

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Medicina

Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia

**PROPIEDADES DE LA MODULACIÓN SINÁPTICA MEDIADA POR
ASTROCITOS EN LAS COLUMNAS CORTICALES DE LA CORTEZA
SOMATOSENSORIAL PRIMARIA.**

Tesis doctoral

Adolfo Díez García

Madrid, 2016



MINISTERIO DE
ECONOMÍA Y
COMPETITIVIDAD



CONSEJO SUPERIOR
DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS

Dr. Alfonso Araque Almendros, Profesor de Investigación en
excedencia del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en el
Instituto Cajal y Profesor en el Departamento de Neurociencia de la
Universidad de Minnesota,

HACE CONSTAR:

Que Don Adolfo Díez García ha realizado bajo mi dirección los
trabajos de investigación destinados a la obtención del grado de Doctor en
el Instituto Cajal (CSIC) y en la Universidad de Minnesota, cuyos resultados
están recogidos en la presente memoria de Tesis Doctoral titulada
“Propiedades de la modulación sináptica mediada por astrocitos en las
columnas corticales de la corteza somatosensorial primaria”.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, lo firmo a 15 de
Marzo de 2016,

Dr. Alfonso Araque

Profesor de Investigación del CSIC

A cada una de las personas con las que he compartido este camino.

Al Dr. Alfonso Araque. Alfonso, gracias por permitirme conocer un mundo que siempre formará parte de mí.

ABREVIATURAS

μM: Micromolar.

MΩ: Megaohmio.

A1: Receptores para adenosine tipo 1.

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.

CB1: Receptores para endocannabinoides tipo 1.

CNO: Del inglés *clozapine-N-oxide*.

CNQX: 6-ciano-7-nitroquinoxalin-2,3-diona.

CPA: N6-cyclopentyladenoside

DIC: Del inglés *differential interferente contrast*. Contraste de interferencia diferencial.

DREADDs: Del inglés Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs.

eCBs: Endocannabinoides.

EPSC: Del inglés *Excitatory postsynaptic current*. Corriente excitatoria postsináptica.

GABA: Ácido γ-amino-n-Butírico.

GFAP: Del inglés Glial fibrillary acidic protein.

IIE: Intervalo inter espiga.

IP₃: Inositol 1,4,5-trifosfato.

IP₃R2: Receptores de IP₃ de tipo 2.

IPSC: Del inglés *Inhibitory postsynaptic current*. Corriente inhibitoria postsináptica.

LCA: Líquido cefalorraquídeo artificial.

LTD: Del inglés *Long term depression*. Depresión a largo plazo.

LTP: Del inglés *Long term potentiation*. Potenciación a largo plazo.

mAChRs: Receptores muscarínicos colinérgicos.

mGluR: Receptor metabotrópico de glutamato.

mM: Milimolar.

ms: Milisegundo.

mV: Milivoltio.

NeuN: Del inglés *neuronal nuclei*. Marcador específico de núcleos neuronales.

ND: Del inglés *neuronal depolarization*. Despolarización neuronal

NMDA: N-metil-D-aspartato.

PAR1: Receptor de tipo 1 activado por proteasa (PAR-1, del inglés *type 1 Protease-activated receptor*).

pA: picoamperio.

RPP: Razón de pares de pulsos.

TFLLR: H-Thr-Phe-Leu-Leu-Arg-NH₂

VGCCs: Del inglés *voltage-gated calcium channels*. Canales de calcio voltaje dependientes.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	
1. El procesamiento de información en el sistema nervioso: los astrocitos como elementos activos	17
1.1. La señal de calcio es la base de la excitabilidad celular en los astrocitos	18
1.2. El concepto de sinapsis tripartita	20
2. Propiedades espaciales de la comunicación bidireccional astrocito-neurona	21
2.1. Sistema purinérgico y modulación lateral mediada por astrocitos	22
2.2. Sistema endocannabinoide y modulación lateral mediada por astrocitos	24
3. Organización funcional de la corteza cerebral: el concepto de módulo cortical	27
3.1. El Circuito cortical: capas y columnas	28
3.2. Implicación de los astrocitos en la fisiología sináptica de la corteza cerebral	31
II. OBJETIVOS	33

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Declaración ética	39
2. Preparación de rodajas de corteza somatosensorial de ratón .	39
3. Identificación de las láminas y columnas corticales	40
4. Identificación y clasificación de los tipos neuronales	41
5. Registros electrofisiológicos	42
6. Estimulación sináptica	43
7. Estimulación neuronal	44
8. Monitorización de los niveles de calcio en los astrocitos	45
9. Inyección de vector viral AAV8/GFAP-hM3D-mcherry	47
10. Inmunohistoquímica	47
11. Llenado de las neuronas con biocitina	48
12. Utilización de ratones GFAP-CB1R-KO	49
13. Agentes farmacológicos	49
14. Análisis estadístico	50

IV. RESULTADOS

1. Efecto de la activación endógena de los astrocitos sobre la transmisión sináptica heteroneuronal	53
1.1. La señalización mediada por endocannabinoides induce depresión sináptica heteroneuronal en neuronas piramidales de capa 5	53
1.1.1. Estudio de las características del estímulo necesarias para inducir la depresión heteroneuronal	56
1.2. La depresión sináptica heteroneuronal requiere elevaciones de calcio en los astrocitos	62
2. Identificación de los mecanismos de señalización subyacentes a la regulación lateral mediada por astrocitos	68
2.1. La estimulación de los astrocitos produce una depresión sináptica a través de la activación de receptores presinápticos de tipo A1	68
2.2. La depresión sináptica heteroneuronal requiere señalización mediada por endocannabinoides en astrocitos	70
3. Estudio de la regulación heteroneuronal mediada por astrocitos en la microorganización de la columna cortical	74
3.1. La depresión heteroneuronal mediada por astrocitos obedece un patrón columnar específico	74

3.2. La respuesta astrogliar a endocannabinoides obedece un patrón columnar y laminar específico	76
3.3. La modulación sináptica mediada por astrocitos obedece un patrón laminar específico	80
V. DISCUSIÓN	87
VI. CONCLUSIONES	99
VII. BIBLIOGRAFÍA	105

I.INTRODUCCIÓN

1. EL PROCESAMIENTO DE INFORMACIÓN EN EL SISTEMA NERVIOSO: LOS ASTROCITOS COMO ELEMENTOS ACTIVOS.

La función del sistema nervioso consiste en procesar información de manera rápida y eficaz, permitiendo coordinar diferentes sistemas y haciendo posible que el organismo ejecute respuestas flexibles y ajustadas a un entorno dinámico. El procesamiento de información es posible gracias a la comunicación entre los distintos elementos que conforman el sistema nervioso. Las neuronas son los componentes fundamentales y basan su excitabilidad en cambios en el potencial de membrana. Estas variaciones se deben al movimiento de iones a través de diferentes tipos de canales iónicos que, a través de la activación de ciertos mecanismos, generan la activación celular. A su vez, la respuesta neuronal puede transmitirse a otros elementos por medio de estructuras especializadas denominadas sinapsis.

Existen dos tipos de sinapsis: química y eléctrica, ambas compuestas por un elemento presináptico y un elemento postsináptico. En las sinapsis eléctricas estos componentes están íntimamente ligados, de modo que las variaciones en el potencial de membrana del elemento presináptico se propagan al elemento postsináptico directamente a través de canales especiales formados por conexinas. Por el contrario, en las sinapsis químicas los dos elementos se encuentran separados por la hendidura sináptica, un espacio al que se liberan biomoléculas conocidas como neurotransmisores. La unión de estas moléculas a distintos tipos de receptores presentes en su mayoría en la membrana postsináptica desencadena una serie de mecanismos que permiten la transmisión de la señal nerviosa.

LA SEÑAL DE CALCIO ES LA BASE DE LA EXCITABILIDAD CELULAR EN LOS ASTROCITOS:

La base del procesamiento de información es la transmisión de la señal nerviosa entre los elementos neuronales. No obstante, entre los diferentes tipos celulares que componen el sistema nervioso se encuentran los astrocitos. Estas células son capaces de responder a la actividad neuronal circundante gracias a la activación de multitud de receptores funcionales expresados en su membrana (Araque, et al., 2001; Nedergaard et al., 2003; Volterra & Meldonesi, 2005; Haydon & Carmignoto, 2006; Theodosis et al., 2008; Perea et al., 2009; Parpura & Zorec, 2010; Araque *et al.*, 2014; Perea *et al.*, 2014a). Sin embargo, a diferencia de las neuronas, la activación de los receptores de membrana en los astrocitos no produce cambios en su potencial eléctrico. Por el contrario, estas células basan su excitabilidad en variaciones de los niveles de calcio intracelular (Cornell-Bell et al., 1990; Charles et al., 1991).

Los receptores de membrana presentes en los astrocitos son principalmente de naturaleza metabotrópica y su activación tiene como consecuencia la producción de IP₃. El principal lugar de almacenamiento de calcio en los astrocitos es el retículo endoplasmático, de donde es liberado por medio de la activación de canales de calcio activados por ligando. Existen dos tipos de receptores implicados en la salida de calcio desde el retículo de los astrocitos, los receptores IP₃ de tipo 2 (IP₃R₂) y los receptores de Rianodina (RyR), que son activados por IP₃ y por calcio, respectivamente (Hua *et al.*, 2004; Parpura & Zorec, 2010; Zorec *et al.*, 2012).

Las elevaciones en los niveles de calcio citoplasmático tienen importantes consecuencias fisiológicas ya que inducen la fusión vesicular y la liberación de gliotransmisores mediante la activación del complejo SNAP-SNARE (Araque *et al.*, 2000; Zorec *et al.*, 2012). Además, la activación de receptores IP₃R₂ en los astrocitos se ha relacionado con la

modulación de la transmisión sináptica tanto a corto como a largo plazo (Holtzclaw *et al.*, 2002; Fiacco & McCarthy, 2004; Tanaka *et al.*, 2011; Navarrete *et al.*, 2012).

Recientemente se ha relacionado una parte de las elevaciones de calcio intracelular en los astrocitos con la activación de canales TRPA1 (del inglés *Transient Receptor Potential*) presentes en la membrana citoplasmática de estas células. La activación de los canales TRPA1 desencadena la entrada de calcio desde el espacio extracelular. Estudios realizados en los últimos años señalan que los canales TRPA1 son responsables del 20% de los eventos de calcio en los astrocitos de hipocampo estando además relacionados con formas de regulación de la transmisión sináptica tanto glutamatérgica como GABAérgica (Shigetomi *et al.*, 2013; Shigetomi *et al.*, 2013).

La señal de calcio en los astrocitos se inicia por la liberación de neurotransmisores liberados desde los terminales sinápticos y tienen lugar en compartimentos subcelulares específicos denominados *microdominios* (Grosche *et al.*, 1999; Perea & Araque, 2005; Di Castro *et al.*, 2011; Panatier *et al.*, 2011). Las elevaciones en los niveles de calcio restringidas a un microdominio están relacionadas con la actividad neuronal espontánea y se denominan *eventos locales* (Di Castro *et al.*, 2011). No obstante, bajo diferentes condiciones, la señal de calcio puede expandirse desde los *microdominios* a otras regiones dentro de un mismo proceso e incluso a la célula entera. Estos fenómenos de propagación de la señal de calcio están mediados por actividad sináptica dependiente de potenciales de acción (Di Castro *et al.*, 2011). Distintos estudios han mostrado que la propagación espacial de la señal de calcio en los astrocitos no es un fenómeno pasivo, sino que parece ser un proceso regulado y dependiente tanto de la actividad neuronal como de la interacción entre diferentes señales sinápticas (Grosche *et al.*, 1999; Perea & Araque, 2005; Di Castro *et al.*, 2011; Panatier *et al.*, 2011).

Además, los eventos de calcio no se encuentran restringidos a un solo astrocito si no que, por el contrario, pueden transmitirse a los astrocitos adyacentes generando así un fenómeno conocido como *onda de calcio*. Las *ondas de calcio* son una forma de comunicación astrocito-astrocito descritas inicialmente en cultivos, donde se observó que la señal de calcio intracelular podía viajar de una célula a otra, llegando a recorrer hasta $450 \mu\text{m}^2$ sin disminución de la señal (Cornel-Bell *et al.*, 1990; Charles *et al.*, 1991; Newman & Zahs, 1997; Innocenti *et al.*, 2000; Peters *et al.*, 2005). Pese a las evidencias obtenidas por los estudios realizados en cultivos de astrocitos, la existencia de *ondas de calcio* en preparaciones donde el circuito neuronal se encuentra preservado, como en rodajas de cerebro o *in vivo*, aún es controvertida. Aunque se ha comprobado la existencia de este tipo de eventos de calcio tanto en rodajas como *in vivo*, éstos se han observado habitualmente asociados a estados patológicos (Agulhon *et al.*, 2012). Por otro lado, estudios realizados en tejido no patológico muestran que las ondas de calcio involucran a un número menor de astrocitos, quedando restringidas a un área menor (Schipke *et al.*, 2002; Sul *et al.*, 2004).

Por tanto, los astrocitos son elementos excitables del sistema nervioso que basan su activación en variaciones en los niveles de calcio intracelular. De este modo pueden responder a la actividad sináptica y comunicarse entre sí, pudiendo además modular la trasmisión de la señal nerviosa.

EL CONCEPTO DE SINAPISIS TRIPARTITA

Como se ha señalado, los astrocitos son elementos excitables del sistema nervioso capaces de responder a estímulos sinápticos. Durante las dos últimas décadas gran cantidad de trabajos han mostrado que estas células pueden responder a la actividad neuronal liberando sustancias neuroactivas denominadas gliotransmisores, que una vez unidos a

receptores de membrana en las neuronas son capaces de modular la transmisión sináptica (Araque et al., 2001; Nedergard et al., 2003; Volterra & Meldolesi, 2005; Haydon & Carmignoto, 2006; Theodosis et al., 2008; Perea et al., 2009; Parpura & Zorec, 2010; Araque et al., Perea et al., 2014a).

Existe por tanto un intercambio bidireccional de señales entre los astrocitos y las neuronas. En base a este hecho, a finales del siglo XX se propuso el concepto de *sinapsis tripartita*, que defiende la idea de que los astrocitos son elementos integrales y funcionales de las sinapsis y que, por tanto, juegan un papel activo en el procesamiento de información en el sistema nervioso (Araque et al., 1999). La idea de sinapsis tripartita es por tanto una reinterpretación del concepto clásico de sinapsis en el que únicamente eran considerados como elementos activos los componentes neuronales. Bajo esta concepción la sinapsis estaría formada por un elemento presináptico, otro postsináptico y un componente astrogliar.

2. PROPIEDADES ESPACIALES DE LA COMUNICACIÓN ASTROCITO-NEURONA

La comunicación bidireccional astrocito-neurona en el marco de la sinapsis tripartita no se encuentra espacialmente restringida a la sinapsis activa y al proceso astrogliar adyacente. Debido a las propiedades morfológicas y funcionales de los astrocitos, como por ejemplo la propagación en el espacio de la señal de calcio (Grosche et al., 1999; Perea & Araque, 2005; Di Castro et al., 2011; Panatier et al., 2011), la comunicación intercelular entre astrocitos (Giaume & McCarthy, 1996; Rouach et al., 2008; Giaume et al., 2010) y la extensa ramificación celular que permite que un solo astrocito pueda estar en contacto con miles de sinapsis (Ventura & Harris, 1999; Bushong et al., 2002; Halassa et al., 2007) existen procesos de regulación sináptica mucho más complejos llevados a cabo por este subtipo celular. La estimulación de un astrocito

por la actividad de ciertas sinapsis puede llevar a la regulación heteroneuronal de otras sinapsis mediante un mecanismo de señalización astrogial que puede servir de puente entre sinapsis lejanas en un fenómeno denominado *regulación lateral* (Covelo & Araque, 2015).

SITEMA PURINERGICO Y MODULACIÓN LATERAL MEDIADA POR ASTROCITOS

La base del sistema purinérgico es la molécula denominada ATP (del inglés *Adenosine TriPhosphate*). Esta molécula es un nucleótido principalmente relacionado con la obtención de la energía celular, papel con el que pronto se la relacionó tras su descubrimiento en 1929 por Karl Lohmann. No obstante, en una serie de trabajos publicados entre las décadas de 1960 y 1970 se demostró que el ATP jugaba un papel importante como neurotransmisor en el sistema nervioso (Burnstock *et al.*, 1963; Holton, 1959; Su *et al.*, 1971). El ATP es rápidamente degradado en el medio extracelular por ATPasas a ADP (del inglés *Adenosine Diphosphate*), ambas moléculas ejercen su efecto sobre un subgrupo de receptores purinérgicos denominados P2. Estos receptores están ampliamente expresados en multitud de tipos celulares en diferentes sistemas del organismo y se subdividen a su vez en receptores del tipo P2X y P2Y, cada uno con diferentes subfamilias con funciones y localizaciones distintas. Además, dado que el ATP continua degradándose en el medio extracelular hasta convertirse en adenosina, existe una segunda familia de receptores purinérgicos denominados P1, que son activados por ésta molécula producto de la degradación del ATP. Así, la adenosina activa receptores del tipo P1, que están compuestos por cuatro subfamilias denominadas A1, A_{2A}, A_{2B} y A3, de las cuales A1, A_{2A} y A3 están ampliamente expresadas en el cerebro (Burnstock, 2012).

En preparaciones con rodajas de cerebro se ha demostrado que los astrocitos están relacionados con el sistema purinérgico, ya que expresan receptores tanto del tipo P2X como P2Y funcionales, que al ser activados por ATP liberado sinápticamente son capaces de aumentar los niveles de calcio en estas células. Así, se ha demostrado que los astrocitos responden a ATP en hipocampo, cerebelo, retina y bulbo olfatorio (Bowser y Khakh, 2004; Beierlein y Regehr, 2006; Piet y Jahr, 2007; Newman, 2005; Rieger et al., 2007). Además de responder a la señalización purinérgica los astrocitos son también capaces de liberar ATP/adenosina en estructuras como el cerebelo, donde producen una depresión de los EPSCs espontáneos (Brockhaus y Deitmer, 2002) o el hipocampo, donde también son capaces de modular la transmisión sináptica. En concreto, la estimulación tetánica realizada sobre un grupo de sinapsis de las colaterales de Schaffer del hipocampo es capaz de generar una depresión sobre un segundo grupo de sinapsis no estimuladas de la misma neurona piramidal de la región CA1. Este fenómeno de depresión de la transmisión sináptica se debe a complejos mecanismos de señalización entre astrocitos y neuronas. Durante la estimulación de las colaterales de Schaffer se libera glutamato desde las terminales sinápticas que, además de activar neuronas piramidales de CA1, estimula interneuronas GABAérgicas. La liberación de GABA desde estas neuronas activa receptores de tipo GABA-B en astrocitos induciendo aumentos en sus niveles de calcio y liberación del gliotransmisor ATP desde estas células. El ATP, una vez degradado a adenosina, genera una depresión en la transmisión excitatoria de las sinapsis no estimuladas (Zhang *et al.*, 2003; Serrano *et al.*, 2006; Andersson *et al.*, 2007). Estos resultados muestran cómo la actividad de ciertas sinapsis puede modular otras sinapsis gracias a la contribución de los astrocitos.

SITEMA ENDOCANNABINOIDE Y MODULACIÓN LATERAL MEDIADA POR ASTROCITOS

Además de participar en fenómenos de depresión lateral de la transmisión sináptica, los astrocitos pueden potenciar la actividad de sinapsis lejanas a través de mecanismos que implican la señalización por endocannabinoides.

Los cannabinoides ejercen sus efectos mediante la activación de receptores específicos de membrana. Hasta el momento, se han caracterizado dos tipos de receptores de cannabinoides, denominados receptores CB1 y CB2, aunque se postula la existencia de receptores adicionales (Matsuda et al., 1990; Munro et al., 1993). Estos receptores pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G, caracterizados por presentar siete dominios transmembrana, conteniendo 472-473 aminoácidos organizados. El receptor CB1 se expresa abundantemente en hipocampo, corteza, ganglios basales y cerebelo donde desempeña funciones neuromodulatorias relevantes en la fisiología cerebral (Chevalyere et al., 2006; Freund et al., 2003; Heifets y Castillo, 2009; Rodriguez et al., 2001). En menor grado de expresión, se encuentra también en hipotálamo y médula espinal. También se encuentra en el sistema nervioso periférico y en otros sistemas del organismo. El receptor CB1 aparece principalmente como receptor presináptico y su efecto fundamental es la regulación de la liberación de algunos neurotransmisores, como dopamina, noradrenalina, glutamato y serotonina (Ishac et al., 1996; Shen et al., 1998; Szabo et al., 1999). Recientemente se ha observado la presencia del receptor CB1 en la membrana mitocondrial de neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo, donde contribuye a regular el metabolismo de la célula (Benard et al., 2012). Por su parte, los receptores CB2 son expresados principalmente por las células del sistema inmune, también en una gran

variedad de líneas de células inmunes en cultivo (Howlett et al., 1998) y en distintos tejidos como bazo, timo, amígdalas, médula ósea y páncreas.

