

TESIS DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS - PEDECIBA  
OPCIÓN NEUROCIENCIAS

---

# Interacción neuro-glial en la plasticidad sináptica homeostática: papel de los canales de conexinas y panexinas

---

Dra. ANDREA CAIRUS ROSSI

---

LABORATORIO DE COMUNICACIÓN SINÁPTICA  
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA  
FACULTAD DE MEDICINA – UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

Directora de tesis: Dra. Nathalia Vitreira  
Co-directora de tesis: Dra. Verónica Abudara

MONTEVIDEO, URUGUAY

2018

## AGRADECIMIENTOS

A Nathalia y Vero, trabajar con ustedes ha sido un placer, son las mejores orientadoras que hubiera podido imaginado tener.

A Beto y Marina, por ayudarme en el día a día del laboratorio con la mejor onda.

A Marce, por estar siempre dispuesta a dar una mano y aconsejarme.

A Natalia, Daniel y los integrantes de Genética de *la isla*, quienes hacen amena la convivencia y los almuerzos en facultad.

A mis compañeros G1 de Fisiología, especialmente a Guille y Juanma por hacerme reír y compartir conmigo desde el comienzo.

A todos los integrantes del laboratorio de Patricia Cassina por compartir generosamente la sala de cultivos.

A Marcela Díaz y Tabaré de los Campos, por el asesoramiento continuo en el microscopio confocal y el procesamiento de imágenes.

A Sandra Mai, por la ayuda con los animales Panx1 KO. A Hugo Peluffo por colaborar con materiales de cultivo. A Paola Contreras por habernos brindado el anti-Cx43.

A los miembros del tribunal, Patricia Cassina, Natalia Lago y Sebastián Curti, por brindar su tiempo y dedicación a la lectura de esta tesis.

Al apoyo institucional recibido de la Comisión Académica de Posgrado, PEDECIBA y Facultad de Medicina, Universidad de la República.

A mis amigas, especialmente a Ceci, Sofi, Vale, Agus y Vani, que me entienden siempre.

A mis padres, por apoyarme en este camino que elegí.

A mi hermana, por soportar mis locuras.

**A todos, ¡mil gracias!**

## TABLA DE CONTENIDO

TABLA DE ABREVIATURAS.....	3
RESUMEN.....	5
INTRODUCCIÓN.....	6
Conceptos generales.....	6
Sinapsis química.....	7
Terminal presináptica.....	7
Hendidura sináptica.....	9
Terminal postsináptica.....	10
Fuerza sináptica.....	12
Plasticidad sináptica.....	12
Plasticidad a corto plazo.....	13
Plasticidad hebbiana.....	14
Plasticidad sináptica homeostática.....	16
Plasticidad homeostática postsináptica.....	18
Plasticidad homeostática presináptica.....	22
Plasticidad homeostática estructural y de la excitabilidad intrínseca.....	26
Interacción entre plasticidad hebbiana y plasticidad homeostática.....	27
Rol de la glía en la modulación sináptica: sinapsis tripartita y multi-partita.....	29
Gliotransmisores.....	31
Conexinas y panexinas.....	33
Expresión de conexinas y panexinas en el SNC.....	33
Redes astrogliales de conexinas.....	35
Propiedades de los conexones y panexones.....	36
Conexones y panexones como vías para la gliotransmisión.....	37
ATP y señalización purinérgica.....	39
HIPÓTESIS.....	41
OBJETIVOS.....	42
Objetivo general.....	42
Objetivos específicos.....	42
MATERIALES Y MÉTODOS.....	43
Animales.....	43
Consideraciones éticas.....	43
Cultivos celulares.....	43
Farmacología.....	46
Inmunocitoquímica.....	47
Evaluación de la función presináptica.....	47
Captación de Bromuro de Etidio.....	48
Adquisición y análisis de imágenes.....	48
Análisis estadístico.....	50
RESULTADOS.....	52
DISCUSIÓN.....	73
CONCLUSIONES.....	86
PERSPECTIVAS.....	87
ANEXOS.....	88
REFERENCIAS.....	89

**TABLA DE ABREVIATURAS**

<b>AMPAR</b>	Receptor del ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
<b>AZ</b>	Zona activa
<b>BrEt</b>	Bromuro de Etidio
<b>CBX</b>	Carbenoxolona
<b>Cx</b>	Conexina
<b>DIC</b>	Contraste de interferencia diferencial
<b>DIV</b>	Días <i>in vitro</i>
<b>EPSP</b>	Potencial postsináptico excitador
<b>ECM</b>	Matrix extracelular
<b>FBS</b>	Suero fetal bovino
<b>GFAP</b>	Proteína glial fibrilar ácida
<b>GJs</b>	<i>Gap Junctions</i> (uniones en hendidura)
<b>HCs</b>	Hemicanales
<b>IPSP</b>	Potencial postsináptico inhibitorio
<b>KO</b>	<i>Knock-out</i>
<b>LTP</b>	Potenciación a largo plazo
<b>LTD</b>	Depresión a largo plazo
<b>MAP-2</b>	Proteína asociada de microtúbulos 2
<b>mEPSCs</b>	Corrientes postsinápticas excitadoras en miniatura (o “minis”)
<b>NMDAR</b>	Receptor de N-metil-D-aspartato
<b>PA</b>	Potencial de acción
<b>Panx</b>	Panexina
<b>PBD</b>	Probenecid

