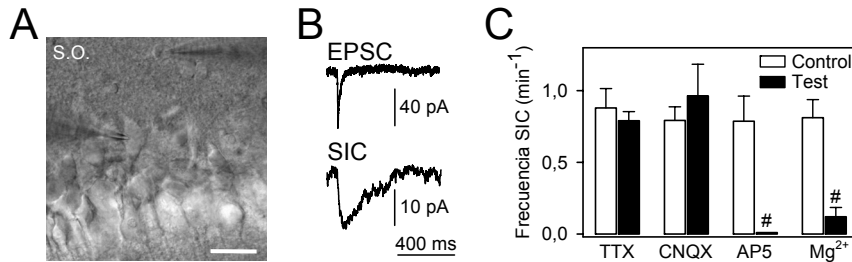
**Figura 15. La modulación de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  depende del grado de actividad sináptica.** (A) Diagrama de puntos de los valores O/E frente a la frecuencia de estimulación de CS. Nótese que las frecuencias de CS son variables mientras la frecuencia de estimulación en alveus permanece constante a 30 Hz ( $n \geq 9$  para cada valor). (B) Aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  inducidos por estimulación independiente o simultánea de CS y alveus con trenes de estímulos a 10 Hz, 5 s. (C) Relación O/E obtenida cambiando conjuntamente las frecuencias de estimulación de CS y alveus (1, 10, 30 y 50 Hz;  $n \geq 10$  para cada barra). Las diferencias significativas respecto del control se establecieron con  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*) y  $p < 0.001$  (\*\*\*)



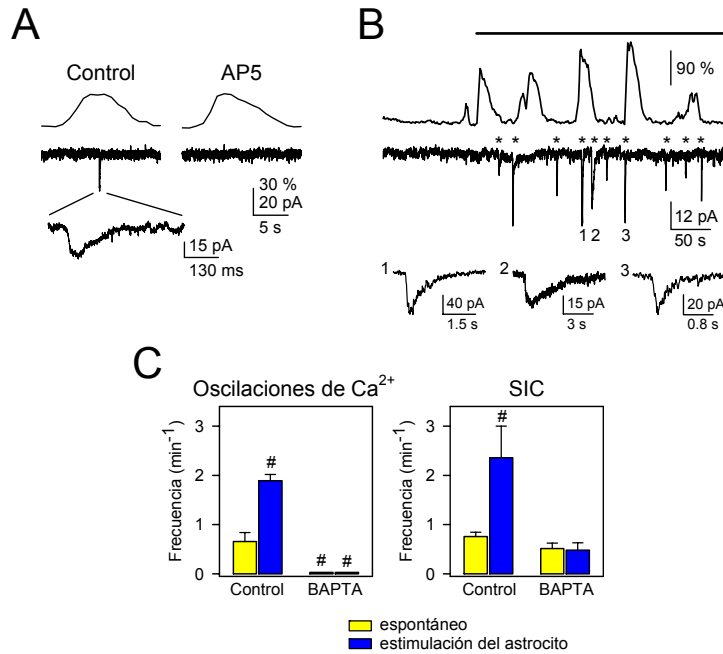
**Figura 16. Regiones subcelulares de los astrocitos muestran modulación de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$ .** (A) Imágenes en pseudocolor representando intensidad de fluorescencia de un astrocito llenado con fluo-3, antes (Pre) y 10 s después (Post) de la estimulación independiente o simultánea de CS y alveus (30 Hz, 5 s). Barra de calibración 15  $\mu\text{m}$ . (B) Cambios en la intensidad de fluorescencia del soma y una región limitada del proceso astrocitario marcados en (A) con los rectángulos 1 y 2, respectivamente. (C) Relación entre las respuestas de  $\text{Ca}^{2+}$  observadas y esperadas en el soma ( $n = 14$ ) y en los microdominios de los procesos ( $n = 24$ ). Las diferencias significativas respecto del control se establecieron con  $p < 0.001$  (\*\*\*)