Los endocannabinoides son compuestos endógenos sintetizados y liberados principalmente por las neuronas, capaces de unirse y activar receptores de membrana y finalmente son inactivados por recaptación y degradación enzimática en el interior de la célula. A diferencia de lo que ocurre con otros neurotransmisores, los endocannabinoides no son almacenados en el interior de vesículas sinápticas debido a la naturaleza lipofílica de estos compuestos (Piomelli, 2003). Su almacenamiento se produce en forma de un precursor (fosfolípido de membrana). Su síntesis se produce mediante hidrólisis de estos lípidos de membrana en el momento que existe necesidad de los mismos y son rápidamente recaptados por un transportador de alta afinidad, presente tanto en las neuronas como en las células gliales. Este mismo transportador puede facilitar también la difusión del endocannabinoide nuevamente sintetizado al espacio extracelular (Beltramo et al., 1997; Di Marzo et al., 1994). Una vez en el interior celular, los endocannabinoides son degradados por enzimas específicos. Así por ejemplo, la anandamida es degradada por la hidrolasa de la amida del ácido graso (FAAH) y el 2-araquidonilglicerol (2-AG) es degradado por la lipasa del monoacilglicerol.

Los principales mecanismos intracelulares en los que están implicados los receptores de cannabinoides CB1 incluyen la inhibición de la adenilato ciclasa, la regulación de diferentes canales iónicos y la activación de la vía de las MAP quinasas (Howlett, 1998, Guzmán et al., 2001). Se cree que el acoplamiento de estos receptores a proteínas Gi/o constituye la base de todos estos efectos. También inhiben los canales de calcio de tipo N, L (Mackie y Hille, 1992) y P/Q (Devane et al., 1988) y aumentan la conductancia del K⁺. El efecto combinado sobre ambos tipos de canales y el hecho de que la localización de estos receptores CB1 sea preferentemente presináptica, parece ser la base de la inhibición que los cannabinoides ejercen sobre la liberación de neurotransmisores. Finalmente, todos estos mecanismos de señalización pueden modular la

comunicación sináptica y la expresión génica neuronal (Wilson y Nicoll, 2002; Chevalleyre et al., 2006; Heifets y Castillo, 2009).

En preparaciones de astrocitos *in situ*, se ha demostrado con microscopía electrónica y anticuerpos dirigidos contra la porción N-terminal de los receptores CB1, que los astrocitos expresan receptores CB1 en el núcleo caudado putamen, núcleo accumbens (Rodríguez et al., 2001), en el asta dorsal de la médula espinal y en la amígdala. (Moldrich y Wenger, 2000; Salio et al., 2002). Por otra parte, la producción de endocannabinoides por astrocitos en cultivo está bien documentada (Walter et al., 2002; Walter y Stella, 2003). En cultivo, la síntesis de cannabinoides por astrocitos está regulada por Ca²⁺, puesto que la estimulación de los astrocitos con ionomicina, ATP o endotelina-1 aumenta la producción de endocannabinoides (Walter et al., 2002; Walter y Stella, 2003). Además, en rodajas de hipocampo de ratón se ha demostrado que, junto a la acción directa sobre terminales sinápticas próximas a la neurona desde la que son liberados (< 20 µm, ver Wilson & Nicoll, 2001; Piomelli, 2003; Chevalleyre & Castillo, 2004; Chevalleyre *et al.*, 2006), los endocannabinoides también activan receptores CB1 presentes en los astrocitos (Navarrete & Araque, 2008). La activación de los astrocitos a través de endocannabinoides liberados por neuronas piramidales de CA1 en el hipocampo induce aumentos en los niveles de calcio y genera la liberación de glutamato en regiones distantes. Esta liberación de glutamato iniciada por la señalización por endocannabinoides sobre los astrocitos produce un aumento de la neurotransmisión en sinapsis relativamente lejanas (> 70 µm; ver Navarrete & Araque, 2010). Por ello, al efecto clásico de depresión de la transmisión sináptica atribuido a la señalización por endocannabinoides, debe añadirse un segundo mecanismo de potenciación de la transmisión sináptica a larga distancia mediado por la activación de receptores CB1 en astrocitos y la liberación de glutamato desde estas células. Esta forma de modulación lateral de la transmisión sináptica mediada por astrocitos puede contribuir además al establecimiento de fenómenos plásticos. Estudios recientes han mostrado que la coincidencia entre la liberación de

glutamato desde los astrocitos inducida por endocannabinoides y la liberación de óxido nítrico producido por una actividad postsináptica activan mecanismos que generan potenciación de la transmisión sináptica a largo plazo (Gómez-Gonzalo *et al.*, 2014). Junto a los estudios que han desvelado el papel de la señalización por endocannabinoides sobre astrocitos en el hipocampo, recientemente se ha demostrado la comunicación bidireccional astrocito-neurona en corteza somatosensorial. En concreto, la activación de receptores CB1 en astrocitos genera la liberación del gliotransmisor glutamato que, coincidiendo con la activación de una neurona postsináptica, logra generar un proceso de depresión de la transmisión sináptica a largo plazo en esa neurona (Min y Nevian, 2012).

Estos resultados muestran que la participación de los astrocitos en la señalización por endocannabinoides está presente en estructuras como la corteza somatosensorial o el hipocampo, estructura esta última donde además desencadena fenómenos de modulación lateral de la transmisión sináptica tanto a corto como a largo plazo. Mediante este mecanismo de comunicación, los astrocitos pueden integrar y transferir señales desde una sinapsis a otra más alejada incluso cuando no existe una comunicación neuronal directa entre ellas, lo que aumenta la capacidad de regulación de la actividad de estas células al estar implicadas en la modulación espacial de la señal nerviosa, lo cual puede suponer importantes implicaciones funcionales.

3. ORGANIZACIÓN FUNCIONAL DE LA CORTEZA CEREBRAL: EL CONCEPTO DE MÓDULO CORTICAL.

La corteza cerebral es una estructura que cubre los dos hemisferios cerebrales. Es la región más compleja del sistema nervioso tanto en su organización celular como en lo relativo a las funciones que alberga. Tradicionalmente se han atribuido a la corteza cerebral las habilidades cognitivas únicas que poseen los mamíferos. Esta estructura está

organizada en diferentes regiones con funciones que se encargan desde el procesamiento de la información sensorial hasta la planificación de tareas que requieren manejar gran cantidad de elementos simbólicos y abstractos. Todas estas funciones dependen de estructuras corticales especializadas, que interactúan a su vez con otras regiones de la corteza para integrar y procesar información de forma muy compleja.

EL CIRCUITO CORTICAL: CAPAS Y COLUMNAS

La corteza se encuentra formada por distintas láminas que permiten establecer una división en dos grandes tipos fundamentales: el *isocortex* y el *allocortex*. El isocortex o neocórtex corresponde a la parte de la corteza formada por seis láminas, mientras que el allocortex, compuesto por el *archicórtex* (hipocampo y *fascia dentata*) y el *paleocórtex* (corteza olfativa), presenta una estructura laminar compuesta por tres capas. Las seis capas que componen el neocórtex albergan distintos elementos neuronales y reciben nombres diferentes:

Capa 1: También conocida como *capa molecular* o *plexiforme externa*. Posee una baja densidad celular compuesta por distintos tipos de interneuronas. Recibe aferencias talámicas y alberga las arborizaciones dendríticas de las grandes neuronas piramidales pertenecientes a capas inferiores.

Capa 2: También conocida como *capa granular externa*. Está compuesta principalmente por neuronas piramidales de pequeño tamaño y por distintos tipos de interneuronas.

Capa 3: También conocida como *capa piramidal externa*. Está compuesta principalmente por neuronas piramidales de pequeño y

mediano tamaño cuyos axones proyectan a regiones corticales del hemisferio contrario. Esta lámina, junto a la capa 2, alberga los axones procedentes de las láminas 2/3 pertenecientes al hemisferio contrario (*aferencias corticocorticales interhemisféricas*), así como sirve de entrada a los axones de ciertos tipos celulares de capa 4. Además alberga distintos tipos de interneuronas.

Capa 4: También conocida como *capa granular interna*. Está compuesta por neuronas piramidales, interneuronas inhibitorias e interneuronas excitatorias. Esta lámina recibe la mayor parte de las aferencias talámicas, convirtiéndose en la mayor entrada de información a la corteza.

Capa 5: También conocida como *capa piramidal interna o ganglionar*. Está compuesta principalmente por neuronas piramidales de gran tamaño cuyos axones proyectan a estructuras subcorticales, convirtiéndose así en la salida de información de la corteza. Alberga además distintos tipos de interneuronas inhibitorias.

Capa 6: También conocida como *capa fusiforme*. Está compuesta por neuronas piramidales y por células de morfología irregular. Los axones que abandonan esta lámina cortical tienen como destino el tálamo.

El flujo de información procesada en la neocorteza implica complejas conexiones entre los elementos situados en cada una de las seis capas. No obstante, a modo de simplificación del sistema puede asumirse un esquema básico de procesamiento cortical. Así, la información procedente de los núcleos talámicos accedería al circuito a través de la capa 4, donde se realiza el primer relevo; el flujo de información continuaría hacia las capas 2/3 para terminar descendiendo y abandonando la corteza a través de los axones de las neuronas piramidales de la quinta lámina neocortical.

El procesamiento de información en la corteza cerebral no depende únicamente de la disposición horizontal de los elementos neuronales. A mediados del siglo XX la disposición laminar se combinó con la idea de una organización vertical adicional, dando lugar al concepto de *unidad elemental de operación*, que proponía que la corteza cerebral estaba formada por pequeños cilindros que contenían cadenas verticales de neuronas pertenecientes a cada capa (Lorente de Nó, 1933, 1938). Basándose en esta idea introducida por Lorente de Nó, autores como Vernon Mountcastle, David Hubel, Torsten Wiesel, János Szentágothai, Ted Jones o Pasko Rakic realizaron estudios anatómicos y fisiológicos que terminaron desarrollando la hipótesis de la organización columnar de la corteza (para una revisión de estos primeros estudios, ver Mountcastle, 1998).

Actualmente esta hipótesis es la más extendida a la hora de explicar el funcionamiento de la corteza. Según esta idea, la unidad fundamental de la organización cortical está compuesta por grupos de neuronas interconectados que comparten ciertas propiedades y que se extienden verticalmente a través de las capas corticales para formar una columna (Krieger *et al.*, 2007). Si bien esta interconexión entre los elementos de la columna cortical viene dada por las propiedades morfológicas de las neuronas que la componen, dando lugar a un mayor número de conexiones entre las células de una misma columna que con células de módulos adyacentes, es importante señalar que estas estructuras se definen principalmente desde el punto de vista funcional y no anatómico. De este modo, la idea esencial asume que los elementos neuronales que componen una columna procesan el mismo tipo de información (Mountcastle, 1957; Hubel & Wiesel, 1959).

IMPLICACIÓN DE LOS ASTROCITOS EN LA FISIOLOGÍA SINÁPTICA DE LA CORTEZA CEREBRAL.

Al igual que en otras regiones cerebrales, la evidencia acumulada en los últimos años permite afirmar que los astrocitos participan en el procesamiento de la información en la corteza. La implicación de los astrocitos en la modulación de la transmisión sináptica ha sido demostrada recientemente. En concreto, durante la activación coincidente de axones de capa 4 y neuronas piramidales de capa 2/3 los astrocitos elevan sus niveles de calcio por medio de receptores CB1 lo que, al igual que en hipocampo, genera la liberación de glutamato desde estas células. La liberación del gliotransmisor activa receptores presinápticos de tipo NMDA, induciendo una depresión de la transmisión sináptica a largo plazo en neuronas de capa 2/3 (Min & Nevian, 2012).

Además, estudios realizados *in vivo*, donde se ha empleado la corteza somatosensorial y el sistema de las vibrisas como paradigma, muestran que los astrocitos aumentan sus niveles de calcio tras la estimulación sensorial en un mecanismo dependiente de receptores metabotrópicos de glutamato (Wang *et al.*, 2006). También en preparaciones *in vivo* y empleando la corteza somatosensorial correspondiente a las vibrisas, otros estudios han combinado la estimulación sensorial con la activación de las aferencias colinérgicas a la corteza somatosensorial. En estas condiciones se genera un aumento en la transmisión sináptica registrada mediante potenciales de campo, en un mecanismo dependiente de la activación de receptores muscarínicos en astrocitos (mACh) que inducen la liberación de d-serina desde estas células (Takata *et al.*, 2011).

Todos estos trabajos desvelan la participación de los astrocitos en la función sináptica cortical. No obstante, existen además evidencias que

sugieren que las respuestas de estas células a la señalización neuronal obedecen un patrón que se relaciona con la organización modular de la corteza. En un estudio realizado en 2008 empleando la región de los barriles en rodajas de corteza somatosensorial de ratón se monitorizaron los niveles de calcio en astrocitos y neuronas antes y después de la estimulación directa de la capa 4. Los resultados de este trabajo muestran que los astrocitos de capa 2/3 responden a la estimulación de fibras glutamatérgicas de capa 4 pero no a aferencias glutamatérgicas procedentes de la capa 2/3 de la columna adyacente (Schipke *et al.*, 2008). Estos resultados indican que los astrocitos responden selectivamente a la actividad sináptica siguiendo un patrón relacionado con la organización funcional de la corteza.

II. OBJETIVOS

La evidencia experimental acumulada durante los últimos 20 años permite afirmar que los astrocitos juegan un papel clave en la fisiología sináptica, respondiendo con aumentos en los niveles de calcio intracelular ante diferentes neurotransmisores y liberando gliotransmisores capaces de modular la transmisión sináptica en diferentes estructuras del sistema nervioso (Perea, *et al.*, 2009; Araque, *et al.*, 2014; Volterra, *et al.*, 2014). Algunos de estos trabajos muestran que en la corteza la estimulación sensorial o la estimulación neuronal directa inducen elevaciones de calcio en los astrocitos (Wang, *et al.*, 2006; Schummers, *et al.*, 2008; Benedetti, *et al.*, 2001; Takata, *et al.*, 2011; Schipke, *et al.*, 2008; Min & Nevian, 2012), lo que produce la liberación de gliotransmisores, como glutamato o d-serina, capaces de regular la transmisión sináptica (Takata, *et al.*, 2011; Min & Nevian, 2012).

Además de participar en fenómenos de regulación y plasticidad de la transmisión nerviosa, los astrocitos pueden modular la actividad a larga distancia actuando sobre sinapsis relativamente alejadas del origen de la señal (Navarrete & Araque, 2010; Zhang, *et al.*, 2003; Pascual, *et al.*, 2005; Serrano, *et al.*, 2006). Este fenómeno de modulación de la transmisión sináptica mediado por astrocitos se denomina regulación lateral (Covelo & Araque, 2015).

La señalización por endocannabinoides es uno de los múltiples mecanismos propuestos recientemente como forma de comunicación entre astrocitos y neuronas. Esta forma de comunicación aparece en diferentes regiones cerebrales, incluyendo el neocortex. La activación endógena de receptores de tipo 1 para endocannabinoides (CB1Rs) en astrocitos regula la transmisión sináptica, en concreto modula la plasticidad en corteza somatosensorial y genera fenómenos de regulación lateral en hipocampo (Min & Nevian, 2012; Navarrete & Araque, 2010).

Partiendo de estos resultados y empleando el sistema de señalización por endocannabinoides como herramienta para activar

fisiológicamente los astrocitos corticales planteamos como primer objetivo:

El estudio del efecto de la activación endógena de los astrocitos corticales sobre la transmisión sináptica heteroneuronal.

El segundo objetivo propuesto es:

Identificar los mecanismos de señalización subyacentes a la regulación sináptica heteroneuronal mediada por astrocitos.

La organización celular de la corteza ha sido estudiada durante años dando lugar al concepto de unidad mínima de procesamiento cortical, donde los elementos neuronales se disponen vertical y horizontalmente formando columnas compuestas por seis capas interconectadas (Mountcastle, 1997). La hipótesis de la organización columnar de la corteza es hoy día la más aceptada para explicar el funcionamiento de esta estructura cerebral (Markram, 2008; DeFelipe *et al*, 2012). Numerosos estudios han obtenido gran cantidad de información acerca de los elementos neuronales que conforman la microorganización de la neocorteza y su papel en el funcionamiento de los circuitos corticales (Harris & Shepherd, 2015). Sin embargo, las propiedades de los elementos no neuronales, como los astrocitos, y las posibles implicaciones funcionales de su interacción con las neuronas en el marco de las columnas corticales permanece inexplorada. Por ello, el tercer objetivo planteando sería:

El estudio de la regulación heteroneuronal mediada por astrocitos en la microorganización de la columna cortical.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. DECLARACIÓN ÉTICA.

Todos los procedimientos para el manejo y sacrificio de los animales empleados en este trabajo siguieron las Guías de la Comisión Europea (2010/63/EU) y del Comité de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Minnesota (IACUC). Los protocolos empleados fueron supervisados por el personal veterinario oficial del Instituto Cajal y la Universidad de Minnesota.

2. PREPARACIÓN DE RODAJAS DE CORTEZA SOMATOSENSORIAL DE RATÓN.

Las rodajas de corteza somatosensorial se obtuvieron de ratones C57BL/6 de entre 12 y 21 días de edad. En algunos casos se utilizaron ratones transgénicos *knockout* para los receptores CB1 o IP₃R2 donados generosamente por los Doctores A. Zimmer y J. Chen, respectivamente (Zimmer *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2005). Se emplearon además ratones transgénicos *knockout* para receptores CB1 en astrocitos y ratones infectados con el AAV8-GFAP-hM3D-mCherry, empleándose en ambos casos individuos adultos (> 30 días de edad; ver más adelante). Los animales fueron decapitados y el cerebro fue expuesto por craneotomía. El cerebro se extrajo rápidamente y se colocó en una cámara de corte con líquido cefalorraquídeo artificial (LCA) previamente enfriado en hielo y burbujeado con carbógeno (95% O₂/5% CO₂) para mantener el pH (pH = 7.3). En algunos casos el pH se ajustó añadiendo NaCl (1M) tras su preparación. El LCA contenía (en mM): NaCl 124, KH₂PO 1.25, MgSO₄ 2, NaHCO₃ 26, CaCl₂ 2 y glucosa 10. Se realizaron cortes coronales para obtener rodajas de 250-400 μm de grosor con la ayuda de un vibrátomo Leica VT1200S (Leica, Alemania) y se incubaron en LCA a temperatura ambiente (20°C-25°C) burbujeando permanentemente con carbógeno durante al menos 30 minutos antes de ser utilizadas. A continuación, las rodajas se transfirieron a una cámara de registro de inmersión con un

volumen de 1.5 – 2 ml donde eran profundidas a una velocidad de 2 ml/min con LCA burbujeado con carbógeno. Las células se visualizaron con un microscopio de epifluorescencia Olympus BX50WI (Olympus Optical, Japón) equipado con contraste de interferencia diferencial (DIC), objetivos de 4, 10 y 40x de inmersión en agua y una cámara Hamamatsu ORCA-R2 (Hamamatsu photonics, Japón) sensible a la luz infraroja.

Para investigar la depresión heteroneuronal mediada por astrocitos se añadió al LCA Picrotoxina (50 μ M), un bloqueante del canal asociado a los receptores GABA_A (receptor ionotrópico involucrado en la transmisión sináptica inhibitoria), y CGP55845 (5 μ M), antagonista de los receptores GABA_B (receptor involucrado en la transmisión inhibitoria por segundos mensajeros). De esta manera se aislaron y registraron las corrientes postsinápticas excitatorias (EPSC, del inglés *Excitatory Postsynaptic Currents*).

3. IDENTIFICACIÓN DE LAS LÁMINAS Y COLUMNAS CORTICALES.

El estudio de la depresión heteroneuronal mediada por astrocitos en la organización horizontal y vertical de la corteza se realizó en la región de los barriles perteneciente a la corteza somatosensorial. La región de los barriles fue identificada empleando un microscopio de epifluorescencia equipado con contraste de interferencia diferencial (DIC) y objetivos de 4 o 10x de inmersión en agua. Mediante ajustes de contraste se localizaron las manchas localizadas en capa 4 y denominadas barriles que caracterizan esta región. A partir de la identificación de los barriles se localizaron las capas 5 (situada inmediatamente debajo del barril) y 2/3 (situada inmediatamente encima del barril). Igualmente, se definieron las columnas a partir de los límites de cada, trazando una línea vertical desde ellos y hasta los límites superior e inferior de la corteza. Una vez definidos estos límites se procedía a la aproximación de las pipetas de estimulación

y registro a las capas y/o columnas escogidas mediante los objetivos de 4 o 10x, realizándose la aproximación final con un objetivo de 40x. Las células seleccionadas para los experimentos tuvieron una distancia entre sus somas de al menos 70 μm .

4. IDENTIFICACIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LOS TIPOS NEURONALES.

El análisis del patrón laminar de la depresión heteroneuronal mediada por astrocitos se llevo a cabo empleando neuronas pertenecientes a las capas 2/3, 4 y 5 de corteza somatosensorial primaria. Para la identificación de los somas de estas células se empleó un objetivo de 40x acoplado a un microcopio de epifluorescencia equipado con contraste de interferencia diferencial (DIC). La clasificación celular se llevó a cabo combinando criterios morfológicos y electrofisiológicos.