---

<b>PBS</b>	Búfer fosfato salino
<b><i>pr</i></b>	Probabilidad de liberación del neurotransmisor
<b>PSD</b>	Densidad postsináptica
<b>PSH</b>	Plasticidad sináptica homeostática
<b>PTP</b>	Potenciación post-tetánica
<b>P2X<sub>7</sub>R</b>	Receptor purinérgico tipo P2X <sub>7</sub>
<b>RRP</b>	<i>Ready releasable pool</i>
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral- $\alpha$
<b>TTX</b>	Tetrodotoxina
<b>VGCCs</b>	Canales de Ca <sup>2+</sup> voltaje-dependientes
<b>vGlut-1</b>	Transportador vesicular de glutamato 1
<b>VS</b>	Vesículas sinápticas
<b>WT</b>	<i>Wild-type</i>

## RESUMEN

La plasticidad sináptica homeostática (PSH) es un tipo de plasticidad sináptica que se caracteriza por promover la estabilidad de los circuitos neuronales mediante ajustes compensatorios de la fuerza sináptica. Los mecanismos pre y postsinápticos involucrados en la PSH incluyen cambios en la probabilidad de liberación del neurotransmisor y en la abundancia de receptores postsinápticos, respectivamente. Las células gliales se erigen como socios activos de las neuronas pre y postsinápticas durante la transmisión de información en la denominada “sinapsis tripartita”. En particular, los astrocitos son capaces de sensor la actividad sináptica y modularla a través de la liberación de gliotransmisores (glutamato, ATP, D-serina, TNF- $\alpha$ ). Sin embargo, hasta el momento no se conocen los mecanismos moleculares que median el papel de las células gliales en la regulación homeostática de la función presináptica. En este sentido, los objetivos de esta investigación incluyen determinar la relevancia de las células gliales en la PSH presináptica e investigar si los canales gliales formados por hemicanales de conexina 43 (HCsCx43 o conexones) y/o panexina 1 (canales Panx1 o panexones), vías para la liberación de gliotransmisores crecientemente involucradas en la modulación de las interacciones neuro-gliales, están implicados en esta forma de plasticidad. Se utilizaron cultivos disociados de hipocampo de murinos neonatos y se estudiaron los cambios en la función presináptica mediante el análisis de la abundancia del transportador vesicular de glutamato 1 (vGlut-1) sináptico en diferentes condiciones experimentales. Para investigar la implicancia de los canales de Cx43 y Panx1 se utilizaron inhibidores específicos y animales Panx1 KO. Asimismo, se determinaron variaciones en los niveles de Cx43 y Panx1 mediante inmunofluorescencia y en la expresión funcional de los canales mediante la técnica de captación de Bromuro de Etidio. Los resultados sugieren que: 1) las células gliales son esenciales para la inducción y/o mantenimiento de la PSH presináptica inducida por inactividad crónica del circuito, 2) factores solubles liberados por estas células median este proceso, 3) los HCsCx43 y los canales de Panx1 son indispensables para desencadenar el ajuste homeostático de la función presináptica. En conjunto, estos resultados resaltan un rol protagónico de la interacción neurona-glía en la regulación homeostática de la función presináptica, destacando la participación de canales de Cx43 y Panx1 en este proceso.

**Palabras clave:** *Plasticidad sináptica homeostática, Gliotransmisión, Cx43, Panx1*

## INTRODUCCIÓN

### Conceptos generales

El sistema nervioso central (SNC) es un tejido altamente complejo, que consta de 86,1 mil millones de neuronas en promedio en el cerebro y la médula espinal humanos, y presenta un número similar de células gliales (Azevedo et al., 2009; Herculano-Houzel, 2014). Se requieren mecanismos eficientes para hacer posible la comunicación entre este gran número de elementos.

Las sinapsis, término introducido por Sherrington en 1897, son uniones intercelulares específicas entre neuronas o entre neuronas y otras células excitables, donde las señales se propagan desde una célula a la otra con gran precisión y velocidad (Foster and Sherrington, 1897; De Camilli et al., 2003). Así, estos contactos permiten formar circuitos que median las operaciones específicas funcionales de las diferentes regiones del cerebro (Shepherd, 2004). Se ha estimado que existen 164 billones de sinapsis sólo en la neocorteza de un humano adulto, mientras que en todo el SNC podría haber entre varios cientos de billones a más de mil billones de sinapsis (Tang et al., 2001; Silbereis et al., 2016).