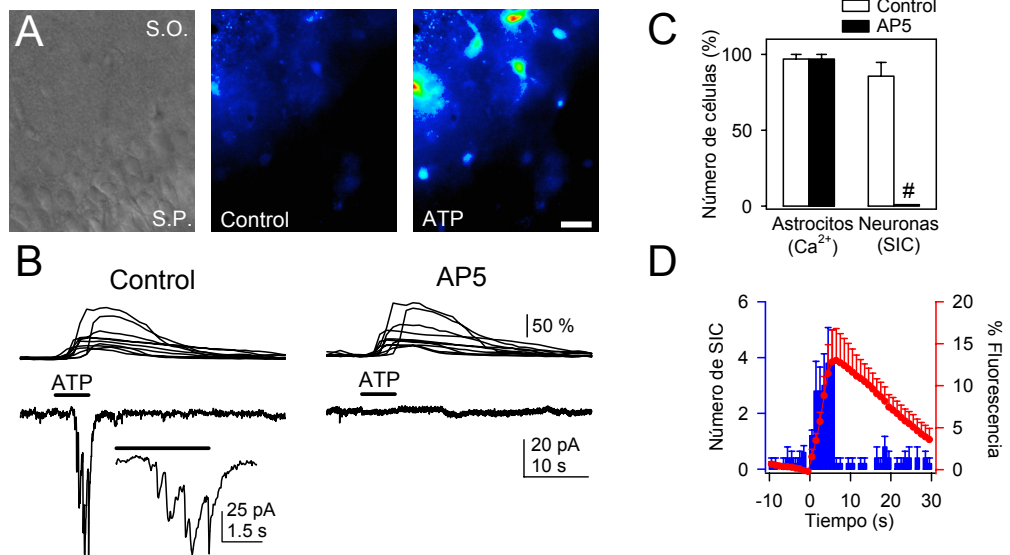
**Figura 17. La modulación de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  controla la propagación intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ .** (A) Imágenes de fluorescencia de un astrocito llenado con fluo-3. Barra de calibración  $15 \mu\text{m}$ . (B) Cambios en la intensidad de fluorescencia en áreas restringidas de dos procesos astrocitarios (1 y 3) y en el soma (2), delimitados por rectángulos en (A), inducidos por la estimulación independiente o simultánea de CS y alveus (30 Hz, 5 s). Nótese que tras la estimulación de alveus, el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  en la región 1 se propaga posteriormente con cierto retraso a las regiones 2 y 3. La estimulación simultánea provoca aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  en la región 1 pero fallos en la propagación de la señal a las regiones 2 y 3.



**Figura 18. Las neuronas piramidales de CA1 presentan las corrientes lentas de entrada (SICs) mediadas por la activación de receptores de glutamato de tipo NMDA.** (A) Imagen de microscopía de infrarrojo con contraste de fase mostrando pares de registros de neuronas piramidales y astrocitos. La pipeta de registro de la neurona está situada a la izquierda y la pipeta de registro del astrocito a la derecha, localizado en *stratum oriens* (SO). Barra de calibración: 25  $\mu\text{m}$ . (B) Respuestas representativas de EPSCs y SICs registradas en una neurona piramidal. Nótese la diferencia en el curso temporal de ambas respuestas, EPSCs:  $\tau_{\text{activación}}$   $2.7 \pm 0.5$  ms,  $\tau_{\text{desactivación rápida}}$   $3.7 \pm 0.6$  ms,  $\tau_{\text{desactivación lenta}}$   $30.6 \pm 3.8$  ms; SICs:  $\tau_{\text{activación}}$   $13.9 \pm 1.7$  ms,  $\tau_{\text{desactivación}}$   $72.5 \pm 11.1$  ms ( $n = 35$ ). (C) Frecuencia media de SICs aparecidas de manera espontánea durante 3-10 min de registro en condiciones control (medio extracelular sin  $\text{Mg}^{2+}$ ) y en presencia de 1  $\mu\text{M}$  TTX, 10  $\mu\text{M}$  CNQX, 50  $\mu\text{M}$  AP5, o 2 mM  $\text{Mg}^{2+}$  (Test;  $n \geq 5$  neuronas en cada caso). La presencia de 2 mM  $\text{Mg}^{2+}$  en el medio extracelular reduce significativamente la frecuencia de SICs ( $0.81 \pm 0.12$  en control frente a  $0.12 \pm 0.06$   $\text{min}^{-1}$ ;  $n = 6$ ), al igual que 50  $\mu\text{M}$  AP-5 bloquea totalmente la aparición de estas corrientes, lo que indica que las SICs están mediadas por la activación de receptores de glutamato de tipo NMDA. Las diferencias significativas respecto del control se establecieron con  $p < 0.001$  (#).