En concreto, en las capas 2/3 y 5 la identificación de las neuronas piramidales se realizó en primer lugar observando la preparación mediante el objetivo de 40x. En estas condiciones se seleccionaron neuronas cuyo soma presentaba una forma claramente piramidal o de lágrima (ver figura 3b). Tras la selección de una neurona mediante este criterio se aplicaron pulsos de corriente despolarizantes con el fin de caracterizar su patrón de respuesta. Siguiendo una exhaustiva clasificación recientemente publicada se identificaron como neuronas piramidales aquellas que presentaban un perfil electrofisiológico determinado (ver figura 3b y Markram et al., 2015). Las células que cumplieron tanto el criterio morfológico como el electrofisiológico fueron incluidas en el estudio y clasificadas como *neuronas piramidales*. Además, en algunos se casos se empleó biocitina para llenar y posteriormente visualizar las células. Utilizando esta técnica, el total de células identificadas como neuronas piramidales (al presentar un soma claramente piramidal y una larga dendrita apical) habían sido previamente clasificadas como tal siguiendo el criterio descrito anteriormente.

En el caso de las células pertenecientes a la capa 4 de corteza somatosensorial primaria los criterios de selección de las células piramidales fueron los mismos, es decir, soma claramente piramidal bajo el objetivo de 40x y patrón de disparo correspondiente. No obstante, debido a las particularidades de esta lámina cortical la clasificación utilizada siguió una nomenclatura diferente. En concreto, la capa 4 de la corteza somatosensorial primaria alberga una subpoblación de interneuronas excitatorias que difiere morfológicamente de las neuronas piramidales pero que, sin embargo, presenta un perfil electrofisiológico indistinguible del de éstas (Schubert, et al., 2003; Staiger, et al., 2004; Markram et al., 2015). Esta particularidad de la capa 4 impide cumplir el criterio morfológico y electrofisiológico utilizado para clasificar las neuronas piramidales de las láminas 2/3 y 5, por lo que en el caso concreto de las células de capa 4 empleadas para este trabajo se utilizó el término *neuronas excitatorias*. Además, en algunos casos se utilizaron células cuyo perfil electrofisiológico difería del de las neuronas excitatorias (Markram et al., 2015) y que se caracterizaban por presentar un soma claramente no piramidal al observarlas bajo el objetivo de 40x. Estas neuronas fueron englobadas bajo la denominación común de *neuronas no excitatorias*.

5. REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS.

Se realizaron registros electrofisiológicos de neuronas de capas 2/3, 4 y 5 de corteza somatosensorial usando la técnica de *patch-clamp* en la configuración de *whole-cell* y en la modalidad de fijación de voltaje. Las pipetas de registro se fabricaron a partir de capilares de borosilicato con filamento interno (OD-ID: 1.5-o.86nm; Sutter Instruments Co., EE.UU.). Los capilares de registro tenían una resistencia de 3 – 10 M Ω y se llenaron con una solución intracelular que contenía (en mM): KGluconato 135, KCl 10, HEPES-K 10, MgCl 1, ATP-Na₂ 2 (el pH fue ajustado a 7.3 – 7.4 añadiendo KOH; la osmolaridad fue de 280 – 290 mOsm/l). En los experimentos que

incluían el buffer d calcio postsináptico la solución interna contenía (en mM) CsMeSO₃, 40; CsCl, 20; Cs-BAPTA, 40; CaCl₂, 4; HEPES, 10; MgCl₂, 1; Mg-ATP, 2; y Na-GTP, 0.3

Los registros de membrana se obtuvieron con amplificadores PC-ONE (Dagan Instruments, EE.UU.). El potencial de membrana de las células se mantuvo a -70mV. Las resistencias en serie y de acceso fueron monitorizadas a lo largo de los experimentos aplicando un pulso de voltaje de -5mV durante 5ms cada 3s. Los experimentos se consideraron estables cuando las resistencias en serie y de acceso, el potencial de membrana en reposo y el artefacto de estimulación no cambiaban más de un 20% a lo largo del registro. Las células que no cumplían estos criterios fueron descartadas. Las señales fueron filtradas a 1 KHz y transferidas con una frecuencia de muestreo de 10KHz a un ordenador con procesador Pentium IV a través de una tarjeta de conversión analógico-digital DigiData 1440 (Axon Instruments, EE.UU.). Las señales obtenidas fueron filtradas con un HumBug (Quest Scientific Instruments Inc., Canadá) para eliminar eléctrico proveniente de la corriente alterna (50 – 60 Hz)- Para la generación de estímulos, adquisición y almacenamiento de datos se empleó el programa pCLAMP 10.2 (Axon Instruments, EE.UU.).

Los experimentos fueron realizados a 30 – 35 °C haciendo pasar el LCA por un calentador (Warner Instruments Co., EE.UU.) colocado antes de la cámara de registro.

6. ESTIMULACIÓN SINÁPTICA.

La estimulación de las terminales glutamatérgicas se realizó mediante una pipeta bipolar utilizando dos electrodos de plata (Ag/AgCl) incluidos de manera independiente en un capilar septado (TST 150-6, World Precision Instruments Inc., EE.UU.) con un diámetro en la punta del electrodo de aproximadamente 5µm. Los capilares se llenaron con

solución extracelular y se conectaron a un estimulador (S-900, DAGAN Corporation, EE.UU.). La pipeta bipolar se situó en la capa 2/3, 4 o 5 dependiendo del experimento (la localización específica se indica en cada caso). La intensidad del estímulo (0.1 – 10 mA) se ajustó para conseguir las condiciones en las que se obtenía un EPSC tras cada pulso. Los experimentos que no mostraban estabilidad en las corrientes registradas en condiciones basales fueron descartados.

Se aplicaron pares de pulsos de 2 ms de duración separados por un intervalo de 50 ms, estos pares de pulsos se aplicaron continuamente a lo largo de cada experimento a una frecuencia de 0.33 Hz.

Se analizaron la amplitud de los EPSCs y el Ratio de Pares de Pulsos (PPR = 2º EPSC/1º EPSC). La amplitud del EPSC fue determinada como el máximo valor de la corriente (entre 2 – 10 ms después del estímulo) menos el promedio de la corriente basal (20 – 30 ms antes del estímulo).

7. ESTIMULACIÓN NEURONAL.

La estimulación consistió en la despolarización a 0 mV durante 5 segundos de una neurona cortical para inducir la liberación de endocannabinoides (Kreitzer & Regehr, 2001; Wilson & Nicoll, 2001; Ohno-Shosaku *et al.*, 2002; Chevaleyre & Castillo, 2004; Navarrete & Araque, 2008; 2010). Se empleó un segundo paradigma de estimulación neuronal en la configuración de fijación de corriente, consistente en la aplicación de pulsos despolarizantes de entre 20 – 1500 ms con el objetivo de generar diferente número de potenciales de acción en la neurona. Este segundo paradigma de estimulación inducía la liberación de endocannabinoides desde la neurona postsináptica (Navarrete & Araque, 2010).

Tras la estimulación neuronal los cambios sinápticos se determinaron comparando las corrientes sinápticas registradas 45 segundos antes de aplicar el estímulo con las corrientes obtenidas durante los 45 segundos posteriores.

8. MONITORIZACIÓN DE LOS NIVELES DE CALCIO EN LOS ASTROCITOS.

Los niveles de calcio en los astrocitos localizados en la corteza somatosensorial se monitorizaron utilizando microcopia de epifluorescencia para visualizar el indicador de calcio Fluo4 (Molecular Probes, EE.UU.). Esta molécula es excitable a longitudes de onda dentro del espectro visible, presentando un máximo de excitación a λ_{exc} 494 nm y un máximo de emisión a λ_{em} 506 nm. El fluoróforo Fluo4 resulta una herramienta adecuada para detectar cambios en la concentración de calcio intracelular debido a que a bajas concentraciones de calcio la sonda Fluo4 apenas emite fluorescencia, sin embargo su señal de fluorescencia puede aumentar > 100 veces en presencia de altas concentraciones de calcio.

Las rodajas se incubaron con Fluo4-AM durante 45 – 60 minutos a temperatura ambiente (2 μ l de Fluo4-AM se aplicaron sobre las rodajas de corteza somatosensorial en LCA, alcanzando una concentración final de 7.6 μ M y 0.066% de ácido plurónico). En estas condiciones la mayoría de las células que se cargaron con el fluoróforo fueron astrocitos (Kang *et al.*, 1998; Parri *et al.*, 2001; Araque *et al.*, 2002; Nett *et al.*, 2002; Perea & Araque, 2005), como quedó confirmado en algunos casos por sus propiedades electrofisiológicas, esto es, ausencia de potenciales de acción, relación corriente/voltaje lineal y baja resistencia de acceso (Kang *et al.*, 1998; Serrano *et al.*, 2008).

Los astrocitos se observaron utilizando una cámara ORCA-R2 (Hamamatsu photonics, Japón). Las células fueron iluminadas durante 100 – 500 ms con una lámpara de xenón a 490 nm usando un monocromador Polychrome V (T.I.L.L. Photonics, Alemania) o con un LED a 470 nm (Prior Scientifics, EE.UU.), y las imágenes se obtuvieron cada 1 – 2 segundos. La sincronización del Polychrome V y la cámara ORCA-R2 se realizó mediante el software IPLab (BD Biosciences, EE.UU.); la sincronización de del LED y la cámara ORCA-R2 se realizó mediante el software MetaMorph (Molecular Devices, EE.UU.). Las medidas cuantitativas de epifluorescencia se realizaron con los softwares IPLab o *ImageJ*.

La señal de calcio de los astrocitos en la capa 5 de corteza somatosensorial se monitorizó en las células localizadas en un radio aproximado de 250 μm alrededor de la célula estimulada. Además, en algunos casos se monitorizó la señal de calcio en astrocitos localizados en las capas 2/3, 4 y 5, atendiendo además a su disposición dentro y fuera de la columna cortical. En estos casos la monitorización de la señal de fluorescencia se realizó después de determinar la localización de las células empleando el sistema de contraste de interferencia diferencial (DIC). Las variaciones de calcio, denominadas *espigas de calcio*, se registraron en el soma de las células y se estimaron como el cambio de fluorescencia sobre la señal de fluorescencia basal usando la siguiente relación: $F-F_0*100/F_0$, donde F es la fluorescencia obtenida en cada secuencia y F_0 es el promedio de fluorescencia basal obtenido en 5 – 10 secuencias antes del estímulo. A los valores de fluorescencia se les restó la señal de fondo.

La señal de calcio en los astrocitos fue cuantificada como la probabilidad de ocurrencia de una espiga de calcio, lo cual fue calculado como el número de elevaciones de calcio (espigas de calcio) agrupadas en conjuntos de 5 segundos y registradas en 5 – 60 presentes en el campo de visión. El tiempo de cada elevación se consideró en el comienzo de dicha espiga de calcio cuando la $F-F_0*100/F_0$ fue mayor de 3 veces las

desviación estándar de la fluorescencia basal durante los 15 segundos siguientes al estímulo.

9. INYECCIÓN DEL VECTOR VIRAL AAV8/GFAP-hM3D-mcherry.

Se emplearon inyecciones bilaterales en animales C57BL/6 adultos (de más de 1 mes de edad). En cada hemisferio se introdujo un volumen de entre 100 nl a 500 nl min^{-1} de AAV8-GFAP-hM3D-mCherry (Adenovirus serotipo 8, 2×10^{12} moléculas virales por ml, Gene Therapy Vector Core de la Universidad de North Carolina). El lugar de inyección fue determinado por las coordenadas anterior-posterior: +1.4 mm; medial-lateral, ± 0.1 mm; dorsal-ventral, -4.8 mm, desde Bregma; correspondientes a la localización de la corteza somatosensorial primaria (Paxinos & Franklin, 2012). Para la adecuada expresión viral tras la inyección se esperaron de 3 a 6 semanas antes de utilizar los animales.

10. INMUNOHISTOQUÍMICA

Los animales transfectados con AAV8-GFAP-hM3D- mCherry fueron anestesiados y perfundidos transcranealmente con paraformaldeído al 4% en tampón fosfato (PB) a 0.1 M. Los cerebros fueron extraídos y postfijados en paraformaldeído al 4% en PB al 0.1 M durante al menos 3 horas. Se realizaron cortes coronales de 150 μm de grosor empleando un vibrátomo que fueron preincubadas en 0.25% Triton X-100 con suero normal de cabra al 10% en PB 0.1M durante 1 hora a temperatura ambiente.

Posteriormente, se transfirieron a una nueva solución que contenía el anticuerpo anti-conejo específico para GFAP (1:1000, Sigma, G9269) y el anticuerpo anti-ratón específico para NeuN (1:500, Millipore,

MAB377) durante 24 horas (4 C). Este tratamiento fue seguido de una incubación durante 3 horas en Alexa Fluor 488 anti-conejo (1:250, Invitrogen, A11034) y Alexa Fluor 405 anti-ratón (1:250, Invitrogen, A31553) antes de ser montadas en cristal empleando el medio de montaje Vectashield Hardset (Vector Labs). Las rodajas fueron examinadas empleando un microscopio multifotón Leica SP5.

11. LLENADO DE LAS NEURONAS CON BIOCITINA

En algunos casos se realizaron llenados de neuronas empleando biocitina. La biocitina se añadió a la solución intracelular y fue introducida al espacio intracelular empleando pipetas de registro. Una vez llenas las neuronas se transfirió la rodaja que las contenía a una solución de paraformaldehído al 4% y posteriormente fueron lavadas con PBS (fosfato sódico 100 mM, pH 7.2). La peroxidasa endógena fue inactivada mediante la incubación en H₂O₂ al 1%. Las rodajas se transfirieron después a PBS e incubadas empleando el sistema ABC-Elite (Vector stains). Finalmente las rodajas fueron lavadas utilizando PBS y visualizadas utilizando una reacción con 0.5 mg/ml DAB y 0.01% H₂O₂. Cuando los procesos celulares eran claramente visibles la reacción se paraba lavando las rodajas con PBS. Las neuronas fueron visualizadas empleando un microscopio de epifluorescencia Olympus BX50WI (Olympus Optical, Japón) equipado con contraste de interferencia diferencial (DIC) y una cámara Hamamatsu ORCA-R2 (Hamamatsu photonics, Japón).

12. UTILIZACIÓN DE RATONES GFAP-CB1R-KO

En algunos casos se emplearon animales deficientes para el receptor CB1 específico de astrocitos. Para la generación de estos animales se cruzaron ratones portadores del gen CB1R floxeado (CB1 f/f) (Marsicano *et al.*, 2003) con ratones GFAP-CreERT2 (Hirrlinger *et al.*, 2006), empleando el sistema de retrocruzamiento en tres pasos para obtener camadas CB1Rf/f;GFAP-CreERT2 y CB1Rf/f, llamadas GFAP-CB1R-KO y GFAP-CB1R-Wt, respectivamente. Puesto que la proteína CreERT2 se encontraba inactiva en ausencia de tratamiento con tamoxifeno, la delección del gen CB1R se obtenía mediante una inyección intraperitoneal diaria de tamoxifeno durante 8 días en animales de al menos 8 semanas de edad. La inyección contenía para cada animal 1 mg de tamoxifeno disuelto en aceite de oliva al 90% y etanol al 10% para una concentración final de 10 mg/ml. Los animales no fueron utilizados hasta al menos 4 semanas después de finalizar el tratamiento con tamoxifeno.

13. AGENTES FARMACOLÓGICOS

N-(Piperidin-1-yl)-5-(4-iodophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1H-pyrazole-3-carboxamide (AM251), (S)-(+)- α -Amino-4-carboxy-2-methylbenzeneacetic acid (LY-367385), 2-Methyl-6-(phenylethynyl)pyridine hydrochloride (MPEP), ácido (2S)-3-[[[(1S)-1-(3,4-Dichlorophenyl)ethyl]amino-2-hydroxypropyl](phenylmethyl) fosfónico (CGP-55845), Suramina y N⁶-cyclopentyladenoside (CPA) fueron adquiridos a Tocris (Bristol, UK). El indicador de calcio Fluo4-AM y el marcador fluorescente Alexa Fluor 488 sodium hydrazide fueron adquiridos a Life Technologies Ltd (Paisley, UK). H-Thr-Phe-Leu-Leu-Arg-NH₂ (TFLLR-NH₂) fue adquirido a Ascent. El resto de agentes farmacológicos fueron suministrados por Sigma (St. Louis, MO, USA). Tanto WIN (100 μ M) como TFLLR (10 μ M) fueron liberados al medio extracelular mediante pulsos de presión de 1 bar durante 5 segundos

(PMI-100 DAGAN, Minneapolis, MN) empleando un capilar de borosilicato estirado.

14. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

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 y 12.5. la medida de fluorescencia en los astrocitos y el tratamiento de las imágenes de calcio se realizaron con los programas ImageJ y Photoshop 7.0.

Los datos se expresan como el promedio \pm el error estándar de la media (SEM) indicándose en cada caso el número de datos (n). Los datos se analizaron utilizando el test paramétrico *t de Student*. Las diferencias significativas se representaron de la siguiente manera: P < 0.05 (*), P < 0.01 (**), and P < 0.001 (***)).

IV. RESULTADOS

1. EFECTO DE LA ACTIVACIÓN ENDÓGENA DE LOS ASTROCITOS CORTICALES SOBRE LA TRANSMISIÓN SINÁPTICA HETERONEURONAL.

Los astrocitos participan en fenómenos de modulación de la transmisión sináptica a larga distancia actuando sobre sinapsis relativamente alejadas de la sinapsis activa (Navarrete & Araque, 2010; Zhang, *et al.*, 2003; Pascual, *et al.*, 2005; Serrano, *et al.*, 2006). Este fenómeno de modulación de la transmisión sináptica mediado por astrocitos ha sido denominado regulación lateral (Covelo & Araque, 2015). Estudios recientes han mostrado que la señalización por endocannabinoides es uno de los múltiples mecanismos de comunicación entre astrocitos y neuronas. Esta forma de comunicación aparece en diferentes regiones cerebrales, incluyendo el neocortex. La activación endógena de receptores de tipo 1 para endocannabinoides (CB1Rs) en astrocitos regula la transmisión sináptica, en concreto modula la plasticidad en corteza somatosensorial y genera fenómenos de regulación lateral en el hipocampo (Min & Nevian, 2012; Navarrete & Araque, 2010). Partiendo de estos resultados y empleando el sistema de señalización por endocannabinoides como herramienta para activar fisiológicamente los astrocitos corticales nos planteamos estudiar si la activación endógena de estas células produciría una regulación lateral de la transmisión sináptica excitatoria en neuronas piramidales de capa 5.

LA SEÑALIZACIÓN MEDIADA POR ENDOCANNABINOIDES INDUCE DEPRESIÓN SINÁPTICA HETERONEURONAL EN NEURONAS PIRAMIDALES DE CAPA 5:

Con el objetivo de investigar la regulación espacial de la transmisión sináptica en la corteza somatosensorial primaria, realizamos registros simultáneos en la modalidad de whole-cell entre neuronas piramidales de capa 5 mientras monitorizábamos las corrientes postsinápticas excitatorias (EPSCs) inducidas mediante la estimulación eléctrica de la capa 2/3. En estas condiciones se estimuló una de las

neuronas mediante pulsos despolarizantes para generar la liberación de eCBs mientras se registraban las corrientes sinápticas en esa célula (homoneuronal) y en la adyacente (heteroneuronal) (Figura 1a,b). La estimulación de una única neurona piramidal de capa 5 indujo una depresión sináptica transitoria sobre las sinapsis homoneuronales en 21 de los 48 casos (43.7%). Además, en las sinapsis heteroneuronales registradas simultáneamente en neuronas separadas 70-270 μm del soma homoneuronal, este estímulo provocó también una depresión transitoria de la transmisión sináptica en 15 de 48 casos (31.2%) (Figura 1c).

Numerosos estudios han mostrado que la despolarización neuronal induce la liberación de endocannabinoides desde el soma y las dendritas (Ohno-Shosaku *et al.*, 2001; Willson & Nicoll, 2001) que pueden modular directamente sinapsis cercanas ($\sim 20 \mu\text{m}$) (Willson & Nicoll, 2001; Chevaleyre & Castillo, 2003; Chevaleyre & Castillo, 2004; Piomelli, 2003) e indirectamente sinapsis lejanas a través de la estimulación de los astrocitos (Navarrete & Araque, 2010; Gómez-Gonzalo *et al.*, 2014). De forma consistente con la regulación de la transmisión sináptica mediada por endocannabinoides, ambos fenómenos de depresión observados en situación control no pudieron volver a ser inducidos tras perfundir en el medio extracelular el antagonista de los receptores CB1 (AM251, $2 \mu\text{M}$; $n = 11$). De igual modo, ninguno de los dos fenómenos pudo ser inducido en rodajas corticales extraídas del ratón deficiente para el receptor CB1 (CB1R^{-/-}; $n = 11$). Estos resultados indican que tanto la depresión sináptica homoneuronal como la heteroneuronal dependen de receptores CB1 (Figura 1d,e).