Se reconocen dos modalidades de transmisión sináptica, química y eléctrica, que coexisten en la mayoría de los organismos y estructuras nerviosas (Pereda, 2014). La transmisión eléctrica posee como sustrato morfológico las uniones en hendidura o *Gap Junctions* (GJs), a nivel de estas uniones existen canales intercelulares que conectan el interior de dos células adyacentes, permitiendo el pasaje bidireccional de corriente eléctrica y pequeñas moléculas lo que se conoce respectivamente como acoplamiento eléctrico y molecular (Bennett and Zukin, 2004). Las GJs están formadas por el ensamblaje de dos hemicanales de conexina (Cx) hexaméricos, cada uno proveniente de una célula adyacente. La conexina 36 (Cx36) es la conexina neuronal más abundante en el cerebro de los mamíferos si bien también se expresan otras (Cx45, Cx50, Cx30.2 y Cx31.1) (Pereda, 2014). Las sinapsis eléctricas permiten la propagación de la señal eléctrica de forma bidireccional y juegan un rol en la sincronización de la actividad neuronal (Bennett and Zukin, 2004).

Por otra parte, la transmisión química depende de la llegada de un potencial de acción (PA) a la célula presináptica, que produce la liberación de un intermediario químico, denominado neurotransmisor, a la hendidura sináptica. Este mensajero actúa en receptores postsinápticos, provocando cambios en el potencial de membrana

postsináptico, cascadas bioquímicas de señalización y cambios en la expresión de genes.

Actualmente se reconoce que las células gliales son componentes esenciales de las sinapsis químicas, y la regulación de la transmisión sináptica resulta de la actividad coordinada entre neuronas y células gliales. Dentro de las células gliales se distinguen tres tipos en el SNC: los oligodendrocitos, responsables de la mielinización, son los más abundantes (45-75%), seguido por los astrocitos (19-40%) y la microglía (10% o menos) (Pelvig et al., 2008; von Bartheld et al., 2016). Particularmente, los astrocitos extienden sus procesos a las cercanías de las sinapsis y son capaces de detectar e integrar la actividad sináptica local. Asimismo, los astrocitos están acoplados mediante GJs, principalmente formadas por conexina 43 (Cx43) y conexina 30 (Cx30), pudiendo actuar de manera coordinada para modular la transmisión de un conjunto de sinapsis (Pannasch et al., 2011).

### **Sinapsis química**

Este trabajo se enfoca en las sinapsis químicas. Éstas presentan morfología y diámetro variable (entre 300-800 nm), pero comparten características estructurales que incluyen una terminal presináptica, la hendidura sináptica y la terminal postsináptica, que serán detalladas a continuación (*Figura 1A, 2A*) (Choquet and Triller, 2013).

#### **Terminal presináptica**

La terminal presináptica es un sector especializado del axón de la célula presináptica denominado botón presináptico, donde se identifican las vesículas sinápticas (VS) conteniendo el neurotransmisor. La región de la terminal presináptica que se enfrenta a la hendidura sináptica contiene material electrodensito y se denomina zona activa (AZ). En las sinapsis del SNC, la AZ es una estructura con forma de disco de 0,2-0,5  $\mu$ m de diámetro (Südhof, 2012). La liberación del neurotransmisor está mediada por la exocitosis de las VS en la AZ (*Figura 1B*).

El conjunto de VS que están en contacto directo con la membrana presináptica y prontas para la fusión en la AZ se denomina *ready releasable pool* (RRP). Además del RRP, existen otros *pools* de VS en la terminal presináptica. Rizzoli y Betz plantean la existencia de tres *pools*, que incluye el RRP como aquel inmediatamente disponible para la liberación, un *pool de reciclaje* que repone el RRP durante la estimulación

fisiológica y un *pool de reserva* que se libera únicamente durante la estimulación intensa (a menudo estímulos no-fisiológicos) (Rizzoli and Betz, 2005). En las sinapsis centrales, este último *pool* de VS ha sido denominado por otros autores como *pool de reposo* (Alabi and Tsien, 2012).