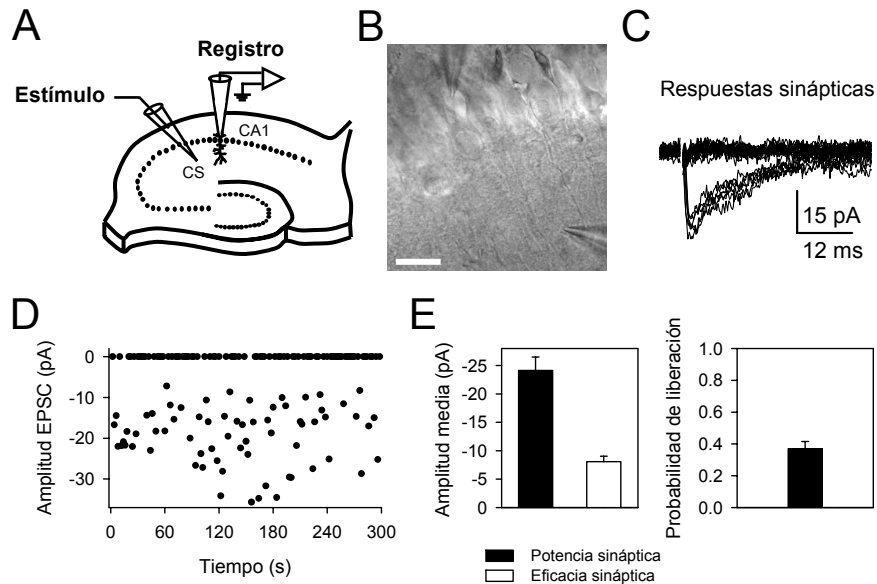


**Figura 19. El aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  en los astrocitos incrementa la frecuencia de SICs en neuronas piramidales de CA1.** (A) Respuestas representativas espontáneas de aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  (trazo superior) y SICs (trazo inferior) registrados simultáneamente en astrocitos y neuronas, respectivamente, en condiciones control y en presencia de  $50 \mu\text{M}$  AP5. En el  $69.2 \pm 4.8\%$  de los casos las SICs neuronales ocurrieron durante el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  en un astrocito adyacente ( $n = 8$  pares de células). (B) Aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitario y SICs neuronales obtenidas de pares de registros en condiciones control y después de la despolarización del astrocito (representado por la barra superior horizontal). Los asteriscos indican la presencia de SICs. Algunas SICs han sido cortadas y tres de ellas (1-3) se representan expandidas en los trazos inferiores. Destacar el aumento de frecuencia tanto de estas corrientes ( $0.76 \pm 0.09$  en control frente a  $2.36 \pm 0.64 \text{ min}^{-1}$  con la despolarización) como de los aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  después de la estimulación astrocitaria ( $0.65 \pm 0.18$  en control frente a  $1.89 \pm 0.12 \text{ min}^{-1}$  con la despolarización;  $n = 8$  pares de células). (C) Frecuencia media de oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  registradas en los astrocitos y frecuencia media de SICs neuronales ocurridas espontáneamente o durante la despolarización de los astrocitos, tanto en condiciones control como en presencia de BAPTA intracelular en la pipeta de registro de los astrocitos ( $n = 6$  pares de células). Las diferencias significativas respecto del control se establecieron con  $p < 0.001$  (#).