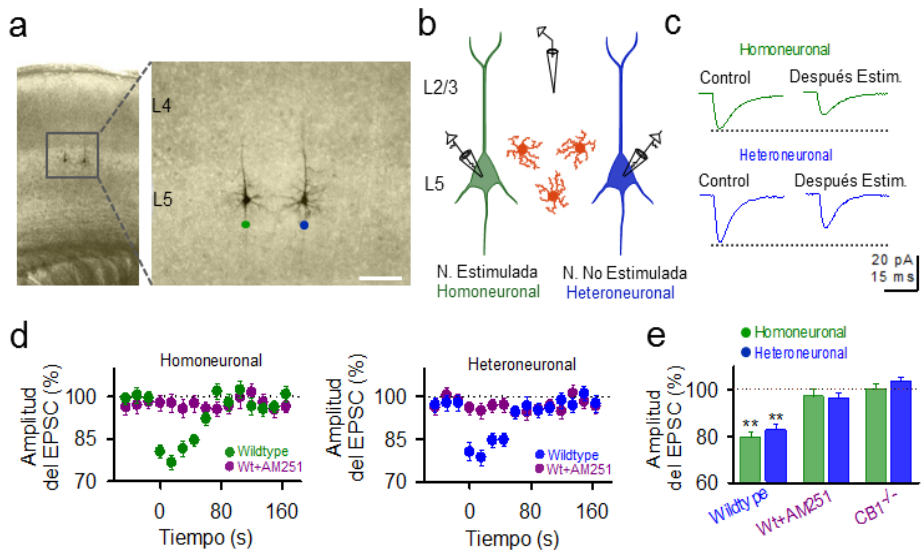


Figura 1. La señalización mediada por endocannabinoides induce depresión sináptica heteroneuronal en neuronas piramidales de capa 5. (a) Imagen donde se muestran dos neuronas piramidales de capa 5 llenadas con biocitina. Barra de escala 100 μ m. **(b)** Dibujo esquemático del modelo experimental mostrando los registros dobles de neuronas piramidales de capa 5 y el electrodo de estimulación situado en capa 2/3. **(c)** Trazos promedio (20 EPSCs) antes (basal) y después de la estimulación por despolarización. **(d)** Amplitud de los EPSCs a lo largo del tiempo en control y en presencia de AM251 (estimulación homoneuronal en tiempo 0). **(e)** Cambios relativos en la amplitud de los EPSCs tras la estimulación homoneuronal en el animal silvestre (Wt.) en situación control, en presencia de AM251 y en el animal CB1R^{-/-}.

Estos resultados indican que, además de la modulación directa de la transmisión sináptica homoneuronal, el sistema de señalización por endocannabinoides puede inducir una depresión de la transmisión sináptica heteroneuronal en neuronas piramidales de capa 5. Puesto que la depresión sináptica homoneuronal es un fenómeno que ha sido ampliamente descrito en diferentes áreas del sistema nervioso, incluyendo la neocorteza (Alger, 2002; Trettel & Levine, 2002; Fortin & Levin, 2007), y dado que el interés de nuestro estudio era el análisis de las propiedades espaciales de la señalización en corteza el presente trabajo se centra en la regulación de la transmisión sináptica heteroneuronal.

Estudio de las características del estímulo necesarias para inducir la depresión heteroneuronal.

Tras haber identificado el fenómeno de regulación lateral dependiente de eCBs entre neuronas piramidales de capa 5, y con el fin de mejorar el abordaje posterior del estudio de la depresión heteroneuronal, quisimos profundizar en las características del estímulo necesarias para generar los mecanismos de modulación. Para ello realizamos los siguientes experimentos adicionales:

En primer lugar, un segundo análisis de los experimentos mostró que la depresión heteroneuronal aparecía independientemente de la depresión homoneuronal en 2 de los 15 casos en los que fue observada (13.3 %), mientras que el efecto homoneuronal de presencia independiente de la depresión heteroneuronal lo hacía en 8 de los 21 casos en los que se registró (38.1 %). Estos datos indican que la aparición de la modulación heteroneuronal se da preferentemente en presencia del fenómeno homoneuronal, así como que en la mayoría de los casos ambos mecanismos ocurren simultáneamente. Una vez conocida la relación entre los dos efectos, nos interesaba comprobar si tras la inducción de uno de ellos el otro quedaba bloqueado en esa misma neurona. Para ello

realizamos registros simultáneos estimulando alternativamente dos neuronas piramidales mientras registrábamos corrientes postsinápticas excitatorias en ambas. En estas condiciones la depresión homoneuronal apareció en 6 de 13 experimentos (46.1%) de los cuales tanto la depresión homoneuronal como la heteroneuronal pudieron ser inducidas recíprocamente en 4 casos (66.6%). Estos datos sugieren que ambos fenómenos pueden ser inducidos recíprocamente. Para analizar la posibilidad de inducir el efecto repetidas veces a lo largo del tiempo realizamos experimentos con 4 despolarizaciones durante un periodo de 40 minutos (1 estímulo cada 10 minutos). En estas condiciones los dos fenómenos pudieron inducirse tras cada estímulo, lo que indica que ambos mecanismos de modulación pueden aparecer en diferentes ocasiones a lo largo del tiempo. (Figura 2a,b).

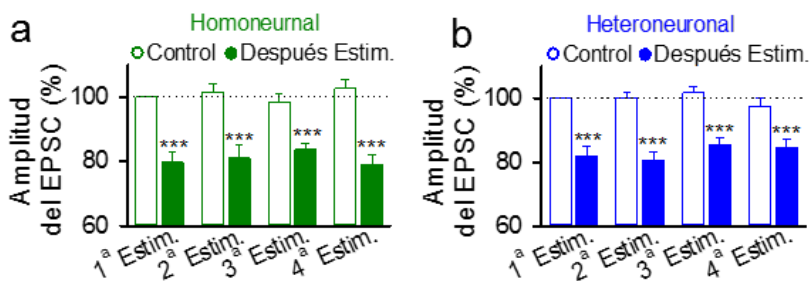


Figura 2. Los fenómenos de modulación sináptica pueden ser inducidos en diferentes ocasiones a lo largo del tiempo. (a) Cambios relativos en la amplitud del EPSC en la célula homoneuronal tras diferentes estimulaciones homoneuronales en el animal Wt. **(b)** Cambios relativos en la amplitud de los EPSCs en la célula heteroneuronal tras diferentes estimulaciones homoneuronales en el animal Wt.

Todos estos resultados muestran la complejidad de la relación entre los mecanismos de modulación objeto de nuestro estudio y aportan información que mejora su abordaje experimental. No obstante, quisimos continuar el análisis en condiciones más próximas a las fisiológicas. Para ello, en algunos experimentos empleamos un buffer de calcio añadido a la pipeta de registro (ver materiales y métodos). En esta situación tanto la depresión sináptica homoneuronal como la heteroneuronal aparecieron en 3 de 7 experimentos (42.8%; Figura 4a), lo que indicaba que en estas condiciones ambos mecanismos podían ser igualmente inducidos. Además, nos interesaba analizar la posibilidad de desencadenar la modulación mediante potenciales de acción generados en la célula homoneuronal. Para ello aplicamos pulsos despolarizantes de diferente duración a través de la pipeta de registro con la intención de inducir distinto número de potenciales de acción. La figura 3c muestra cómo la depresión sináptica, tanto homoneuronal como heteroneuronal, están presentes y aumentan a medida que lo hace el número de potenciales de acción. Estos resultados indican que ambos fenómenos pueden ser generados por estímulos fisiológicos y que los dos dependen del nivel de actividad neuronal. Un análisis posterior de los patrones de disparo de potenciales de acción de las neuronas registradas mostró que la aparición del fenómeno no depende de las propiedades de adaptación de las neuronas estimuladas (Figura 3d,e).

Estos experimentos desvelaban las características del estímulo neuronal necesarias para desencadenar la depresión heteroneuronal. Además, junto a la información obtenida en los experimentos realizados empleando el antagonista AM251 y los animales CB1R^{-/-} estos datos sugerían que la estimulación de un única neurona piramidal de capa 5 liberaba eCBs que producían el fenómeno de modulación lateral. No obstante, no podíamos descartar la posibilidad de que la liberación de glutamato tras la estimulación de una neurona piramidal activase interneuronas induciendo la liberación de eCBs desde estas células. Este mecanismo explicaría la ausencia de depresión heteroneuronal en presencia de AM251 o en el animal CB1R^{-/-}. Para excluir esta posibilidad

realizamos experimentos añadiendo a la solución intracelular un bloqueante de los canales de sodio dependientes de voltaje (QX-314; 5 mM), lo que prevenía la generación de potenciales de acción en la neurona estimulada. En estas condiciones, tanto la depresión sináptica homoneuronal como la heteroneuronal, pudieron ser inducidas (Figura 4b), lo que sugiere que la liberación de eCBs desde la neurona piramidal es la que desencadena el fenómeno de regulación lateral.

Tras confirmar el origen de la señalización por endocannabinoides quisimos desvelar el tipo de eCB implicado en los procesos de modulación que estábamos describiendo. Para ello realizamos experimentos empleando tetrahydrolipstatina (THL; 5 μ M), un inhibidor de la enzima de síntesis de endocannabinoides diacylglycerol lipasa, que es necesaria para la síntesis de 2-arachidonoyl glycerol (2-AG). En los experimentos en los que se añadió THL a la solución intracelular de la neurona piramidal postsináptica ninguno de los dos fenómenos, la depresión homoneuronal o la heteroneuronal, pudo ser inducido. Estos datos muestran que el endocannabinoide 2-AG es el responsable de la generación de ambos efectos (n = 7; Figura 4c).

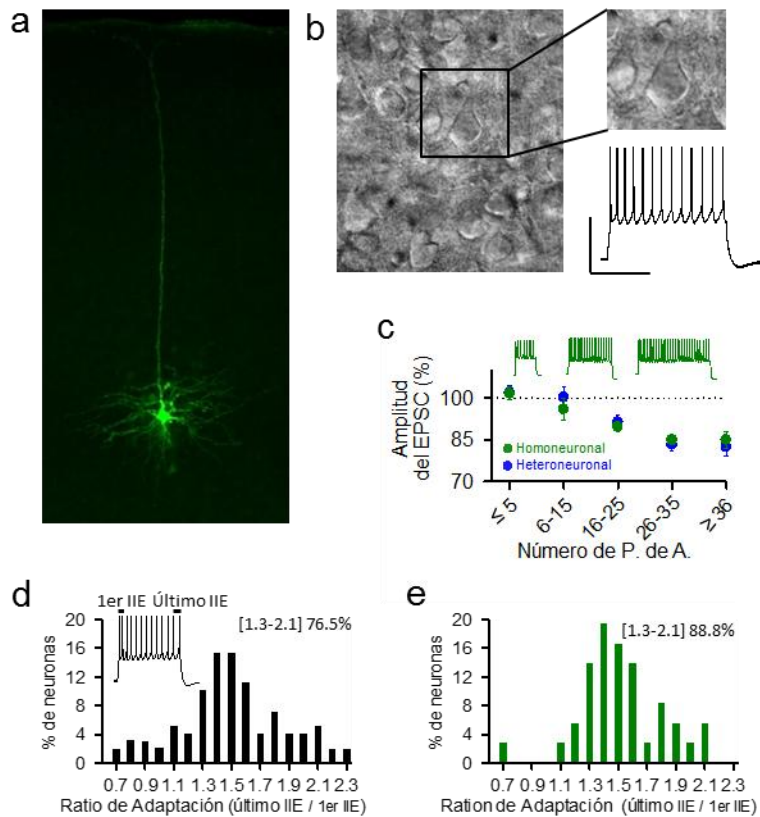


Figura 3. Características de la estimulación necesarias para inducir la depresión heteroneuronal. (a) Imagen de fluorescencia de una neurona piramidal localizada en la capa 5 llenada con Alexa488. (b) Imagen DIC de una neurona piramidal localizada en capa 5 y su patrón de disparo en respuesta a la inyección de corriente en el soma (Barra de escala 50mV, 800ms). (c) Amplitud de los EPSCs en los 15s posteriores a la generación de potenciales de acción en la célula homeoneuronal. (d) Porcentaje de células para cada valor de adaptación, neuronas piramidales de capa 5 que no mostraron depresión homeoneuronal. (e) Porcentaje de células para cada valor de adaptación, neuronas piramidales de capa 5 que depresión homeoneuronal. IIE, intervalo interespiga.

Por último, tras definir las características del estímulo neuronal, estábamos interesados en conocer las propiedades específicas de la estimulación sináptica. Dado que los fenómenos de depresión sináptica observados podían depender del tipo de sinapsis registrada, realizamos experimentos modificando la localización del electrodo de estimulación, situándolo en la capa 5 en lugar de en la capa 2/3. En estas condiciones tanto la depresión homoneuronal como la heteroneuronal pudieron ser inducidas en 4 de 8 (50%) y en 3 de 8 casos (37.5%) respectivamente (Figura 4d), indicando que ambos efectos eran independientes de la posición de la pipeta y por tanto de la estimulación de un tipo de sinapsis concreto. De este modo, los mecanismos que estábamos investigando están relacionados con el tipo de transmisión sináptica implicada, es decir, la transmisión sináptica excitatoria.

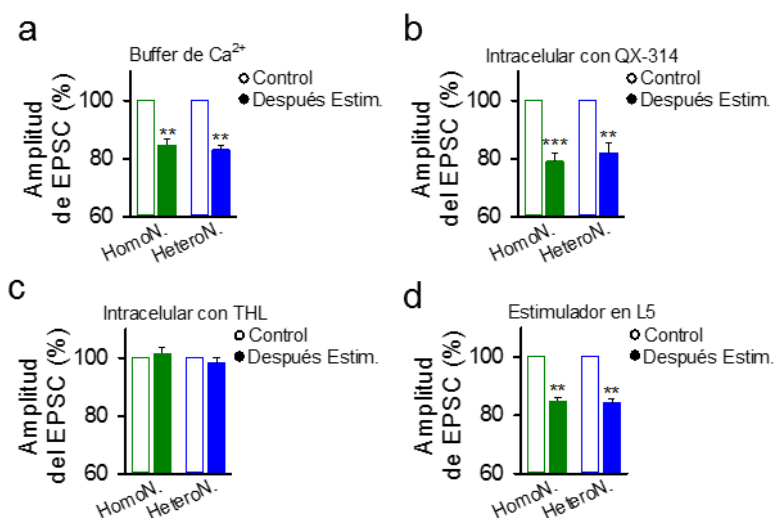


Figura 4. Características de la estimulación necesarias para inducir la depresión heteroneuronal. (a) Cambios relativos en la amplitud de los EPSCs tras la estimulación homoneuronal en el animal Wt. en presencia de buffer de Ca²⁺ en la pipeta de registro. (b) Cambios relativos en la amplitud de los EPSCs tras la estimulación homoneuronal en el animal Wt. en presencia de QX-314 en la pipeta de registro. (c) Cambios relativos en la amplitud de los EPSCs tras la estimulación homoneuronal en el animal Wt. en presencia de THL en la pipeta de registro. (d) Cambios relativos en la amplitud de los EPSCs generado por estimulación eléctrica de la capa 5 tras la estimulación homoneuronal en el animal Wt.

LA DEPRESIÓN SINÁPTICA HETERONEURONAL REQUIERE ELEVACIONES DE CALCIO EN LOS ASTROCITOS.

Los resultados hasta ahora presentados indicaban que la depresión heteroneuronal dependía de receptores CB1 activados por endocannabinoides liberados desde neuronas piramidales de capa 5. Por ello, dado que algunos trabajos recientes habían demostrado la presencia de receptores funcionales de tipo CB1 en astrocitos (Navarrete & Araque, 2008; Navarrete & Araque, 2010), nos preguntamos si la activación de estas células estaría implicada en el efecto de regulación lateral.

En primer lugar, comprobamos si los astrocitos respondían a la liberación de endocannabinoides liberados desde las neuronas piramidales de capa 5. A tal fin se despolarizó una neurona mientras se monitorizaba la señal de calcio en los astrocitos adyacentes. La estimulación neuronal indujo elevaciones de calcio transitorias en los astrocitos, incrementando su probabilidad de espiga de calcio (Figura 5a,b). El aumento en la señal de calcio en los astrocitos no pudo ser inducida en presencia del antagonista AM251 (Fig 5b), lo que indica que el incremento en la señal de calcio en los astrocitos está mediada por la activación de receptores de tipo CB1 en estas células. Estos resultados sugieren que la liberación de endocannabinoides desde neuronas piramidales de capa 5 elevan los niveles de calcio en los astrocitos a través de la activación de receptores de tipo CB1.

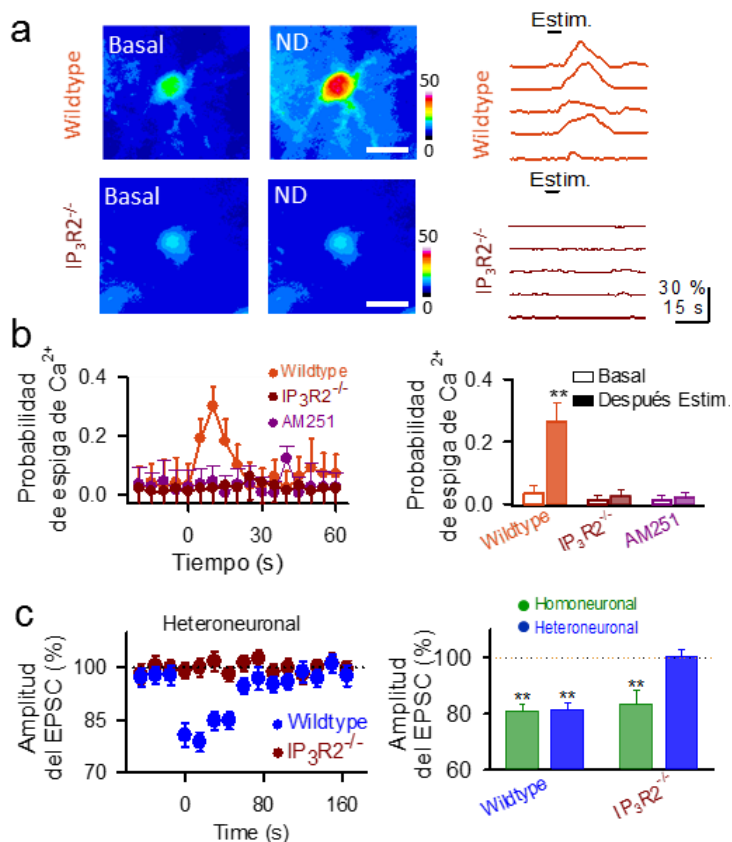


Figura 5. La depresión sináptica heteroneuronal requiere elevaciones de calcio en los astrocitos. (a, izquierda) Imágenes de pseudocolor de los niveles de fluorescencia de la sonda Fluo4 antes (basal) y después de la despolarización neuronal (ND) para liberar endocannabinoides en el animal Wt. y en el animal IP₃R2^{-/-}. Barra de escala 10 μm. **(a, derecha)** Trazos representativos de la señal relativa de calcio obtenidos de astrocitos del animal Wt y el animal IP₃R2^{-/-}. **(b, izquierda)** Probabilidad de que ocurra una espiga de calcio frente al tiempo. **(b, derecha)** Probabilidad de que ocurra una espiga de calcio antes (basal) y después de la despolarización neuronal (Después estim.) en el animal Wt. en control y en presencia de AM251 (45 astrocitos de 7 rodajas en ambos) y en el animal IP₃R2^{-/-} (48 astrocitos de 8 rodajas). **(c, izquierda)** Amplitud de los EPSCs a lo largo del tiempo en el animal Wt. y en el animal IP₃R2^{-/-} (estimulación homoneuronal en tiempo 0). **(c, derecha)** Cambios relativos en la amplitud de los EPSCs tras la estimulación homoneuronal en el animal Wt. y en el animal IP₃R2^{-/-}.

Estudios previos habían mostrado cómo las elevaciones de calcio en los astrocitos producidas por la activación de receptores de tipo CB1 en estas células inducen la liberación de glutamato capaz de generar una modulación lateral de la transmisión sináptica en regiones como el hipocampo (Navarrete & Araque, 2008; Navarrete & Araque 2010) y de controlar la plasticidad sináptica en la neocorteza (Min & Nevian 2012). Basándonos en estos resultados investigamos si la depresión sináptica heteroneuronal requería aumentos de calcio en los astrocitos. Para ello empleamos un animal deficiente para el receptor inositol-1,4,5-trisphosphate (IP3) tipo dos ($IP_3R2^{-/-}$), responsable de las elevaciones de calcio mediadas por la activación de proteínas G selectivamente en astrocitos (Gómez-Gonzalo *et al.*, 2014; Di Castro *et al.*, 2011; Petravicz *et al.*, 2008; Navarrete *et al.*, 2012). En experimentos realizados en rodajas corticales extraídas del animal $IP_3R2^{-/-}$ la modulación heteroneuronal no pudo ser inducida (n = 12), por el contrario, la depresión sináptica homoneuronal permaneció presente al igual que en los animales control (5 de 12 casos; 41.6%) (Fig 5c). Además, la estimulación neuronal no produjo incrementos de calcio en los astrocitos (Fig 5a,b). Estos resultados indican que la señalización por endocannabinoides no se encuentra afectada en el animal $IP_3R2^{-/-}$ y que la señal de calcio en los astrocitos es necesaria para la inducción del fenómeno heteroneuronal, al contrario que para el homoneuronal, sugiriendo que la depresión sináptica heteroneuronal está mediada por un mecanismo de señalización astrocito-neurona adicional.