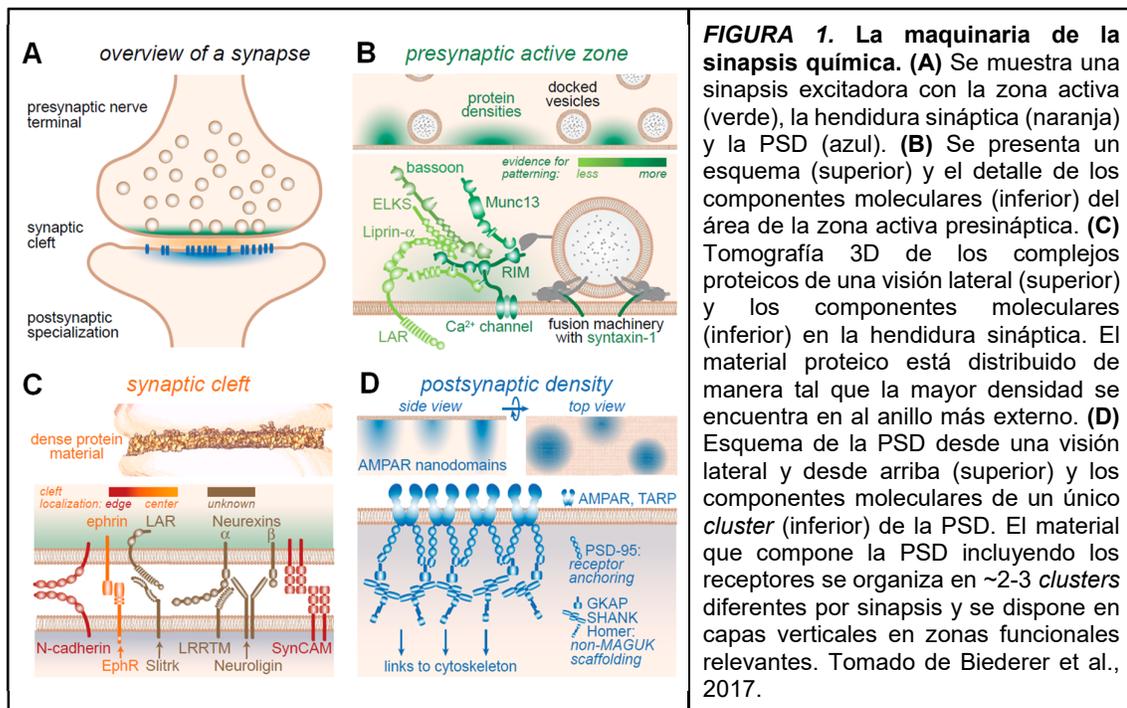
En la AZ se destacan cinco proteínas evolutivamente conservadas: RIM (*Rab3-interacting molecules*), Munc13, RIM-BP,  $\alpha$ -liprina y ELKS. Como se observa en la *Figura 1B*, estas proteínas forman un complejo proteico que ancla y prepara las VS, recluta canales de  $\text{Ca}^{2+}$  voltaje-dependientes (VGCCs), y une las VS y los VGCCs a moléculas de adhesión sinápticas (Südhof, 2012). En vertebrados, dos proteínas más se asocian a la AZ: piccolo y bassoon, cuya función sería guiar a las VS hacia la AZ (*Figura 2B*). Además, están presentes las proteínas SNARE (sintaxina-1 y SNAP-25) y SM (*Sec1/Munc18-like proteins*), componentes de la maquinaria de fusión de las VS para la exocitosis. Los VGCCs que se encuentran en la AZ son principalmente de tipo P/Q (Cav2.1) y tipo N (Cav2.2) (Südhof, 2012). También se encuentran otras proteínas de membrana, como los receptores de neurotransmisor presinápticos y moléculas de adhesión celular trans-sinápticas.

La llegada de un PA a la terminal presináptica produce la liberación de neurotransmisor desde las VS al desencadenar la apertura de VGCCs. Al entrar a la terminal presináptica, el  $\text{Ca}^{2+}$  se une a la sinaptotagmina 1 (una proteína de las VS considerada el sensor de  $\text{Ca}^{2+}$ ), que desencadena la unión de ésta a la maquinaria compuesta por las proteínas SNARE y SM que median la formación de un poro de fusión entre las VS y la membrana presináptica, permitiendo el pasaje del neurotransmisor a la hendidura sináptica, donde se une a receptores postsinápticos (Südhof, 2013). Los VGCCs se localizan en el mismo microdominio que las VS dentro de la AZ, lo que es importante para permitir el rápido aumento (y posterior disminución rápida) de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  durante la transmisión sináptica (Lisman et al., 2007).

Las VS participan en la función presináptica a través de un ciclo que les permite ser utilizadas repetidamente durante la actividad sostenida y mantener la integridad estructural y funcional de la terminal presináptica. Luego de la exocitosis las VS experimentan endocitosis y se reciclan, cargándose con neurotransmisor para un nuevo ciclo. Se han propuesto tres vías alternativas para la endocitosis y reciclado de las VS: 1) las VS son reacidificadas y se cargan nuevamente con neurotransmisor sin

desanclarse de la membrana, por tanto permaneciendo en el RRP (*kiss-and-stay*); 2) las VS se desanclan y se reciclan localmente (*kiss-and-run*) para reacidificarse y cargarse con neurotransmisor; 3) las VS se endocitan recubiertas con clatrina, se reacidifican y se recargan con neurotransmisor sea directamente o luego de pasar a través de compartimientos endosomales (Südhof, 2004).

Como se detallará más adelante, la fuerza sináptica se determina, en parte, por la probabilidad de liberación del neurotransmisor (*pr*) en la terminal presináptica, y cambios en los *pools* de VS se relacionan con cambios en la *pr*. Se ha descrito, por ejemplo, que el número de VS en el RRP, así como el tamaño del pool de reciclaje, se correlacionan con la *pr* (Ryan et al., 1997; Murthy et al., 1997, 2001).