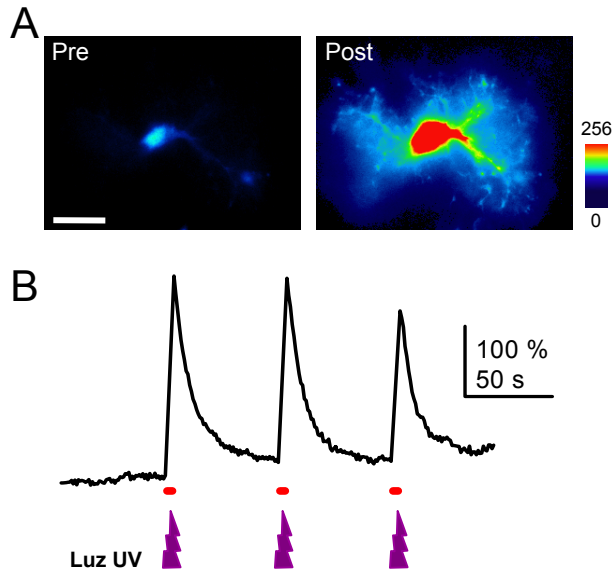


**Figura 20. La estimulación de los astrocitos con ATP induce la aparición de SICs en neuronas piramidales de CA1.** (A) Imagen de microscopía de infrarrojo con contraste de fase e imágenes en pseudocolor representando intensidad de fluorescencia de una rodaja de hipocampo llenada con fluo 3, antes y después de la estimulación por ionoforesis de ATP (20 mM, 5 s). Nótese la escasa fluorescencia de la capa piramidal. S.P.: *stratum pyramidale*; S.O.: *stratum oriens*. Barra de calibración: 30  $\mu$ m. (B) Variaciones de Ca<sup>2+</sup> (trazos superiores) y corrientes de membrana (trazos inferiores) generadas por la aplicación ionoforética de ATP (representado por la barra horizontal), en condiciones control (sin Mg<sup>2+</sup> en el medio extracelular + 1  $\mu$ M TTX) y en presencia de 50  $\mu$ M AP5 (n = 5 neuronas). El trazo que aparece expandido permite distinguir varias SICs en respuesta a la estimulación de los astrocitos con ATP. (C) Número relativo de astrocitos y neuronas que presentan aumentos de Ca<sup>2+</sup> y SICs, respectivamente, después de la aplicación de ATP en condiciones control y en presencia de 50  $\mu$ M AP5 (n = 35 astrocitos y 5 neuronas obtenidos de 5 rodajas). Las diferencias significativas respecto del control se establecieron con p < 0.001 (#). (D) Análisis del número medio de SICs (barras azules) y el aumento promedio de Ca<sup>2+</sup> en los astrocitos (círculos rojos) respecto al tiempo de registro (n = 5 rodajas). El tiempo 0 corresponde al comienzo de la aplicación de ATP (5 s).