Los resultados mostraban que la elevación de los niveles de calcio en los astrocitos era necesaria para inducir la regulación lateral. Por tanto, para continuar estudiando la implicación de la señal de calcio y su implicación en la inducción del fenómeno nos propusimos comprobar si ésta sería además suficiente para generar la depresión heteroneuronal. Para ello comenzamos utilizando un abordaje experimental químico-genético. Este tipo de herramientas, denominadas DREADDs (del inglés *Designer Receptor Exclusively Activated by Designer Drugs*), se basaba en la manipulación selectiva de receptores asociados a proteínas G que

únicamente pueden ser activados mediante un ligando exógeno. En nuestro caso, la expresión de Gq-DREADD hM3D específicamente en los astrocitos de la corteza somatosensorial primaria por medio del vector viral AAV8/GFAP-hM3D-mcherry nos permitía activar estas células por medio del agonista sintético clozapina N-oxide (CNO) aplicado en un momento concreto del experimento.

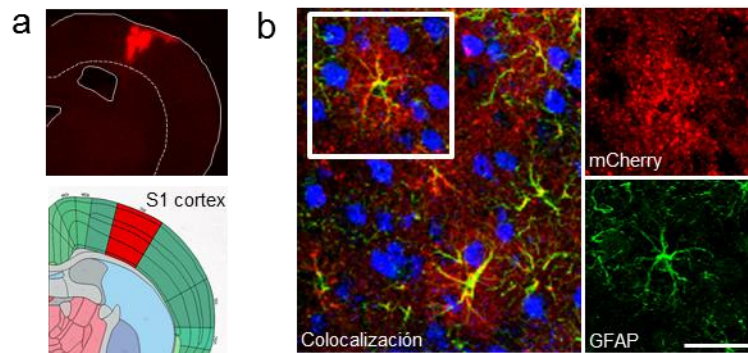


Figura 6. Expresión del vector viral AAV8/GFAP-hM3D-mcherry en la corteza somatosensorial. (a) Imagen inmunohistoquímica que muestra la localización del área de expresión del vector viral AAV8/GFAP-hM3D-mcherry. **(b)** Imagen inmunohistoquímica que muestra hM3D-mCherry (rojo), el marcador de neuronas NeuN (azul) y el marcador de astrocitos GFAP (verde) en la corteza somatosensorial. Se aprecia la localización específica de hM3D-mCherry en astrocitos (amarillo).

En rodajas de corteza somatosensorial extraídas de ratones adultos infectados con el virus (Figura 6a,b) la aplicación en el baño de CNO (10 μ M) indujo elevaciones de calcio en los astrocitos (n = 93 astrocitos de 10 rodajas; Figura 7a,b). Además, la aplicación de CNO en el baño produjo una depresión sináptica en neuronas piramidales de capa 5 (n = 8; Figura 6d). Por el contrario, en rodajas de corteza somatosensorial extraídas de animales no inyectados con el virus la aplicación de CNO en el baño no produjo aumentos de calcio en los astrocitos (n = 64 astrocitos de 7 rodajas; Figura 7b) ni cambios en la transmisión sináptica (n = 4; Fig 7c). Estos resultados sugieren que la elevación de calcio en los astrocitos es suficiente para regular la transmisión sináptica en la corteza.

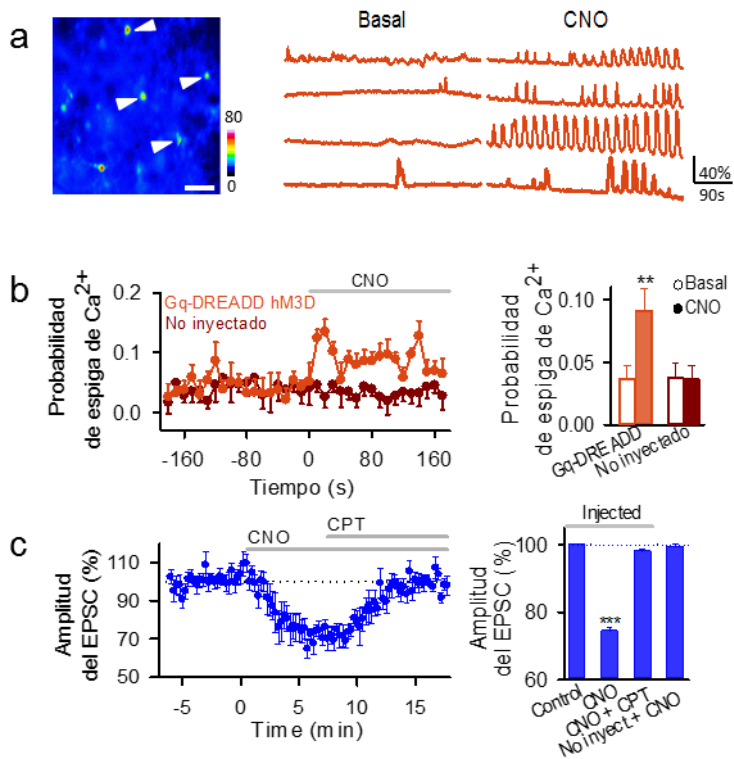
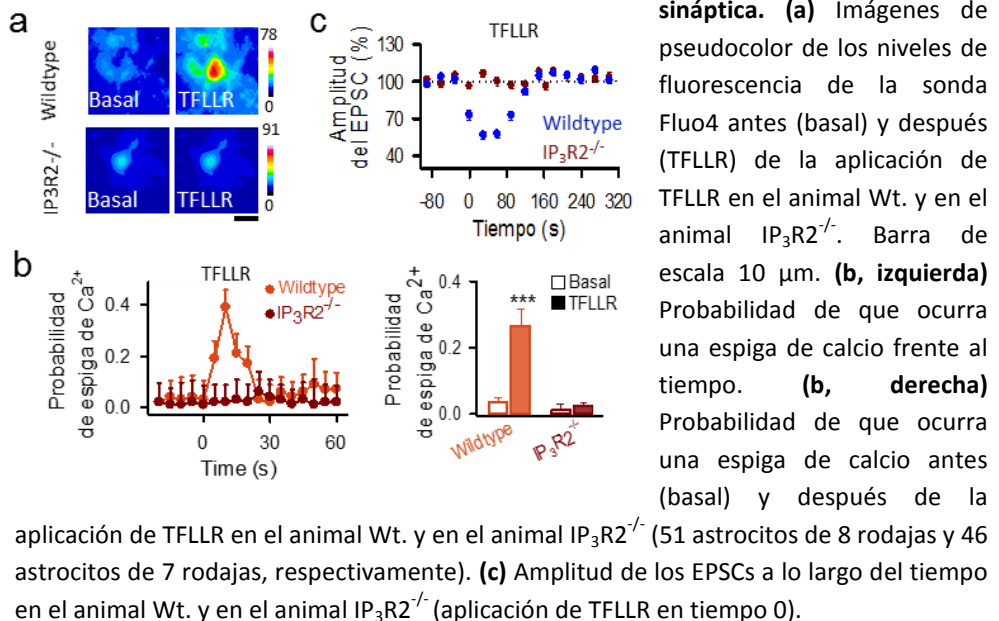


Figura 7. La estimulación selectiva de los astrocitos genera depresión de la transmisión sináptica. (a, izquierda) Imagen de pseudocolor de los niveles de fluorescencia de la sonda Fluor4 en astrocitos pertenecientes a rodajas del animal inyectado con el vector viral AAV8/GFAP-hM3D-mcherry. Barra de escala, 30 μm . **(a, derecha)** Trazos representativos de la señal relativa de calcio obtenidos de astrocitos del animal inyectado con el vector viral AAV8/GFAP-hM3D-mcherry antes (basal) y después de la aplicación de CNO (CNO). **(b, izquierda)** Probabilidad de que ocurra una espiga de calcio frente al tiempo. **(b, derecha)** Probabilidad de que ocurra una espiga de calcio antes (basal) y después de la aplicación de CNO (CNO) en el animal inyectado con el vector viral AAV8/GFAP-hM3D-mcherry y en el animal no inyectado (93 astrocitos de 10 rodajas y 64 astrocitos de 7 rodajas, respectivamente). **(c, izquierda)** Amplitud de los EPSCs a lo largo del tiempo en el animal inyectado con el vector viral AAV8/GFAP-hM3D-mcherry. **(c, derecha)** Cambios relativos en la amplitud de los EPSCs tras aplicación de CNO en el animal inyectado con el vector viral AAV8/GFAP-hM3D-mcherry en ausencia y en presencia de CPT y en el animal no inyectado con el vector viral AAV8/GFAP-hM3D-mcherry.

Para reforzar esta idea empleamos herramientas farmacológicas como aproximación experimental alternativa. A tal fin utilizamos el péptido TFLLR, un agonista del receptor de tipo 1 activado por proteasa (PAR-1, del inglés type 1 Protease-activated receptor), el cual se encuentra preferentemente expresado en astrocitos (Lee *et al.*, 2007; Shigetomi *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2013) y cuya activación provoca un aumento en los niveles de calcio de estas células (Lee *et al.*, 2007; Shigetomi *et al.*, 2008; Hermann *et al.*, 2009; Nicole *et al.*, 2005; Gómez-Gonzalo *et al.*, 2010; Carlsen *et al.*, 2014; Lalo *et al.*, 2014). La aplicación local de TFLLR (1 mM) a través de una micropipeta provocó consistentemente aumentos en los niveles de calcio en los astrocitos adyacentes ($n = 51$ astrocitos de 8 rodajas; Figura 8a,b) y, simultáneamente, indujo una modulación de la transmisión sináptica ($n = 5$; Figura 8c). Estos resultados contribuyen a sostener la idea de que los aumentos de calcio en los astrocitos son suficientes para deprimir la transmisión sináptica en neuronas piramidales de capa 5.

Figura 8. La estimulación selectiva de los astrocitos genera depresión de la transmisión sináptica.



2. IDENTIFICACIÓN DE LOS MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN SUBYACENTES A LA REGULACIÓN HETERONEURONAL MEDIADA POR ASTROCITOS.

Los datos expuestos hasta ahora señalan que la depresión heteroneuronal está regulada por mecanismos de comunicación entre astrocitos y neuronas. En concreto, los resultados señalan la implicación de receptores CB1 en astrocitos en la generación de este mecanismo de regulación lateral. Diferentes estudios han mostrado que la activación de receptores CB1 en astrocitos induce la liberación de glutamato desde estas células (Navarrete & Araque, 2008; 2010; Min & Nevian, 2012; Navarrete *et al.*, 2014). No obstante, otros trabajos indican que ciertas formas de depresión heteroneuronal se deben a la liberación de ATP desde los astrocitos (Pascual *et al.*, 2005; Serrano *et al.*, 2006). Partiendo de los resultados obtenidos y de las hipótesis defendidas en trabajos anteriores nos propusimos identificar los mecanismos de señalización astrocito-neurona subyacentes a la regulación heteroneuronal.

LA ESTIMULACIÓN DE LOS ASTROCITOS PRODUCE UNA DEPRESIÓN SINÁPTICA A TRAVÉS DE LA ACTIVACIÓN DE RECEPTORES PRESINÁPTICOS DE TIPO A1

Con el fin de identificar el mecanismo molecular responsable de la modulación sináptica mediada por astrocitos realizamos una serie de experimentos dirigidos a inducir la gliotransmisión. En primer lugar, empleando el péptido TFLLR como estímulo farmacológico, pretendíamos inducir aumentos de calcio en los astrocitos que desencadenasen los mecanismos de liberación de gliotransmisores. En condiciones control, la estimulación de los astrocitos indujo una depresión sináptica en neuronas piramidales de capa 5. Este fenómeno pudo volver a ser registrado en las mismas células tras estimular a los astrocitos en presencia de los siguientes agentes farmacológicos: antagonista de los receptores purinérgicos de tipo 2 (Suramina, μM ; $n = 10$), antagonista de los

receptores metabotrópicos de glutamato mGluR5 y mGluR1 (MPEP, 50 μ M y LY367385, 100 μ M; n = 5) y antagonista de los receptores CB1 (AM251, 2 μ M; n = 7; Figura 9a). Por el contrario, la depresión sináptica observada en condiciones control quedó abolida en presencia del antagonista de los receptores PAR-1 (SCH79797, n = 5; Figura 9a), indicando que el efecto observado se debía a la activación selectiva de los receptores PAR-1. Del mismo modo, la depresión sináptica observada en la situación control quedó bloqueada tras añadir en el medio el antagonista de los receptores A1 (CPT, 5 μ M; n = 7; Figura 9a), lo que sugiere que el efecto sobre la transmisión sináptica se debe a la activación de receptores A1. En un segundo grupo de experimentos realizados en animales inyectados con AAV8/GFAP-hM3D-mcherry la aplicación de CNO no produjo ningún efecto sobre la transmisión sináptica en presencia de CPT (Figura 7c).

Además, en rodajas extraídas del ratón $IP_3R2^{-/-}$ la aplicación del agonista selectivo de los receptores A1 (CPA 1 μ M) provocó una depresión en la transmisión sináptica (n = 5), lo que indica que la activación de los receptores A1 es posterior al aumento de los niveles de calcio en los astrocitos (Figura 9b).

Todos estos resultados apuntan a la implicación del sistema purinérgico en el fenómeno de depresión sináptica mediada por astrocitos. Publicaciones de otros grupos indican que los astrocitos liberan ATP que puede degradarse a adenosina mediante ectonucleotidasas extracelulares para señalizar sobre neuronas (Zhang et al., 2003; Pascual et al., 2005; Serrano et al., 2006) o liberar directamente adenosina que actúa sobre estas células (Martín et al., 2007). Nuestros datos se suman a la información publicada en los últimos años e indican que la señalización purinérgica está implicada en la comunicación astrocito-neurona. En concreto, nuestros resultados sugieren que la activación de receptores A1 para adenosina desencadena el efecto modulador sobre la transmisión sináptica. No obstante, dado que no era el objetivo principal de nuestro trabajo, no profundizamos en la caracterización exhaustiva de la

señalización purinérgica. Por ello, en este estudio hablaremos de ATP/adenosina para referirnos a la liberación del gliotransmisor implicado en el fenómeno.

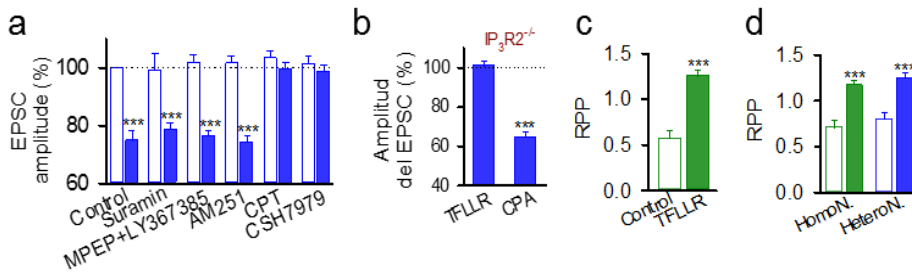


Figura 9. La estimulación de los astrocitos genera depresión de la transmisión sináptica a través de la activación de receptores presinápticos de tipo A1. (a) Cambios relativos en la amplitud de los EPSCs tras la aplicación de TFLLR en el animal Wt. En control y en presencia de suramina, MPEP + LY367385, AM251, CPT y SCH7979. **(b)** Cambios relativos en la amplitud del EPSC tras la aplicación de TFLLR y CPA en el animal $IP_3R2^{-/-}$. **(c)** Ratio de pares de pulsos (RPP) antes y después de la aplicación de TFLLR en el animal Wt. **(d)** Razón de pares de pulsos (RPP) antes y después de la estimulación homoneuronal en el animal Wt.

Los cambios observados en el razón de pares de pulsos obtenido en los experimentos realizados con TFLLR y con estimulación neuronal directa revela un origen presináptico del mecanismo (Figura 9c,d). En su conjunto, estos resultados sugieren que la activación de los astrocitos deprime la transmisión sináptica excitatoria en neuronas piramidales de capa 5 a través de la activación de receptores A1 presinápticos.

LA DEPRESIÓN SINÁPTICA HETERONEURONAL REQUIERE SEÑALIZACIÓN MEDIADA POR ENDOCANNABINOIDES EN ASTROCITOS.

Dado que la liberación de endocannabinoides desde las neuronas puede ejercer su efecto modulador a distancias lejanas (>60 μ m) a través de la activación de los astrocitos, y puesto que la estimulación con TFLLR induce una depresión sináptica mediada por receptores A1 de características similares a la depresión heteroneuronal mediada por

endocannabinoides, propusimos que la liberación de endocannabinoides desde las neuronas piramidales de capa 5 deprimiría sinapsis lejanas a través de la activación de receptores CB1 en los astrocitos, produciendo un aumento en los niveles de calcio intracelular y liberación de ATP/adenosina sobre sinapsis distantes para producir la depresión sináptica heteroneuronal.

Con el objetivo de contrastar esta hipótesis analizamos los cambios en la transmisión sináptica excitatoria tras estimular la liberación de endocannabinoides antes y después de la aplicación del antagonista de los receptores A1 (CPT, 5 μ M) en el baño. En estas condiciones, la depresión homoneuronal observada en control pudo volver a ser inducida tras la perfusión de CPT (5 de 16 experimentos; 31.2%) (Figura 10a). Sin embargo, la depresión sináptica heteroneuronal no pudo inducirse en presencia de CPT (n = 16; Figura 10a). Esto indica que la activación endógena de los astrocitos induce el fenómeno de regulación lateral.

Para reforzar la hipótesis de la generación de la modulación heteroneuronal mediada por la activación endógena de los astrocitos, investigamos directamente la participación del receptor CB1 astrogial analizando la transmisión sináptica en un animal GFAP-CB1R^{-/-} (Han *et al.*, 2012; Bosier *et al.*, 2013). En este animal el receptor CB1 ha sido selectivamente eliminado en las células GFAP positivas (ver apartado de métodos). En rodajas de un ratón adulto silvestre (del inglés wild type, Wt; GFAP-CB1R-Wt), la estimulación de una neurona piramidal de capa 5 produjo aumentos en los niveles de calcio de los astrocitos (Figura 10e), generando además tanto la depresión sináptica homoneuronal como la heteroneuronal (en 8 de 19 y en 6 de 19 experimentos, 42.10% y 31.57%, respectivamente; Figura 10b,c). Además, de forma consistente a lo observado en ratones juveniles, la depresión sináptica heteroneuronal no pudo ser inducida en presencia del antagonista de los receptores CB1 (AM251, n = 10) ni del antagonista de los receptores A1 (CPT, n = 9; Figura 10d). Por el contrario, en rodajas de ratones GFAP-CB1R^{-/-} adultos, la estimulación de neuronas piramidales de capa 5 indujo la depresión

homoneuronal (4 de 11 experimentos; 36.36 %; Figura 10c) pero no logró generar aumentos de calcio en los astrocitos (n = 51 astrocitos de 8 rodajas; Figura 10e) o evocar la depresión sináptica heteroneuronal (n = 11; Figura 10b,c).

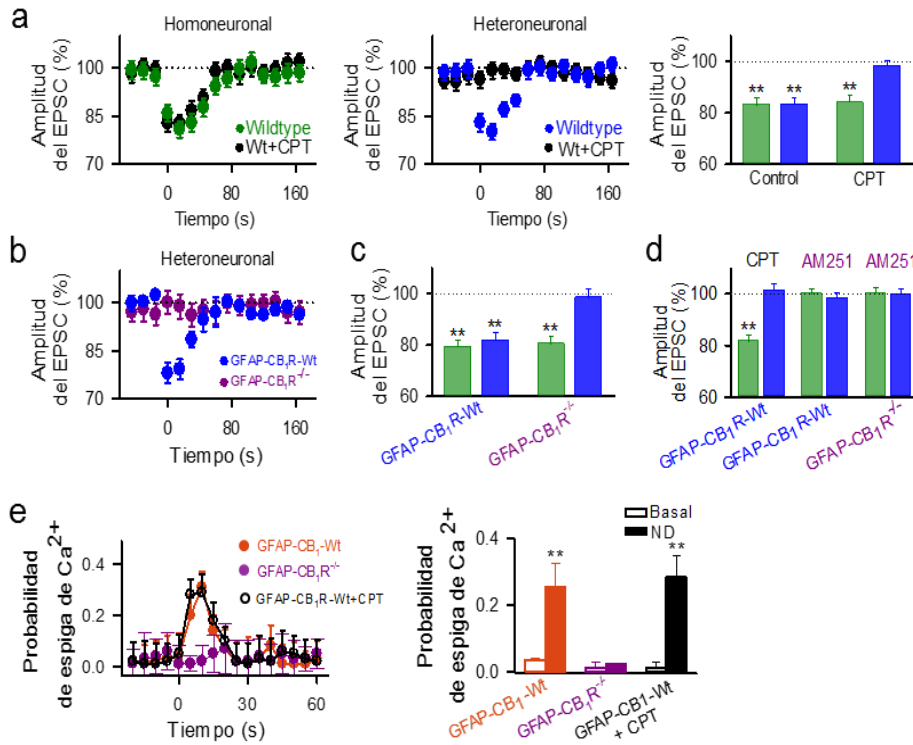


Figura 10. La depresión sináptica heteroneuronal requiere señalización mediada por endocannabinoides en astrocitos. (a, izquierda) Amplitud de los EPSCs a lo largo del tiempo en control y en presencia de CPT en la célula homoneuronal (verde) y en la célula heteroneuronal (azul). Estimulación homoneuronal en tiempo 0. **(a, derecha)** Cambios relativos en la amplitud de los EPSCs tras la estimulación homoneuronal en el animal Wt. en situación control y en presencia de CPT. **(b)** Amplitud de los EPSCs a lo largo del tiempo en el animal GFAP-CB1R-Wt y en el animal GFAP-CB1R^{-/-} (estimulación homoneuronal en tiempo 0). **(c)** Cambios relativos en la amplitud de los EPSCs tras la estimulación homoneuronal en el animal GFAP-CB1R-Wt y en el animal GFAP-CB1R^{-/-}. **(d)** Cambios relativos en la amplitud del EPSC tras la estimulación homoneuronal en el animal GFAP-CB1R-Wt en presencia de CPT y AM251 y en el animal GFAP-CB1R^{-/-} en presencia de AM251. **(e)** Probabilidad de que ocurra una espiga de calcio antes (basal) y después de la estimulación homoneuronal (ND) en el animal GFAP-CB1R-Wt en control y en presencia de CPT (57 astrocitos de 8 rodajas) y en el animal GFAP-CB1R^{-/-} (51 astrocitos de 8 rodajas).