## Hendidura sináptica

La hendidura sináptica es un espacio estructuralmente organizado de un ancho de ~20 nm donde es liberado el neurotransmisor. Está enriquecido en moléculas de adhesión asociadas a la membrana pre y postsináptica (Figura 1C), que guían la sinaptogénesis y modulan la maduración sináptica y la neurotransmisión. Estos complejos moleculares no se distribuyen de manera uniforme en la hendidura, incrementándose en una capa central paralela a las membranas y hacia los bordes de la misma (Perez de Arce et al., 2015; Biederer et al., 2017). En la hendidura sináptica

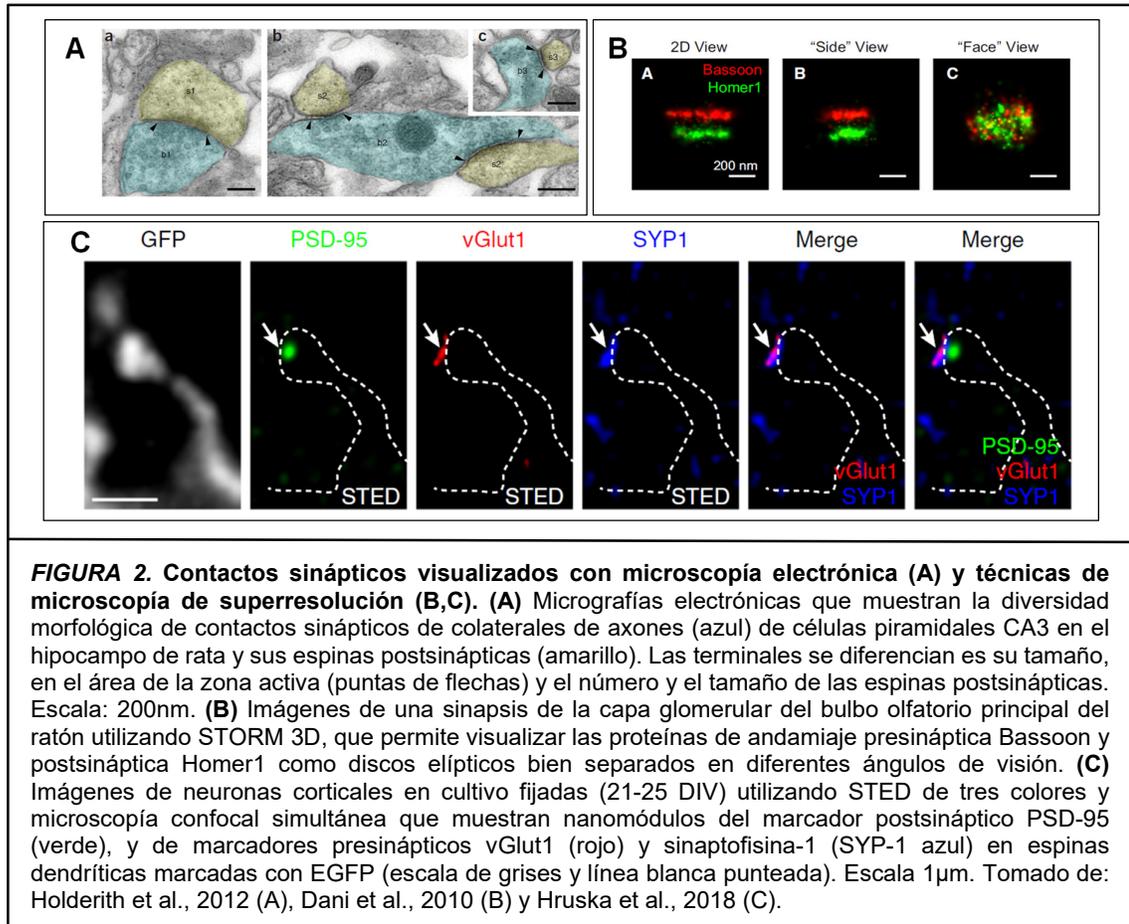
también se encuentran componentes de la matriz extracelular (ECM), que interactúan con moléculas de adhesión, receptores y canales iónicos, y participan en el desarrollo y regeneración del SNC, así como en procesos de plasticidad sináptica (Dityatev and Schachner, 2003).

### **Terminal postsináptica**

El elemento postsináptico es una porción del soma o de las dendritas de la célula postsináptica. En la mayoría de las sinapsis excitadoras del cerebro la terminal postsináptica está formada por las espinas dendríticas, pequeñas protrusiones en la membrana del árbol dendrítico (*Figura 2A, 2C*). Aunque su morfología es muy variada, la mayoría de las espinas poseen un cuello que se extiende no más de 2  $\mu\text{m}$  desde el eje dendrítico y terminan en un pequeño bulbo. Se piensa que las espinas aumentan la conectividad neuronal permitiendo a la dendrita alcanzar un número mayor de axones dentro del mismo espacio.