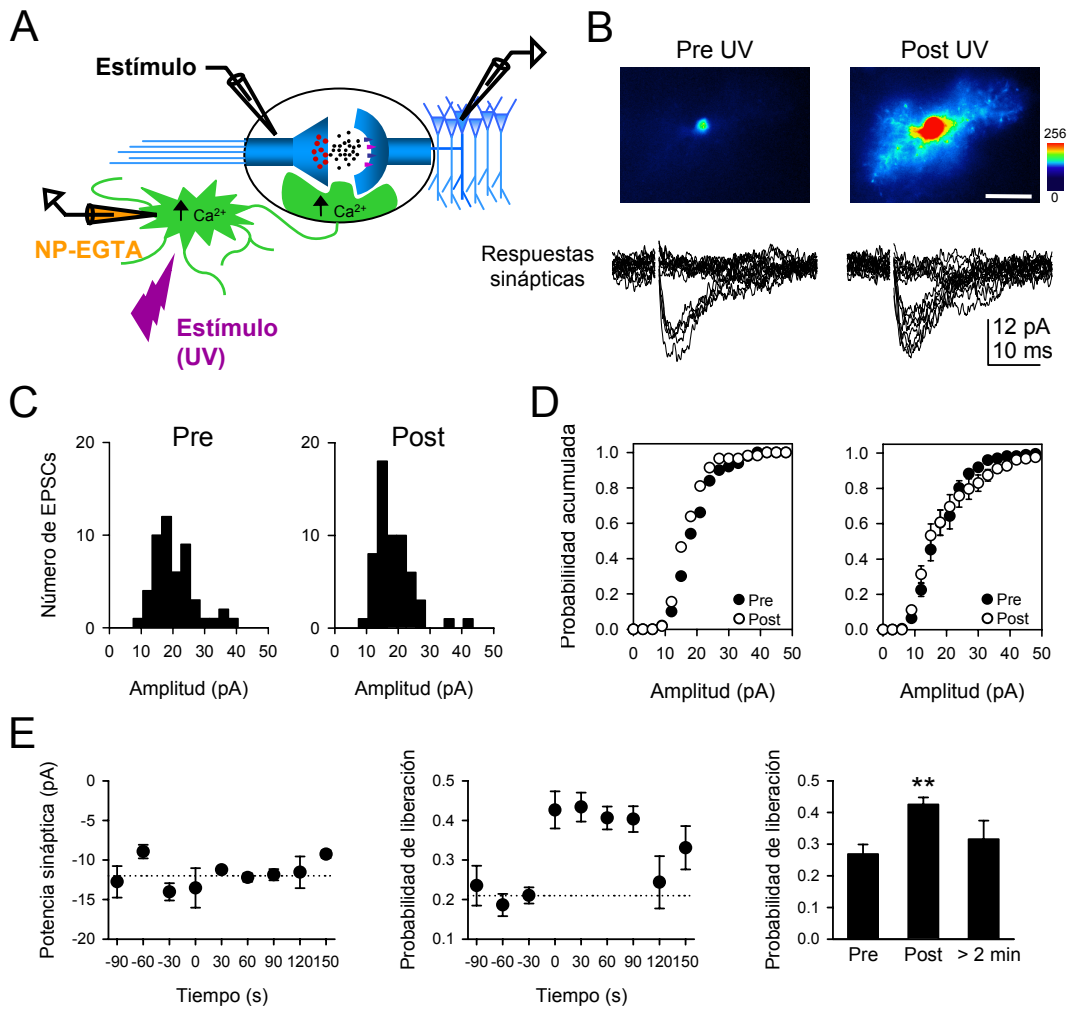




**Figura 21. Respuestas sinápticas obtenidas por estimulación mínima de las CS en neuronas piramidales de CA1.** (A) Esquema del diseño experimental mostrando la posición de los electrodos de estimulación en las CS (izquierda) y de registro (derecha) en la capa piramidal de CA1 en rodajas de hipocampo. (B) Imagen de microscopía de infrarrojo con contraste de fase mostrando la pipeta de registro de la neurona piramidal (arriba) y la pipeta de estimulación de las CS (abajo, localizada en *stratum radiatum*). Barra de calibración: 25  $\mu\text{m}$ . (C) Respuestas sinápticas representativas (EPSCs) obtenidas por el método de estimulación mínima de las CS (0.5 Hz). Nótese la existencia de fallos en la transmisión sináptica y la amplitud pequeña y regular de los aciertos. (D) Diagrama de puntos de las respuestas obtenidas en una neurona piramidal por estimulación mínima de las CS durante 5 min de registro. Los puntos situados en la línea de 0 representan fallos en la transmisión sináptica. (E) Características de las respuestas sinápticas obtenidas por estimulación mínima. Amplitudes medias de la potencia (promedio de los aciertos) y la eficacia sinápticas (promedio de las respuestas incluyendo los fallos;  $n = 150$  estímulos) en neuronas piramidales de CA1 ( $-24.14 \pm 2.36$  pA;  $-8.07 \pm 0.10$  pA, respectivamente). Probabilidad de liberación de neurotransmisor ( $0.37 \pm 0.04$ ;  $n = 9$  neuronas).



**Figura 22. La foto-estimulación con luz UV de astrocitos provoca aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular.** (A) Imágenes en pseudocolor representando intensidad de fluorescencia de un astrocito llenado con NP-EGTA (5 mM) y fluo 4 (50-100  $\mu\text{M}$ ), antes (pre) y después (post) de la estimulación con pulsos de luz UV (2 Hz, 5s). Astrocito localizado en la región de *stratum radiatum*. Nótese el incremento de fluorescencia tanto en el soma celular como en los procesos astrocitarios. Barra de calibración: 10  $\mu\text{m}$ . (B) Respuestas representativas del aumento de fluorescencia en un astrocito llenado con NP-EGTA y fluo 4 generadas por la estimulación repetida (0.016 Hz) con luz UV. Las barras rojas representan el tiempo de estimulación con luz UV (5 s).



**Figura 23. Los astrocitos aumentan la eficacia sináptica a través de mecanismos presinápticos.** (A) Esquema del diseño experimental mostrando pares de registros de neuronas piramidales de CA1 (superior derecha) y astrocitos de *stratum radiatum* (inferior izquierda), y el electrodo de estimulación en las CS (superior izquierda). Una vez realizados los pares de registros y la estimulación mínima (0.5 Hz), se aplican simultáneamente con la estimulación sináptica los pulsos de luz UV (3-4 trenes de luz UV 2 Hz, 5s; cada 0.01 Hz). (B) El aumento de Ca<sup>2+</sup> en los astrocitos incrementa la eficacia sináptica. Imágenes en pseudocolor representando intensidad de fluorescencia de un astrocito llenado con NP-EGTA (5 mM) y fluo 4 (50-100 μM), antes (pre UV) y después (post UV) de la estimulación con pulsos de luz UV (2 Hz, 5s). En la parte inferior se representan las respuestas sinápticas obtenidas por estimulación mínima en una neurona piramidal antes y después de la foto-estimulación del astrocito. Barra de calibración: 10 μm. (C) Diagramas representativos de la distribución de amplitudes de EPSCs registrados en una neurona piramidal antes (pre) y después (post) de la foto-estimulación astrocitaria. Destacar que la estimulación del astrocito no incrementa la amplitud de los EPSCs pero sí el número de éstos. Rango de amplitudes 3 pA. (D) Curvas de probabilidad acumulada de los EPSCs antes (pre) y después (post) de la estimulación astrocitaria con UV. A la izquierda la curva de probabilidad acumulada para las respuestas obtenidas en C. A la derecha la curva de probabilidad acumulada promedio de 4 neuronas. (E) Análisis de los parámetros de estudio (potencia sináptica y probabilidad de liberación) en los pares de registros neurona-astrocito (4 de 8 pares de células). El tiempo 0 indica el inicio de la estimulación de los astrocitos con pulsos de luz UV.