En su conjunto estos resultados sugieren que, tanto en animales juveniles como en adultos, los endocannabinoides liberados por neuronas piramidales de capa 5 deprimen sinapsis homoneuronales a través de la activación directa de receptores CB1 presinápticos, al mismo tiempo que activan receptores CB1 en astrocitos, produciendo aumentos en los niveles de calcio en estas células y estimulando la liberación del gliotransmisor ATP/adenosina que induce una depresión heteroneuronal en neuronas piramidales de capa 5 adyacentes por medio de la activación de receptores A1 presinápticos (Figura 11).

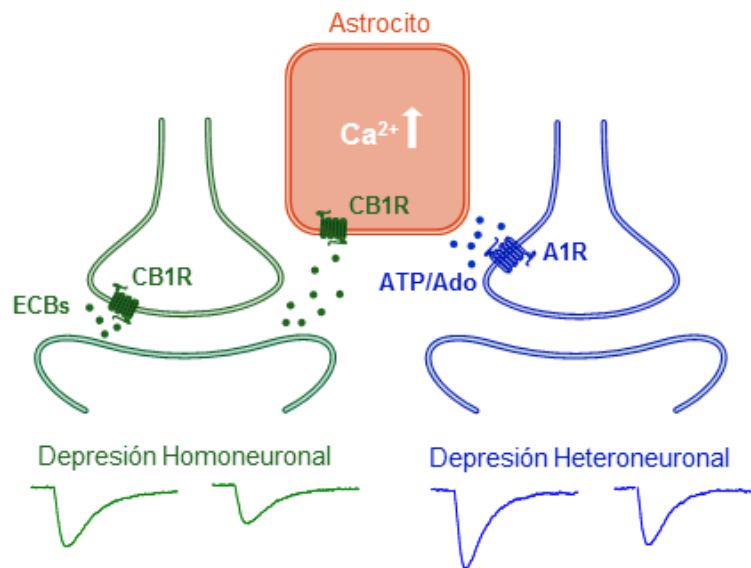


Figura 11. Imagen esquemática que muestra el proceso de señalización mediado por endocannabinoides. Los eCBs liberados por una neurona piramidal de capa 5 actúan directamente sobre la terminal presináptica causando la depresión homoneuronal. Además, los eCBs activan receptores CB1 en astrocitos aumentando los niveles de calcio, estimulando la liberación de ATP/adenosina y causando la depresión heteroneuronal por medio de la activación de receptores A1 presinápticos.

3. ESTUDIO DE LA REGULACIÓN HETERONEURONAL MEDIADA POR ASTROCITOS EN LA MICROORGANIZACIÓN DE LA COLUMNA CORTICAL.

La hipótesis de la organización columnar de la corteza propone que el módulo básico de funcionamiento cortical consiste en una estructura formada por diferentes elementos neuronales conectados de un modo espacialmente muy preciso (Markram, 2008; DeFelipe *et al*, 2012). Este sistema de procesamiento de información se basa en una distribución celular ordenada verticalmente en 6 capas a lo largo de las columnas neocorticales. Numerosos estudios señalan que las propiedades funcionales de la corteza somatosensorial dependen de las interacciones sinápticas que tienen lugar en estos sub-circuitos. Por ello, en los últimos años se ha acumulado gran cantidad de información acerca de la naturaleza de las conexiones neuronales en el marco de los microcircuitos corticales (Harris & Shepherd, 2015). Sin embargo, las propiedades de los elementos no neuronales, como los astrocitos, y las posibles implicaciones de su interacción con las neuronas en el seno de las columnas permanece inexplorada. Por ello, nuestro siguiente objetivo consistía en estudiar el fenómeno de regulación lateral de la transmisión sináptica en una estructura donde la disposición espacial las conexiones es tan relevante.

LA DEPRESIÓN HETERONEURONAL MEDIADA POR ASTROCITOS OBEDECE UN PATRÓN COLUMNAR ESPECÍFICO

Comenzamos analizando el fenómeno de modulación lateral en las columnas de la corteza somatosensorial. Para ello escogimos la región de los barriles, donde las columnas pueden ser fácilmente identificadas a partir de las estructuras características que aparecen en la capa 4 (Figura 12a y materiales y métodos).

Una vez determinados los límites de una columna, realizamos registros simultáneos en la modalidad de whole-cell en neuronas piramidales de capa 5 pertenecientes a ésta o a otra columna. Se estimuló una de las neuronas mediante despolarización y simultáneamente se registraron los EPSCs en ésta neurona (homoneuronal) y en la adyacente (heteroneuronal intra o intercolumnar) (Figura 12b). La estimulación de una única neurona piramidal de capa 5 para inducir la liberación de endocannabinoides produjo una depresión sináptica transitoria en la célula heteroneuronal intracolumnar registrada simultáneamente (5 de 11 experimentos; 45.45%). Por el contrario, en neuronas situadas a la misma distancia pero pertenecientes a la columna cortical adyacente, la depresión sináptica heteroneuronal no pudo ser inducida (n = 11; Figura 12c,d). Estos resultados sugieren que la depresión sináptica mediada por astrocitos es específica de la columna cortical.

Para evaluar la influencia de mecanismos espaciales adicionales que pudiesen limitar la aparición del fenómeno, analizamos la distribución espacial del efecto dentro de una única columna cortical (~300 μm). Los resultados mostraban que la depresión heteroneuronal estaba presente en neuronas cuyo soma se encontraba separado entre 70-270 μm de la neurona estimulada (Figura 12e), lo que indica que esta forma de modulación sináptica mediada por astrocitos está relacionada con la organización columnar y no con mecanismos pasivos dependientes de la distancia.

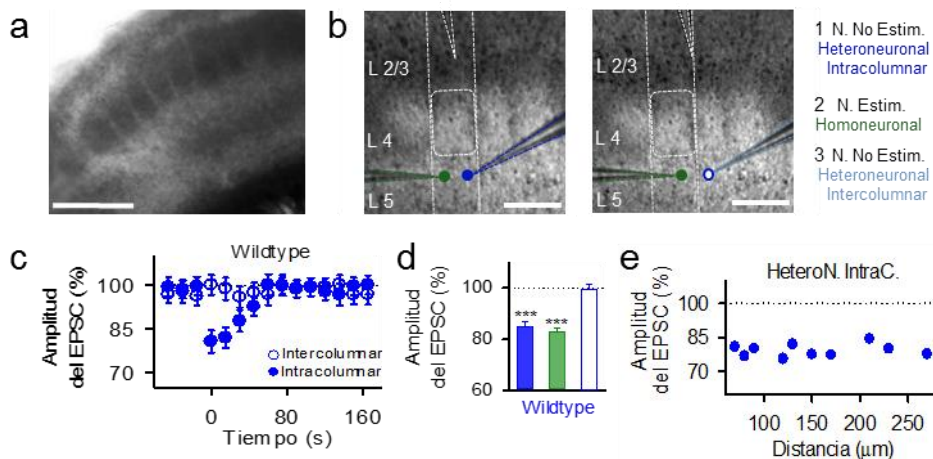


Figura 12. La depresión sináptica heteroneuronal mediada por astrocitos obedece un patrón columnar específico. (a) Imagen DIC de la subregión de los barriles en la corteza somatosensorial. Nótese los barriles en la capa 4. Barra de escala 1mm. **(b)** Esquema sobre imagen DIC que muestra la situación de las pipetas de estimulación (capa 2/3) y registro (capa 5) en la configuraciones intracolumnar (izquierda) e intercolumnar (derecha). Los límites de la columna quedan definidos a partir de los barriles de capa 4. Barra de escala 250 μm. **(c)** Amplitud de los EPSCs a lo largo del tiempo en la célula heteroneuronal en las configuraciones intracolumnar (azul lleno) e intercolumnar (azul vacío). Estimulación homoneuronal en tiempo 0. **(d)** Cambios relativos en la amplitud de los EPSCs tras la estimulación homoneuronal en el animal Wt. **(e)** Amplitud del valor de los EPSCs a diferentes distancias del soma homoneuronal en situación intracolumnar. Se muestran los valores de 10 células heteroneuronales diferentes en los primeros 15s tras la estimulación homoneuronal.

LA RESPUESTA ASTROGLIAL A ENDOCANNABINOIDES OBEDECE UN PATRÓN COLUMNAR Y LAMINAR ESPECÍFICO.

Una vez reveladas la especificidad columnar de la depresión heteroneuronal y la importancia de los aumentos en los niveles de calcio astrogial en la generación del fenómeno, resultaba imprescindible ahondar en el estudio de las respuestas de calcio astrogiales atendiendo a variables espaciales (Figura 13). Por ello, en primer lugar, analizamos la respuesta de los astrocitos ante endocannabinoides liberados por neuronas piramidales de capa 5 monitorizando sus niveles de calcio en dos

columnas corticales diferentes. En estos experimentos la estimulación neuronal sólo indujo elevaciones en los niveles de calcio en los astrocitos de capa 5 pertenecientes a la columna de la neurona estimulada, aumentado su probabilidad de espiga calcio ($n = 82$ astrocitos intracolumnares y $n = 69$ astrocitos intercolumnares de 9 rodajas; Figura 15a). Estos resultados indican que los endocannabinoides liberados por neuronas piramidales de capa 5 inducen aumentos en los niveles de calcio únicamente en los astrocitos pertenecientes a la misma columna. Además, estos experimentos mostraron que la estimulación de neuronas de capa 5 no lograba inducir aumentos en los niveles de calcio en astrocitos pertenecientes a la capa 4 en esa o en otra columna ($n = 80$ astrocitos intracolumnares y $n = 69$ astrocitos intercolumnares de 9 rodajas; Figuras 14a y 15a). Sin embargo, la estimulación de neuronas de capa 5 sí provocó aumentos en los niveles de calcio en astrocitos de capa 2/3 de su misma columna ($n = 79$ astrocitos intracolumnares y $n = 73$ astrocitos intercolumnares de 9 rodajas; Figura 15a).

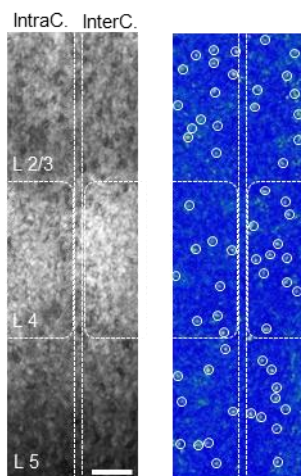


Figura 13. Esquema del sistema empleado para monitorizar el calcio en los astrocitos pertenecientes a diferentes capas y columnas. (Izquierda) Imagen DIC de las capas 2/3, 4 y 5. **(Derecha)** Imágenen de pseudocolor de los niveles de fluorescencia de la sonda Fluo4 en astrocitos pertenecientes a las capas 2/3, 4 y 5 de dos columnas distintas. Los círculos sobre los astrocitos corresponden a las regiones de interés. Barra de escala, 50 μm .

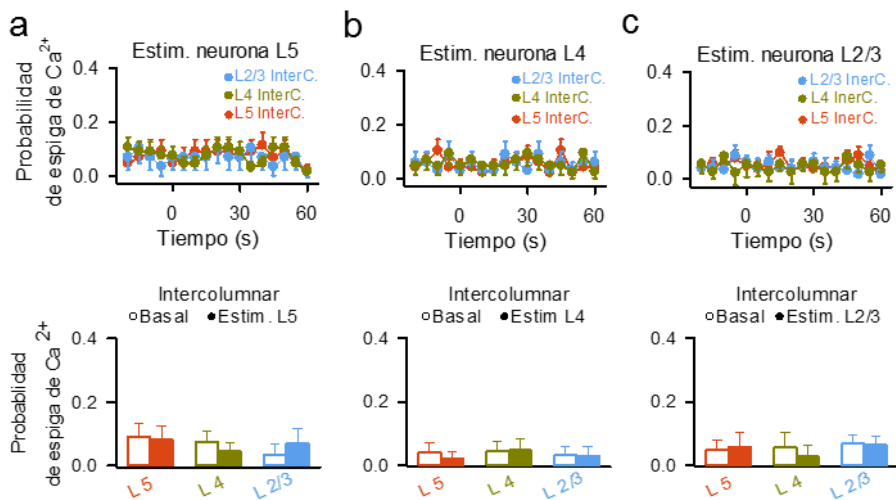


Figura 14. La respuesta astroglial a endocannabinoides obedece un patrón columnar y laminar específico. (a) Probabilidad de que ocurra una espiga de calcio en astrocitos de las capas 2/3, 4 y 5 intercolumnares antes y después de la estimulación de una neurona de capa 5. **(b)** Probabilidad de que ocurra una espiga de calcio en astrocitos de las capas 2/3, 4 y 5 intercolumnares antes y después de la estimulación de una neurona de capa 4. **(c)** Probabilidad de que ocurra una espiga de calcio en astrocitos de las capas 2/3, 4 y 5 intercolumnares antes y después de la estimulación de una neurona de capa 2/3.

Dadas estas diferencias, nos propusimos analizar el patrón de activación astroglial a lo largo de las capas corticales. Centrando el análisis en los astrocitos pertenecientes a las láminas 2/3, 4 y 5 monitorizamos sus niveles intracelulares de calcio antes y después de estimular neuronas de capa 2/3 y capa 4. Estos experimentos mostraron que la estimulación de una única neurona excitatoria de capa 4 o de capa 2/3 no logra inducir elevaciones en los niveles de calcio en los astrocitos de ninguna de las capas estudiadas pertenecientes a la columna adyacente ($n = 199$ astrocitos de 8 rodajas y $n = 172$ astrocitos de 7 rodajas; Figura 14b,c). No obstante, esos mismos estímulos consiguen generar complejos patrones de respuesta astroglial dentro de la misma columna. En concreto, la estimulación de una neurona excitatoria de capa 4 aumenta la probabilidad de espiga de calcio en astrocitos localizados en capas 4 y 2/3, pero no en los pertenecientes a capa 5 ($n = 52$, $n = 81$ y $n = 68$ astrocitos de 8 rodajas respectivamente; Figura 15b). Además, la estimulación de

una neurona de capa 2/3 aumenta la probabilidad de espiga de calcio en astrocitos localizados en su misma lámina, pero no genera cambios en astrocitos situados en las capas 4 y 5 ($n = 65$, $n = 40$ y $n = 56$ astrocitos de 7 rodajas respectivamente; Figura 15c). En todos los casos se añadió a la solución intracelular de la neurona estimulada el bloqueante de los canales de sodio dependientes de voltaje QX-314 para prevenir la generación de potenciales de acción (5 mM).

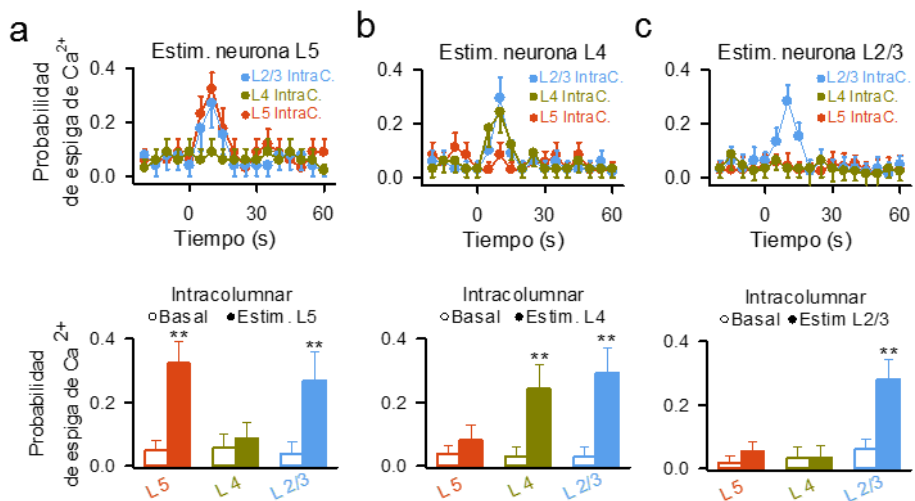
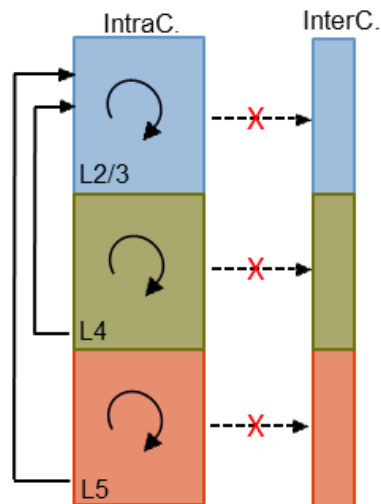


Figura 15. La respuesta astroglial a endocannabinoides obedece un patrón columnar y laminar específico. (a) Probabilidad de que ocurra una espiga de calcio en astrocitos de las capas 2/3, 4 y 5 intracolumnares antes y después de la estimulación de una neurona de capa 5. **(b)** Probabilidad de que ocurra una espiga de calcio en astrocitos de las capas 2/3, 4 y 5 intracolumnares antes y después de la estimulación de una neurona de capa 4. **(c)** Probabilidad de que ocurra una espiga de calcio en astrocitos de las capas 2/3, 4 y 5 intracolumnares antes y después de la estimulación de una neurona de capa 2/3.

La información obtenida tras la realización de estos experimentos apunta a que la activación de los astrocitos por endocannabinoides obedece un patrón laminar y columnar específico (Figura 16).

Figura 16. La activación de los astrocitos por endocannabinoides obedece un patrón laminar y columnar específico.

Dibujo esquemático que representa el patrón de activación de los astrocitos frente a la estimulación de neuronas pertenecientes a distintas capas. Los astrocitos aumentan sus niveles de calcio frente a la estimulación de neuronas de su misma capa y columna. Además, los astrocitos de capa 2/3 intracolumnares responden con elevaciones de los niveles de calcio frente a estimulaciones de neuronas pertenecientes a las capas 5 y 4.



LA MODULACIÓN SINÁPTICA MEDIADA POR ASTROCITOS OBEDECE UN PATRÓN LAMINAR ESPECÍFICO

Tras observar que la respuesta de los astrocitos ante la liberación de endocannabinoides obedecía un patrón laminar específico, nos interesaba analizar la posibilidad de que la depresión heteroneuronal estuviese siguiendo un esquema similar. Para ello realizamos registros simultáneos en las condiciones descritas en apartados anteriores (ver figura 1) utilizando ahora neuronas localizadas en las capas 2/3, 4 y 5 de la corteza somatosensorial (Figura 16).

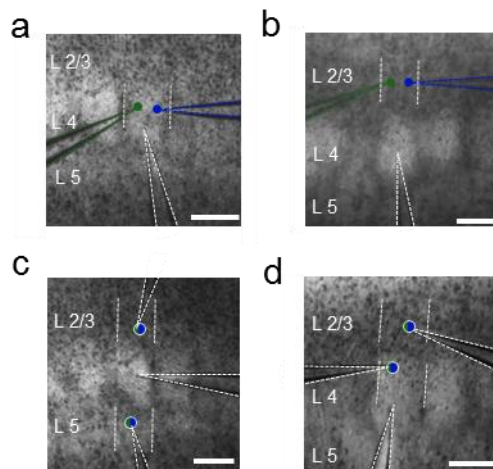


Figura 16. Configuraciones experimentales para el análisis laminar de la modulación heterosináptica. (a) Esquemas sobre imagen DIC que muestran la disposición de las pipetas de estimulación en capa 4 y registro en capa 4. (b) Estimulación en capa 4 y registro en capa 2/3. (c) Estimulación en capa 4 y registro en capas 2/3 y 5 (d) Estimulación en capa 4 y registro en capas 4 y 2/3. Barras de escala 250 μm .