Se denomina densidad postsináptica (PSD) al complejo macromolecular de señalización anclado en la membrana postsináptica contrapuesta a la AZ. La PSD es particularmente prominente en sinapsis glutamatérgicas excitadoras y es fácilmente detectable por microscopía electrónica como una zona de material electrodensito, debido al alto contenido de proteínas (*Figura 2A*) (Holderith et al., 2012). El contenido de macromoléculas de la PSD incluye receptores, moléculas de andamiaje, kinasas, fosfatasa y componentes del citoesqueleto. En particular se destacan: receptores N-metil-D-aspartato (NMDAR), receptores del ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazol propiónico (AMPA), proteínas de andamiaje como la PSD-95, proteína asociada a sinapsis (SAP) 97, Shank y Homer (*Figuras 1D, 2B, 2C*) (Chen et al., 2005; Dani et al., 2010). Los receptores son altamente dinámicos y continuamente ciclan hacia adentro y afuera de la sinapsis, a través de mecanismos regulados de tráfico exo/endocíticos entre los *pools* intracelular y la superficie de membrana, difusión lateral rápida a lo largo de la membrana e intercambios entre los sitios extra e intra-sinápticos (Choquet and Triller, 2013). La mayoría de estos mecanismos de movilización de los receptores son posibles gracias a la interacción con las proteínas de andamiaje de la PSD. En sinapsis excitadoras, el número de receptores de glutamato de tipo NMDA o AMPA en estado estable varía entre 0 a 200, mientras que el número de proteínas de andamiaje PSD-95 es 200-400, ilustrando el hecho que existe un exceso de sitios de unión para unir más receptores en caso de eventos de

plasticidad (Chen et al., 2005; Choquet and Triller, 2013). Aproximaciones usando técnicas de microscopía de superresolución han establecido que la PSD se organiza en dominios submicrométricos (nanodominios), existiendo 2 o 3 por sinapsis en el hipocampo (*Figura 1D, 2C*) (Choquet and Triller, 2013; Biederer et al., 2017; Hruska et al., 2018).



Como fue mencionado, el neurotransmisor liberado en la hendidura sináptica se une a receptores postsinápticos. El efecto postsináptico puede ser excitador o inhibitor dependiendo de que iones permean los canales operados por el receptor que fue activado. La respuesta será un potencial postsináptico excitador (EPSP) o un potencial postsináptico inhibitor (IPSP) dependiendo si la célula es llevada a un punto por encima o por debajo del umbral de disparo, respectivamente. El retraso sináptico entre la llegada del PA a la terminal presináptica y el comienzo del EPSP es de ~0,6 ms (~1 ms al punto medio del EPSC) (Lisman et al., 2007).

## Fuerza sináptica

La eficacia de la transmisión sináptica, es decir, la fuerza sináptica, puede definirse como la cantidad promedio de corriente o la amplitud del cambio de voltaje producido en la neurona postsináptica por un PA en la neurona presináptica (Murthy, 1998). De manera simplificada, la fuerza sináptica entre dos neuronas depende fundamentalmente de tres factores: el número de contactos sinápticos o de sitios activos de liberación ( $n$ ), la probabilidad de liberación del neurotransmisor en cada sinapsis ( $pr$ ) y el tamaño de la respuesta postsináptica causada por la liberación de neurotransmisor desde una única VS (denominado tamaño quantal,  $q$ ) (Del Castillo and Katz, 1954; Burrone and Murthy, 2003; Branco and Staras, 2009). La  $pr$  es una consecuencia de la naturaleza estocástica inherente de los procesos que llevan a la exocitosis de las VS (Südhof, 2004). Para cada PA, hay una cierta probabilidad de que ocurra la liberación de neurotransmisor, que define la confiabilidad de una sinapsis en transmitir la señal y determina la fuerza sináptica promedio (Del Castillo and Katz, 1954). En las sinapsis del SNC, a diferencia de la unión neuromuscular (NMJ), la  $pr$  es relativamente baja, por ejemplo, en el hipocampo es de 0,3 en promedio, si bien existe gran variabilidad entre los botones sinápticos (Murthy et al., 1997; Dobrunz and Stevens, 1997).

Por tanto, la transmisión sináptica es más eficaz si  $n$ ,  $pr$  o  $q$  aumentan. Generalmente, un aumento de  $n$  o  $pr$  indica un mecanismo presináptico, mientras que un aumento de  $q$  se vincula a un mecanismo postsináptico, como un incremento en el número y/o sensibilidad de los receptores postsinápticos (Bekkers and Stevens, 1990).

## Plasticidad sináptica

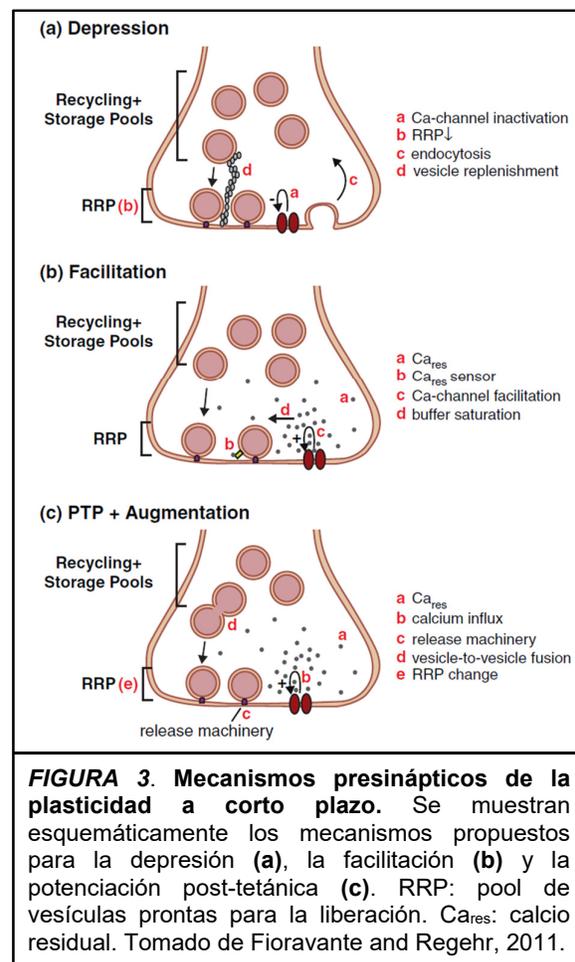
La transmisión sináptica es un proceso dinámico. Para lograr el complejo procesamiento de la información que deben realizar los circuitos neurales es esencial que las sinapsis puedan ser modificadas tanto a nivel estructural como funcional. Cambios en la eficacia de la transmisión sináptica dependientes de la actividad, del desarrollo o del ambiente están relacionados tanto con la composición de las sinapsis como con las propiedades biofísicas de sus elementos individuales (Choquet and Triller, 2013). En este sentido, los procesos de plasticidad sináptica involucran cambios regulados en la fuerza sináptica, y son considerados la base celular de procesos tales como el aprendizaje y memoria.

En el SNC de mamíferos, existen una variedad de procesos donde la duración de los cambios en la eficacia de la conexión puede ser breve o duradera, los cuales llevan a una disminución o potenciación de la fuerza sináptica y dan lugar a diferentes formas de plasticidad sináptica (Zucker and Regehr, 2002; Abbott and Regehr, 2004). En este sentido, los cambios dependientes de actividad en la transmisión sináptica pueden dividirse en:

- 1) plasticidad a corto plazo, ocurre durante milisegundos a minutos y permite a las sinapsis realizar funciones computacionales críticas en los circuitos neuronales;
- 2) plasticidad a largo plazo, involucra cambios que duran horas o más tiempo. Dentro de ésta se encuentran la plasticidad hebbiana y la plasticidad homeostática, que se diferencian en el tiempo que lleva la inducción y la expresión de los cambios, siendo rápidos en la primera y lentos en la segunda.

### Plasticidad a corto plazo

Las sinapsis exhiben varias formas de plasticidad a corto plazo: la *facilitación* se desarrolla cuando dos PAs invaden la terminal presináptica en rápida sucesión; la *potenciación post-tetánica (PTP)* e *incremento* se deben a la descarga de alta frecuencia de PAs presinápticos (estimulación tetánica). Estas formas de plasticidad llevan a una potenciación de la eficacia sináptica que dura cientos de milisegundos en el caso de la facilitación y decenas de segundos a minutos en la PTP (Regehr, 2012). Generalmente son atribuidas a una entrada masiva de  $\text{Ca}^{2+}$  a la terminal presináptica, generando lo que se conoce como  $\text{Ca}^{2+}$  residual -exceso de  $\text{Ca}^{2+}$  en la terminal presináptica debido a la saturación transitoria de los sistemas de tamponamiento específicos- que



promueve un incremento de la *pr* (Zucker and Regehr, 2002). Otros mecanismos propuestos que subyacen a estas formas de plasticidad incluyen: la facilitación de canales de  $Ca^{2+}$ , el aumento en la *pr* a partir una mayor entrada de  $Ca^{2+}$  y el incremento del tamaño del RRP, entre otros (*Figura 3b, 3c*) (Fioravante and Regehr, 2011). Por otra parte, la *depresión* a corto plazo suprime la liberación de neurotransmisor durante cientos de milisegundos a decenas de segundos. La depleción de VS, así como la inactivación de los sitios de liberación como de los canales de  $Ca^{2+}$ , contribuyen a esta forma de plasticidad (*Figura 3a*) (Fioravante and Regehr, 2011). La facilitación y la depresión coexisten en las sinapsis, donde su peso relativo depende en gran parte de la *pr* inicial: una alta *pr* inicial favorece la depresión, mientras que una baja *pr* favorece la facilitación (Dobrunz and Stevens, 1997; Abbott and Regehr, 2004).