Iniciamos el estudio analizando el efecto entre células de capa 4. No obstante, dado el elevado número de neuronas no piramidales existente en esta lámina cortical comenzamos realizando registros entre células clasificadas como *neuronas no excitatorias* localizadas en esta capa (ver apartado de Materiales y Métodos). Sorprendentemente, pese a que la estimulación de una de estas células logra inducir aumentos de calcio en los astrocitos adyacentes a través de la activación de receptores CB1 ($n = 40$ astrocitos en experimentos con WIN y $n = 41$ astrocitos en experimentos con estimulación de interneuronas; Figura 17c), no es capaz de generar depresión sináptica heteroneuronal en las neuronas no excitatorias vecinas ($n = 12$; Figura 17a,b). Sin embargo, cuando realizamos el mismo experimento empleando células clasificadas como *neuronas excitatorias* (ver apartado de Materiales y Métodos), su estimulación produjo tanto depresión homeoneuronal sobre sí misma como depresión heteroneuronal en neuronas excitatorias adyacentes (7 de 14 y 6 of 14 experimentos; 50% y 42.8%, respectivamente; Figura 18a).

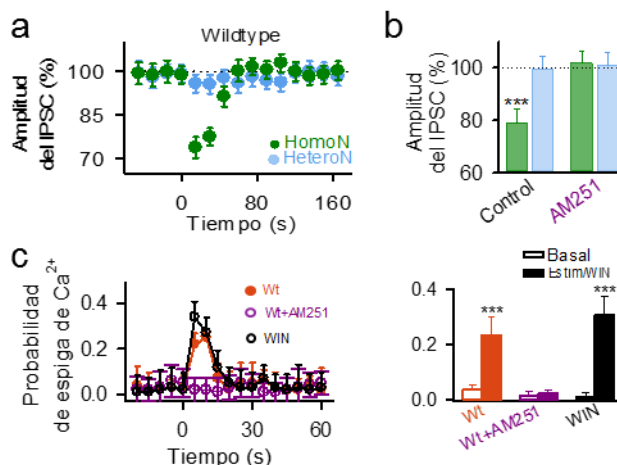


Figura 17. La depresión sináptica heteroneuronal mediada por astrocitos no ocurre en neuronas no excitatorias de capa 4. (a) Amplitud de los IPSCs a lo largo del tiempo en el animal Wt. (estimulación homeoneuronal en tiempo 0). **(b)** Cambios relativos en la amplitud del IPSC tras la estimulación homeoneuronal en el animal Wt. en situación control y en presencia de AM251. **(c, izquierda)** Probabilidad de que ocurra una espiga de calcio frente al tiempo. **(c, derecha)** Probabilidad de que ocurra una espiga de calcio antes (basal) y después de la estimulación homeoneuronal (Estim.) o la aplicación del agonista de los receptores CB1 (WIN) en el animal Wt (n = 41 astrocitos y n = 40 de 6 rodajas respectivamente).

Por otra parte, los experimentos realizados entre neuronas piramidales de capa 2/3 mostraron que la estimulación de una de estas células inducía tanto la modulación homeoneuronal como la depresión sináptica heteroneuronal (5 de 11 y 4 de 11 experimentos; 45.4% y 36.3%, respectivamente; Fig. 18b). Estos resultados indican que la modulación sináptica mediada por astrocitos también está presente entre neuronas excitatorias de capas 2/3 y 4. Además, de forma consistente a lo observado en capa 5, la presencia en el medio extracelular del antagonista de los receptores A1 (CPT) bloqueó la inducción de la depresión heteroneuronal en estas capas, sugiriendo que este fenómeno sigue el mismo mecanismo molecular descrito previamente (Figuras 18a,b), esto es, la activación endógena de los astrocitos induce la liberación del gliotransmisor ATP/adenosina que actúa sobre receptores A1 presinápticos induciendo el fenómeno de modulación lateral.

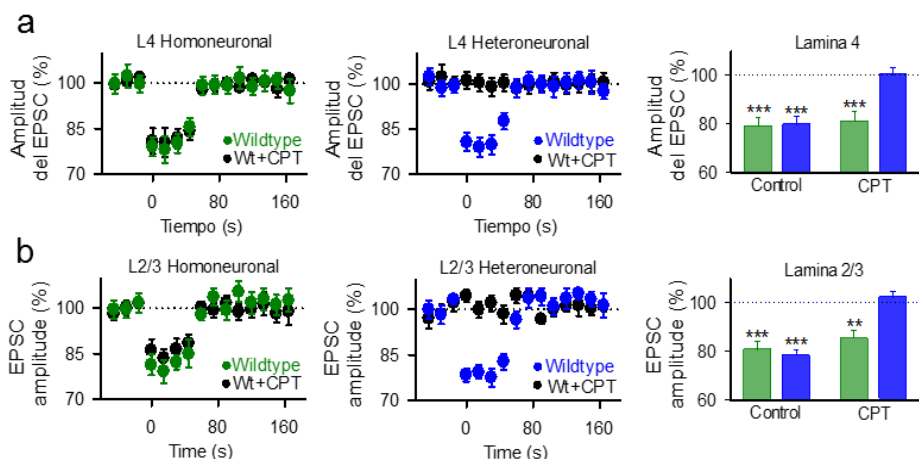


Figura 18. La modulación sináptica mediada por astrocytos obedece un patrón laminar específico. (a, izquierda) Amplitud de los EPSCs a lo largo del tiempo en control y en presencia de CPT en la célula homoneuronal (verde) y en la célula heteroneuronal (azul). Estimulación de la célula de capa 4 homoneuronal en tiempo 0. **(a, derecha)** Cambios relativos en la amplitud de los EPSCs tras la estimulación de la célula de capa 4 homoneuronal en el animal Wt. en situación control y en presencia de CPT. **(b, izquierda)** Amplitud de los EPSCs a lo largo del tiempo en control y en presencia de CPT en la célula homoneuronal (verde) y en la célula heteroneuronal (azul). Estimulación de la célula de capa 2/3 homoneuronal en tiempo 0. **(b, derecha)** Cambios relativos en la amplitud del EPSC tras la estimulación de la célula de capa 2/3 homoneuronal en el animal Wt. en situación control y en presencia de CPT.

La existencia de modulación heteroneuronal en capas 2/3, 4 y 5 de corteza apuntaba a que la regulación sináptica mediada por astrocytos era un fenómeno general entre neuronas corticales excitatorias. No obstante, dado que este fenómeno sináptico dependía de la activación de receptores CB1 en astrocytos y puesto que la respuesta de estas células a la señalización por endocannabinoides seguía un patrón laminar específico, nos propusimos comprobar la posibilidad de que la modulación heteroneuronal estuviese obediendo un patrón similar.

Para ello, realizamos registros simultáneos en la modalidad de whole-cell entre neuronas piramidales de capa 2/3 y 5, estimulando selectivamente una de ellas y registrando los EPSCs en la célula situada en la otra capa. La estimulación de una única neurona piramidal de capa 2/3 no produjo cambios en la transmisión sináptica registrada en las neuronas de capa 5 ($n = 11$) (Figura 19a). Sin embargo, la estimulación de una neurona piramidal de capa 5 sí provocó depresión de la transmisión sináptica en las neuronas situadas en capa 2/3 (3 de 11 experimentos, 27.2%; Figura 19a). De forma similar, la estimulación de una neurona de capa 2/3 no logró modular la transmisión sináptica en neuronas de capa 4 ($n = 10$) (Figura 19b), pero la activación de una neurona excitatoria de capa 4 sí generó regulación sináptica en las neuronas piramidales de capa 2/3 en 3 de 10 (30%) experimentos (Figura 19b).

En su conjunto, estos resultados indican que la regulación de la transmisión sináptica mediada por astrocitos entre neuronas excitatorias obedece un patrón laminar específico. (Figura 19c).

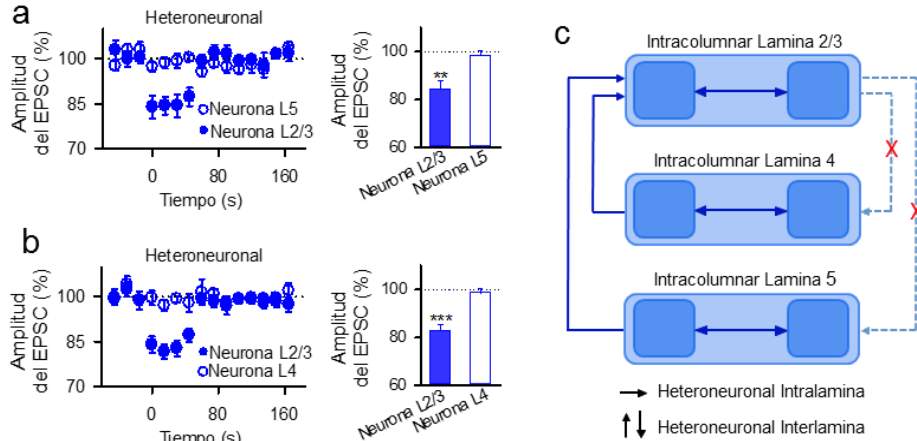


Figura 19. La modulación sináptica mediada por astrocitos obedece un patrón laminar específico. (a, izquierda) Amplitud de los EPSCs a lo largo del tiempo en la célula heteroneuronal de capa 5 (azul vacío) y en la célula heteroneuronal de capa 2/3 (azul lleno). Estimulación de la célula de capa 2/3 o capa 5 homoneuronal en tiempo 0. **(a, derecha)** Cambios relativos en la amplitud del EPSC tras la estimulación de la célula homoneuronal en el animal Wt. en las células heteroneuronales de capa 2/3 (azul lleno) y capa 5 (azul vacío). **(b, izquierda)** Amplitud de los EPSCs a lo largo del tiempo en la célula heteroneuronal de capa 4 (azul vacío) y en la célula heteroneuronal de capa 2/3 (azul lleno). Estimulación de la célula de capa 4 o capa 2/3 homoneuronal en tiempo 0. **(b, derecha)** Cambios relativos en la amplitud del EPSC tras la estimulación de la célula homoneuronal en el animal Wt. en las células heteroneuronales de capa 4 (azul vacío) y capa 2/3 (azul lleno). **(c)** Dibujo esquemático que representa el patrón de generación de la depresión heteroneuronal. El fenómeno de modulación lateral aparece entre neuronas excitatorias de la misma lámina. Además, esta forma de regulación puede ser inducida en neuronas de capa 2/3 por la estimulación de células excitatorias pertenecientes a las láminas 4 y 5.

V. DISCUSIÓN

Los resultados presentados en este trabajo muestran que los astrocitos regulan la función sináptica en la corteza siguiendo un patrón laminar y columnar específico. Esta forma de interacción entre astrocitos y neuronas en el marco de los microcircuitos corticales posee unas propiedades espaciales que siguen la compleja organización funcional de esta estructura cerebral. Por ello, según la información obtenida en este estudio, puede afirmarse que los astrocitos son elementos activos en los procesos de transferencia y procesamiento de información de los módulos corticales.

Así, la activación de los astrocitos mediante estímulos endógenos (eCBs fisiológicamente liberados por neuronas corticales), induce elevaciones en los niveles de calcio intracelular de estas células y deprime de forma transitoria la transmisión sináptica excitatoria en neuronas adyacentes. Esta forma de depresión sináptica heteroneuronal requiere la activación de receptores CB1 en astrocitos y está mediada por la activación de receptores A1 presinápticos, pudiendo ser además inducida de forma exógena mediante estímulos farmacológicos y químico-genéticos. La propiedad más notable de este fenómeno de modulación sináptica es su dependencia de un patrón laminar y columnar concreto. Además, la activación astrogliar mediada por endocannabinoides liberados por neuronas excitatorias sigue el mismo patrón.

En su conjunto, nuestros resultados muestran la compleja naturaleza espacial de la comunicación bidireccional astrocito-neurona existente en las columnas corticales. La participación de los astrocitos en complejos fenómenos de modulación de la transmisión sináptica en estos subcircuitos permite afirmar que son elementos integrales de la denominada unidad mínima de procesamiento de información cortical.

Estudios recientes han mostrado que la estimulación de los astrocitos mediante endocannabinoides induce mecanismos de regulación de la transmisión sináptica tanto en el hipocampo como en la corteza

somatosensorial (Navarrete & Araque, 2010; Min & Nevian, 2012). No obstante, si bien en el hipocampo la activación de los astrocitos produce mecanismos de potenciación, en la corteza la estimulación de estas células a través de receptores CB1 genera una forma de depresión sináptica a largo plazo denominada STDP (del inglés *spike-timing long-term depression*) en neuronas piramidales de la capa 2/3. Pese a esta diferencia, ambas formas de regulación dependen de glutamato liberado por los astrocitos (Navarrete & Araque, 2010; Min & Nevian, 2012).

Al igual que el trabajo publicado por Min y Nevian en 2012, los resultados mostrados en el presente estudio indican que los astrocitos corticales pueden ser estimulados por el endocannabinoide 2-AG (ver figura 4c) para desencadenar un mecanismo de depresión de la transmisión sináptica. Sin embargo, la forma de regulación lateral que aparece entre neuronas piramidales de capa 2/3 descrita en nuestro estudio depende del gliotransmisor ATP/adenosina. Esta diferencia puede deberse a los paradigmas de estimulación empleados en cada caso, haciendo que los astrocitos liberen distintos gliotransmisores en respuesta a patrones de activación diferentes. En cualquier caso, la información obtenida por ambos trabajos indica que los astrocitos corticales pueden liberar al menos dos tipos de gliotransmisores que participan en distintos fenómenos sinápticos. Se abre por tanto el camino a futuros estudios que analicen la posibilidad de que los astrocitos corticales puedan liberar ambos tipos de gliotransmisores y cuáles son las condiciones de señalización que controlan su liberación.

Otros trabajos han mostrado que las elevaciones de calcio en los astrocitos no son el resultado de una respuesta inespecífica ante distintos tipos de neurotransmisores, si no que dependen de la actividad de terminales sinápticas concretas. Los astrocitos localizados en la región CA1 del hipocampo discriminan la actividad de sinapsis colinérgicas y glutamatérgicas, respondiendo selectivamente a la activación de cada una de ellas (Araque *et al.*, 2002; Perea & Araque, 2005). Del mismo modo, en el tálamo ventrobasal los astrocitos responden de manera específica a la

estimulación de las vías sensorial y corticotalámica (Parri *et al.*, 2004). Además, los astrocitos de capa 2/3 de corteza de barriles responden a la estimulación de fibras glutamatérgicas de capa 4 pero no ante aferencias glutamatérgicas procedentes de la capa 2/3 de la columna adyacente (Schipke *et al.*, 2008). Todos estos resultados indican que los astrocitos responden selectivamente a la actividad de grupos de sinapsis específicos.

Nuestro estudio, más allá de emplear la estimulación de tractos nerviosos para evaluar la respuesta astrogial, se basa en la activación de neuronas individuales, pudiendo así profundizar en el conocimiento de la señalización neurona-astrocito en el nivel de los microcircuitos corticales. Los resultados muestran que la activación de una única neurona para generar la liberación de endocannabinoides desencadena un patrón de activación de los astrocitos dependiente del origen de la señal. En concreto:

Especificidad columnar:

- Los astrocitos responden con aumentos de sus niveles de calcio intracelular únicamente ante endocannabinoides liberados por neuronas pertenecientes a su misma columna.

Especificidad laminar:

- Los astrocitos pertenecientes a las láminas 2/3, 4 y 5 responden con aumentos en sus niveles de calcio intracelular ante endocannabinoides liberados por neuronas localizadas en su misma capa.

- Además, los astrocitos pertenecientes a la lámina 2/3 responden con aumentos en sus niveles de calcio intracelular ante endocannabinoides liberados por neuronas localizadas en las láminas 4 o 5.
- Sin embargo, los astrocitos pertenecientes a las láminas 4 o 5 no responden ante endocannabinoides liberados por neuronas localizadas en la capa 2/3.

Relación con el tipo celular implicado:

- En la capa 4 los astrocitos responden ante endocannabinoides liberados tanto por neuronas excitatorias como por neuronas no excitatorias de esa misma capa.

El origen de esta especificidad puede estar relacionado con características meramente morfológicas de los elementos implicados, dependiendo de las ramificaciones dendríticas de una neurona a lo largo de las distintas láminas y columnas, así como de la distribución de los procesos astrogliales. No obstante, al igual que los diferentes elementos neuronales que componen una columna están más conectados entre sí que con elementos de otros módulos (Krieger *et al.*, 2007), dando lugar a patrones de comunicación específicos y circuitos muy complejos, es posible que exista una relación entre neuronas y astrocitos en el mismo sentido, generando una comunicación punto a punto que da lugar a fenómenos controlados espacialmente de una manera muy precisa.

Nuestros resultados indican la existencia de una organización en la comunicación neurona-astrocito de una complejidad mayor a la esperada, desvelando una especificidad en la señalización relacionada con la organización de los circuitos corticales. Así, el patrón de actividad astrogial

es específico de columna y sigue un esquema de generación heterogéneo que puede tener importante implicaciones funcionales.

Las elevaciones en los niveles de calcio intracelular en los astrocitos en respuesta a distintos neurotransmisores generan la liberación de gliotransmisores capaces de modular la transmisión sináptica (Araque *et al.*, 1999). Además, algunos de estos mecanismos de regulación se realizan sobre sinapsis distintas al origen de la señal (Covelo & Araque, 2015).

Los resultados presentados en este trabajo muestran una forma de depresión heteroneuronal de la depresión sináptica mediada por astrocitos que obedece un patrón laminar y columnar específico:

Especificidad columnar:

- Aparece únicamente entre neuronas pertenecientes a la misma columna, no pudiendo generarse entre neuronas localizadas en módulos adyacentes.

Especificidad laminar:

- Puede generarse entre neuronas de las láminas 2/3, 4 y 5 cuando ambas células se localizan en la misma capa.
- Aparece en neuronas de capa 2/3 tras la estimulación de neuronas localizadas en las láminas 4 o 5.
- No puede ser inducido en neuronas de las láminas 4 y 5 cuando el estímulo procede de la capa 2/3.

Relación con el tipo celular implicado:

- Aparece entre neuronas excitatorias pertenecientes a las láminas 2/3, 4 y 5 obedeciendo los patrones columnar y laminar ya descritos.
- No puede ser inducido entre neuronas no excitatorias de capa 4 pertenecientes a la misma columna.

Estos resultados confirman la implicación de los astrocitos en la fisiología sináptica de la neocorteza. No obstante, al mostrar que la regulación de la transmisión sináptica mediada por astrocitos sigue un esquema laminar tan preciso, nuestro trabajo demuestra que estas células son agentes activos en el funcionamiento de los microcircuitos corticales. Más aún, dado que la comunicación bidireccional astrocito-neurona se produce específicamente a nivel de una única columna, puede concluirse que este subtipo celular es uno de los componentes que conforman la unidad fundamental de procesamiento de información cortical.

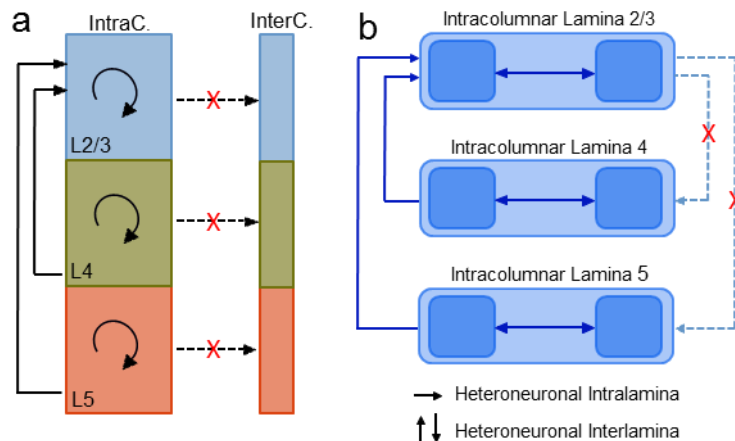


Figura 20. Especificidad laminar y columnar de la comunicación bidireccional entre astrocitos y neuronas en la corteza somatosensorial. (a) Imagen esquemática que muestra la especificidad en las respuestas astrogliales ante endocannabinoides liberados por neuronas situadas en las distintas capas. **(b)** Imagen esquemática que muestra la especificidad laminar y columnar de la modulación lateral mediada por astrocitos en la corteza somatosensorial.

La monitorización de los niveles de calcio en los astrocitos de capa 4 muestra cómo estas células responden a endocannabinoides liberados tanto por neuronas excitatorias como por neuronas no excitatorias. No obstante, pese a que en ambos casos la señal genera aumentos en los niveles de calcio en los astrocitos el fenómeno de regulación lateral no aparece entre neuronas no excitatorias. Debe considerarse no obstante la posibilidad de que la activación astrogliar tras la liberación de endocannabinoides desde este tipo de neuronas de capa 4 produzca fenómenos mediados por astrocitos no detectados en nuestras condiciones experimentales.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que el fenómeno de modulación de la transmisión sináptica mediado por astrocitos aparece únicamente entre neuronas excitatorias, sugiriendo una posible relación con el tipo neuronal implicado. Un análisis sobre neuronas no excitatorias de otras láminas desvelaría si esta dependencia es específica de capa 4. Es importante señalar que las células clasificadas aquí como neuronas no excitatorias forman un grupo heterogéneo compuesto por diferentes tipos neuronales, lo que no permite descartar la existencia de regulación lateral mediada por astrocitos únicamente entre ciertos tipos de neuronas no excitatorias. Pese a que un análisis en profundidad de esta hipótesis es fundamental para esclarecer la dependencia del tipo neuronal implicado en el fenómeno, el hecho de que la regulación lateral no se produzca entre cualquier tipo de neuronas no excitatorias en capa 4 indica el grado de flexibilidad de la señalización por astrocitos en la corteza. La complejidad de la comunicación bidireccional astrocito-neurona, sumada a la variedad de interconexiones estrictamente neuronales en el marco de los microcircuitos corticales, da una idea de las posibilidades de procesamiento de información en la neocorteza.

Por otro lado, el paradigma de estimulación neuronal escogido para inducir la liberación de endocannabinoides (despolarización neuronal o generación de trenes de potenciales de acción), permitió evocar la modulación de la transmisión sináptica mediada por astrocitos sólo en un

subconjunto de las neuronas registradas (alrededor del 40%). Las condiciones experimentales pueden ser la causa de por qué la regulación lateral no pudo ser observada en el 100% de los experimentos. Igualmente, la depresión homoneuronal sólo fue observada en un porcentaje similar al fenómeno mediado por los astrocitos (alrededor de un 40% de los casos). El hecho de que un el porcentaje de neuronas piramidales con depresión homoneuronal y neuronas piramidales que no mostraron ningún efecto sea similar (88.8% y 76.5%, respectivamente), sugiere que la razón por la que el fenómeno no aparece en el 100% de los casos no está relacionado con la frecuencia de disparo y, por lo tanto, no depende del tipo de neurona piramidal registrado. Por el contrario no puede descartarse que en nuestras condiciones la liberación de endocannabinoides responsable de la iniciación del efecto modulador no se produjese en todos los casos o que el total de sinapsis corticales glutamatérgicas expresen receptores CB1 funcionales. Respecto al fenómeno de modulación lateral, es posible que en algunos casos el conjunto de sinapsis registradas no estuviesen asociadas a elementos astrogliales, si bien el abordaje experimental empleado no permite atribuir esta limitación a bases funcionales o, por el contrario, propiedades estructurales. No obstante, es remarcable que diferentes trabajos hayan relacionado ambas características con la conectividad entre elementos neuronales y astrogliales. Por un lado, el trabajo publicado en 1999 por Ventura y Harris propone que en el hipocampo solamente el 40% de las sinapsis excitatorias está rodeada por procesos astrocitarios (Ventura & Harris, 1999). Por otra parte, estudios electrofisiológicos indican que tanto en el hipocampo como en el estriado dorsolateral sólo alrededor de un 40% de las sinapsis presentan alguna forma de modulación mediada por astrocitos (Navarrate & Araque, 2010; Martín *et al.*, 2015). Estos resultados coinciden con los mostrados en nuestro trabajo y permiten sugerir que la liberación de gliotransmisores no es un fenómeno difusión, si no que parece estar regulados de manera muy precisa en lo que podrían ser conexiones punto a punto con elementos neuronales determinados.

En vista de la información presentada en este estudio podemos afirmar que los astrocitos son elementos integrales de las columnas corticales, regulando la transmisión sináptica de un modo específico y participando por tanto en el procesamiento de información. El hecho de que las propiedades cognitivas atribuidas a la neocorteza dependan de las relaciones funcionales entre los elementos que componen sus unidades básicas de procesamiento, permite asumir que la participación de los astrocitos en la regulación de estos subcircuitos puede tener importantes implicaciones funcionales en la ejecución de tareas cognitivas de alto nivel.

VI. CONCLUSIONES

1. La liberación de endocannabinoides por neuronas piramidales pertenecientes a la capa 5 genera una depresión de la transmisión sináptica homoneuronal en la corteza somatosensorial primaria.

2. La liberación de endocannabinoides por neuronas piramidales pertenecientes a la capa 5 genera una depresión de la transmisión sináptica heteroneuronal en la corteza somatosensorial primaria.

3. Tanto la depresión homoneuronal como la depresión heteroneuronal pueden ser inducidas por potenciales de acción y se relacionan con el nivel de activación neuronal.

4. Tanto la depresión homoneuronal como la depresión heteroneuronal requieren la liberación del endocannabinoide 2-AG por neuronas piramidales pertenecientes a la capa 5 de la corteza somatosensorial.

5. La activación de los astrocitos mediante herramientas farmacológicas y químico-genéticas genera depresión de la transmisión sináptica en neuronas piramidales pertenecientes a la capa 5 de la corteza somatosensorial.

6. La elevación en los niveles de calcio intracelular en los astrocitos mediada por la activación de receptores CB1 y la liberación de ATP/adenosina es necesaria para inducir la depresión heteroneuronal.

7. La depresión heteroneuronal mediada por astrocitos requiere la activación de receptores A1.
8. La liberación de endocannabinoides por neuronas excitatorias pertenecientes a las capas 2/3, 4 y 5 genera elevaciones de calcio en los astrocitos localizados en su misma capa y columna.
9. La liberación de endocannabinoides por neuronas excitatorias pertenecientes a las capas 4 y 5 genera elevaciones de calcio en los astrocitos localizados en la capa 2/3 de su misma columna.
10. La liberación de endocannabinoides por neuronas excitatorias pertenecientes a la capa 2/3 no genera aumentos de calcio en los astrocitos situados en las capas 4 y 5.
11. La liberación de endocannabinoides por neuronas no excitatorias pertenecientes a la capa 4 genera elevaciones de calcio en los astrocitos localizados en su misma capa.
12. La liberación de endocannabinoides por neuronas excitatorias pertenecientes a las capas 2/3, 4 y 5 genera depresión de la transmisión sináptica heteroneuronal en neuronas excitatorias de su misma capa solo en su misma columna.
13. La depresión heteroneuronal generada entre neuronas excitatorias pertenecientes a las capas 2/3 y 4 depende de la activación de receptores A1.

14. La liberación de endocannabinoides por neuronas excitatorias pertenecientes a las capas 4 y 5 genera depresión de la transmisión sináptica heteroneuronal en neuronas piramidales pertenecientes a la capa 2/3.

15. La liberación de endocannabinoides por neuronas piramidales pertenecientes a la capa 2/3 no genera depresión de la transmisión sináptica heteroneuronal en neuronas excitatorias pertenecientes a las capas 4 y 5.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Alger, B.E. Retrograde signaling in the regulation of synaptic transmission: focus on endocannabinoids. *Prog. Neurobiol.* **68**, 247-286 (2002).
- Andersson, M., Blomstrand, F., Hanse, E. Astrocytes play a critical role in transient heterosynaptic depression in the rat hippocampal CA1 region. *J. Physiol.* **585**, 843-852 (2007).
- Araque, A., Martin, E.D., Perea, G., Arellano, J.I. & Buno, W. Synaptically released acetylcholine evokes Ca²⁺ elevations in astrocytes in hippocampal slices. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* **22**, 2443- 2450 (2002).
- Araque, A., Carmignoto, G., Haydon, P.G., Oliet, S.H., Robitaille, R. & Volterra, A. Gliotransmitters travel in time and space. *Neuron.* **81**. 728-739 (2014).
- Benedetti, B., Matyash, V. & Kettenmann, H. Astrocytes control GABAergic inhibition of neurons in the mouse barrel cortex. *J. Physiol.* **589**, 1159-1172 (2011).
- Bosier, B., Bellocchio, L., Metna-Laurent, M., Soria-Gomez, E., Matias, I., Hebert-Chatelain, E., Cannich, A., Maitre, M., Leste-Lasserre, T., Cardinal, P., Mendizabal-Zubiaga, J., Canduela, M.J., Reguero, L., Hermans, E., Grandes, P., Cota, D. & Marsicano, G. Astroglial CB1 cannabinoid receptors regulate leptin signaling in mouse brain astrocytes. *Mol Metab.* **2**, 393-404 (2013).
- Carlsen, E.M. & Perrier, J.F. Purines released from astrocytes inhibit excitatory synaptic transmission in the ventral horn of the spinal cord. *Front Neural Circuits.* **8**, (2014).

- Chevaleyre, V. & Castillo, P.E. Heterosynaptic LTD of hippocampal GABAergic synapses: a novel role of endocannabinoids in regulating excitability.
- Chevaleyre, V. & Castillo, P.E. Endocannabinoid-mediated metaplasticity in the hippocampus. *Neuron* **43**, 871-881 (2004).
- Chevaleyre, V., Takahashi, K.A. & Castillo, P.E. Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity in the CNS. *Annu Rev Neurosci.* **29**, 37-76 (2006).
- Covelo, A. & Araque, A. Lateral regulation of synaptic transmission by astrocytes. *Neuroscience.* (2015).
- Defelipe, J., Markram, H. & Rockland, K.S. The neocortical column. *Front Neuroanat.* **6**, 22 (2012).
- Di Castro, M.A., Chuquet, J., Liaudet, N., Bhaukaurally, K., Santello, M., Bouvier, D., Tiret, P., Volterra, A. Local Ca²⁺ detection and modulation of synaptic release by astrocytes. *Nat. Neurosci.* **14**, 1276-1284 (2011).
- Fortin, D.A. & Levine, E.S. Differential effects of endocannabinoids on glutamatergic and GABAergic inputs to layer 5 pyramidal neurons. *Cereb. Cortex* **17**, 163-174 (2007).
- Gómez-Gonzalo, M., Losi, G., Chiavegato, A., Zonta, M., Cammarota, M., Brondi, M., Vetri, F., Uva, L., Pozzan, T., de Curtis, M., Ratto, G.M. & Carmignoto, G. . An excitatory loop with astrocytes contributes to drive neurons to seizure threshold. *PLoS Biol.* **8**, (2010).
- Gomez-Gonzalo, M., Navarrete, M., Perea, G., Covelo, A., Martín-Fernández, M., Shigemoto, R., Luján, R. & Araque, A. Endocannabinoids Induce Lateral Long-Term Potentiation of

Transmitter Release by Stimulation of Gliotransmission. *Cereb. Cortex.* (2014).

Han, J., Kesner, P., Metna-Laurent, M., Duan, T., Xu, L., Georges, F., Koehl, M., Abrous, D.N., Mendizabal-Zubiaga, J., Grandes, P., Liu, Q., Bai, G., Wang, W., Xiong, L., Ren, W., Marsicano, G. & Marsicano, G. Acute cannabinoids impair working memory through astroglial CB1 receptor modulation of hippocampal LTD. *Cell.* **148**, 1039-50 (2012).

Harris, K.D, & Shepherd, G.M. The neocortical circuit: themes and variations. *Nat Neurosci.* **18**, 170-181 (2015).

Hermann, G.E., Van Meter, M.J., Rood, J.C. & Rogers, R.C. et al. Proteinase-activated receptors in the nucleus of the solitary tract: evidence for glial-neural interactions in autonomic control of the stomach. *J. Neurosci.* **29**, 9292-9300 (2009).

Hirrlinger, P.G., Scheller, A., Braun, C., Hirrlinger, J., and Kirchhoff, F. Temporal control of gene recombination in astrocytes by transgenic expression of the tamoxifen-inducible DNA recombinase variant CreERT2. *Glia* **54**, 11–20 (2006).

Krieger, P., Kuner, T., and Sakman, B. Synaptic connections between layer 5B pyramidal neurons in mouse somatosensory cortex are independent of apical dendritic building. *J. Neurosci.* **27**, 11473-11482. (2007).

Lalo, U., Palygin, O., Rasooli-Nejad, S., Andrew, J., Haydon, P.G. & Pankratov, Y. Exocytosis of ATP from astrocytes modulates phasic and tonic inhibition in the neocortex. *PLoS Biol.* **12**, (2014).

- Lee, C.J. et al. Astrocytic control of synaptic NMDA receptors. *J. Physiol.* **581**, 1057-1081 (2007).
- Li, X., Zima, A.V., Sheikh, F., Blatter, L.A. & Chen, J. Endothelin-1-induced arrhythmogenic Ca²⁺ signaling is abolished in atrial myocytes of inositol-1,4,5-trisphosphate (IP₃)-receptor type 2-deficient mice. *Circulation research* **96**, 1274-1281 (2005).
- Lorente de No, R. Studies on the structure of the cerebral cortex I. The area entorhinalis. *J. Psychol. Neurol.* **45**, 381-438 (1933).
- Lorente de No, R. "Architectonics and structure of the cerebral cortex", in *Physiology of the Nervous System*, ed. J. F. Fulton (New York: Oxford University Press), 291-330 (1938).
- Mountcastle, V.B. The columnar organization of the neocortex. *Brain.* **120**, 701-722 (1997).
- Mountcastle, V.B. *Perceptual Neuroscience. The Cerebral Cortex.* Cambridge: Harvard University Press. (1998).
- Martín, E.D. Fernández, M. Perea, G. Pascual, O. Haydon, PG. Araque, A. Ceña, V. Adenosine released by astrocytes contributes to hypoxia-induced modulation of synaptic transmission. *Glia.* **55**, 36-45 (2007).
- Martín, R. Bajo-Grañeras, R. Moratalla, R. Perea, G. Araque, A. Circuit-specific signaling in astrocyte-neuron networks in basal ganglia pathways. *Science.* **14**, 730-34 (2015).
- Markram, H. Fixing the location and dimensions of functional neocortical columns. *HFSP J.* **2**, 132-13 (2008).

Markram H, Muller E, Ramaswamy S, Reimann MW, Abdellah M, Sanchez CA, Ailamaki A, Alonso-Nanclares L, Antille N, Arsever S, Kahou GA, Berger TK, Bilgili A, Buncic N, Chalimourda A, Chindemi G, Courcol JD, Delalandre F, Delattre V, Druckmann S, Dumusc R, Dynes J, Eilemann S, Gal E, Gevaert ME, Ghobril JP, Gidon A, Graham JW, Gupta A, Haenel V, Hay E, Heinis T, Hernando JB, Hines M, Kanari L, Keller D, Kenyon J, Khazen G, Kim Y, King JG, Kisvarday Z, Kumbhar P, Lasserre S, Le Bé JV, Magalhães BR Merchán-Pérez A, Meystre J, Morrice BR, Muller J, Muñoz-Céspedes A, Muralidhar S, Muthurasa K, Nachbaur D, Newton TH, Nolte M, Ovcharenko A, Palacios J, Pastor L, Perin R, Ranjan R, Riachi I, Rodríguez JR, Riquelme JL, Rössert C, Sfyarakis K, Shi Y, Shillcock JC, Silberberg G, Silva R, Tauheed F, Telefont M, Toledo-Rodriguez M, Tränkler T, Van Geit W, Díaz JV, Walker R, Wang Y, Zaninetta SM, DeFelipe J, Hill SL, Segev I, Schürmann F. Reconstruction and Simulation of Neocortical Microcircuitry. *Cell*. **163**, 456-92 (2015).

Min, R. & Nevian, T. Astrocyte signaling controls spike timing-dependent depression at neocortical synapses. *Nat Neurosci*. **15**, 746-753 (2012).

Navarrete, M. & Araque, A. Endocannabinoids potentiate synaptic transmission through stimulation of astrocytes. *Neuron* **68**, 113-126 (2010).

Navarrete, M. & Araque, A. Endocannabinoids mediate neuron-astrocyte communication. *Neuron* **57**, 883-893 (2008).

Navarrete, M., Perea, G., Fernandez de Sevilla, D., Gómez-Gonzalo, M., Núñez, A., Martín E.D. & Araque, A. Astrocytes mediate in vivo cholinergic-induced synaptic plasticity. *PLoS Biol*. **12**, (2012).

Nicole, O., Goldshmidt, A., Hamill, C.E., Sorensen, S.D., Sastre, A., Lyuboslavsky, P., Hepler, J.R., McKeon, R.J. 6 Traynelis, S.F.

Activation of protease-activated receptor-1 triggers astrogliosis after brain injury. *J. Neurosci.* **25**, 4319-4329 (2005).

Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., Kerr, J.N. & Helmchen, F. Sulforhodamine 101 as a specific marker of astroglia in the neocortex in vivo. *Nature methods* **1**, 31-37 (2004).

Ohno-Shosaku, T., Maejima, T. & Kano, M. Endogenous cannabinoids mediate retrograde signals from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals. *Neuron* **29**, 729-738 (2001).

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. Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks. *Science* **310**, 113-116 (2005).

Parri, R. A heterogeneity of responses to synaptic stimulation in astrocytes in thalamic astrocytes. *Society for Neuroscience Abstracts.* **30**, 976.4. (2004).

Paxinos, G., Franklin, K. Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates (Elsevier B.V., 2012).

Perea, G., & Araque, A. Properties of synaptically evoked astrocyte calcium signal reveal synaptic information processing by astrocytes. *J. Neurosci.* **25**, 2192-2203. (2005).

Perea, G., Navarrete, M. & Araque, A. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci.* **32**, 421-431 (2009).

- Perez-Alvarez, A., Navarrete, M., Covelo, A., Martin, E.D. & Araque, A. Structural and functional plasticity of astrocyte processes and dendritic spine interactions. *J Neurosci.* **34**, 12738-12744 (2014).
- Petravicz, J., Fiacco, T.A. & McCarthy, K.D. Loss of IP3 receptor-dependent Ca²⁺ increases in hippocampal astrocytes does not affect baseline CA1 pyramidal neuron synaptic activity. *J. Neurosci.* **28**, 4967-4973 (2008).
- Piomelli, D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci.* **4**, 873-884 (2003).
- Serrano, A., Haddjeri, N., Lacaille, J.C. & Robitaille, R. GABAergic network activation of glial cells underlies hippocampal heterosynaptic depression. *J.Neurosci.* **26**, 5370-5382 (2006).
- Schipke, C.G., Haas, B. & Kettenman, H. Astrocytes discriminate and selectively respond to the activity of a subpopulation of neurons within the barrel cortex. *Cereb Cortex* **18**, 2450-2459 (2008).
- Shigetomi, E. Bowser, D.N. Sofroniew, M.V. & Khakh, B.S. et al. Two forms of astrocyte calcium excitability have distinct effects on NMDA receptor-mediated slow inward currents in pyramidal neurons. *J. Neurosci.* **28**, 6659-6663 (2008).
- Schubert, D., Kötter, R. Zilles, K. Luhmann, H.J. & Staiger, J.F. Cell type-specific circuits of cortical layer IV spiny neurons. *J Neurosci.* **23**, 2961-2970 (2003).
- Schummers, J., Yu, H. & Sur, M. Tuned responses of astrocytes and their influence on hemodynamic signals in the visual cortex. *Science.* **320**, 1638-1643 (2008).

- Staiger JF, Flaggmeyer I, Schubert D, Zilles K, Kötter R & Luhmann HJ. Functional diversity of layer IV spiny neurons in rat somatosensory cortex: quantitative morphology of electrophysiologically characterized and biocytin labeled cells. *Cereb. Cortex.* **14**, 690-701 (2004).
- Takata, N. et al. Astrocyte calcium signaling transforms cholinergic modulation to cortical plasticity in vivo. *J Neurosci.* **31**, 18155-18165 (2011).
- Trettel, J. & Levine, E.S. Cannabinoids depress inhibitory synaptic inputs received by layer 2/3 pyramidal neurons of the neocortex. *J. Neurophysiol.* **88**, 534-539 (2002).
- Volterra, A., Liaudet, N. & Savtchouk, I. Astrocyte Ca²⁺ signalling: an unexpected complexity. *Nat Rev Neurosci.* **15**, 327-335 (2014).
- Wang, X., Lou, N., Xu, Q., Tian, G.F., Peng, W.G., Han, X., Kang, J., Takano, T. & Nedergaard, M. Astrocytic Ca²⁺ signaling evoked by sensory stimulation in vivo. *Nat. Neurosci.* **9**, 816-823 (2006).
- Wang, F., Smith, N.H., Xu, Q., Goldman, S., Peng, W., Huang, J.H., Takano, T. & Nedergaard, M. Photolysis of caged Ca²⁺ but not receptor-mediated Ca²⁺ signaling triggers astrocytic glutamate release. *J Neurosci.* **33**, 17404-17412 (2013).
- Wilson, R.I. & Nicoll, R.A. Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature* **410**, 588-592 (2001).
- Zhang, J.M., Wang, H.K., Ye, C.Q., Ge, W., Chen, Y., Jiang, Z.L., Wu, C.P., Poo, M.M. & Duan, S. ATP released by astrocytes mediates glutamatergic activity-dependent heterosynaptic suppression. *Neuron* **40**, 971-982 (2003).

Zimmer, A., Zimmer, A.M., Hohmann, A.G., Herkenham, M. & Bonner, T.I.
Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid
CB1 receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**, 5780-
5785 (1999).