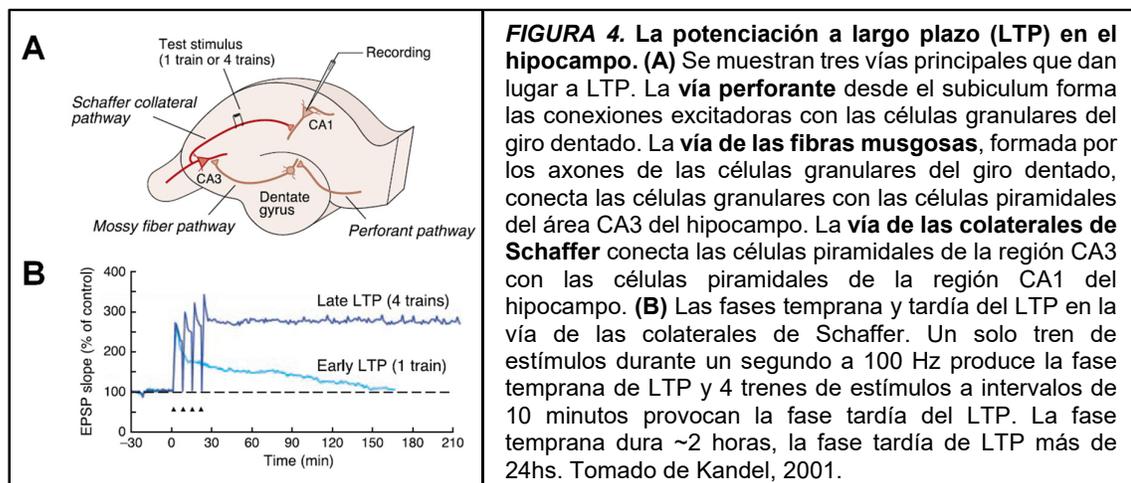
### **Plasticidad hebbiana**

Ya en 1949, Donald Hebb propuso un mecanismo basado en la plasticidad sináptica como sustrato para la memoria. Con el ejemplo de dos células conectadas por sinapsis excitadoras, si la activación de una célula lleva a la activación de una segunda célula, la conexión entre estas dos células se refuerza (Hebb, 1949). Este postulado fue posteriormente confirmado experimentalmente en diferentes modelos y se ha denominado plasticidad hebbiana (Malinow, 1991; Poo et al., 2016).

La plasticidad hebbiana involucra cambios de larga duración en la eficacia de la transmisión sináptica dependientes de la experiencia, y se conocen los mecanismos moleculares necesarios para provocar el cambio (inducción), seguido de mecanismos para la expresión (durante horas) y el mantenimiento (días) (Lüscher and Malenka, 2012). La potenciación a largo plazo (*long term potentiation*, LTP) y la depresión a largo plazo (*long term depression*, LTD) son dos formas de este tipo de plasticidad que se cree estarían en la base de los mecanismos que subyacen el aprendizaje y la memoria. Una propiedad importante de estas formas de plasticidad es que sólo las sinapsis que contribuyen activamente al proceso de inducción van a experimentar plasticidad (sinapsis-específico) (Lüscher and Malenka, 2012).

Existen diferentes formas de LTP y LTD en función de la vía sináptica estudiada y el modelo experimental utilizado. Particularmente, los circuitos del hipocampo han sido extensamente estudiados utilizando rodajas *in vitro* (*Figura 4*). La vía de las colaterales de Schaffer es un modelo clásico para el estudio de LTP y LTD. La

estimulación breve de alta frecuencia produce LTP, que se observa como un aumento prolongado en la amplitud de los EPSP en la neurona piramidal postsináptica de la región CA1 (*Figura 4*) (Malinow, 1991; Kandel, 2001). De forma resumida, los mecanismos moleculares involucrados en la LTP requieren de una fase temprana, donde se produce un aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular mediado por NMDAR postsinápticos, lo que lleva a un cambio en la fuerza sináptica a través del aumento de la inserción y de la conductancia de AMPAR. En una segunda fase tardía, que dura unas cuantas horas luego del período de inducción, el aumento de la fuerza sináptica es mantenido por un proceso dependiente de la síntesis de proteínas, denominado consolidación celular, durante la cual aumentan la síntesis de AMPAR (Poo et al., 2016). Por otra parte, la LTD se desencadena cuando las colaterales de Schaffer se estimulan a baja frecuencia ( $\sim 1$  Hz) durante períodos prolongados (10-15 minutos). Como consecuencia los EPSP disminuyen durante varias horas. Los mecanismos que subyacen a esta forma plasticidad involucran un leve aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  postsináptico que activa proteínfosfatasa, provocando la internalización de AMPAR y por tanto disminuyendo la sensibilidad al glutamato liberado.



Si bien los mecanismos que subyacen la LTP y LTD en las colaterales de Schaffer son principalmente postsinápticos, es importante destacar que se han observado cambios presinápticos duraderos en la *pr* que producen LTP y LTD tanto en sinapsis excitadoras como inhibitoras (Castillo, 2012). Por ejemplo, la estimulación en las fibras musgosas hipocámpales induce LTP por un mecanismo presináptico, independiente de los NMDAR.

Además de la potenciación de conexiones existentes, durante la LTP nuevas conexiones pueden emerger, por ejemplo, mediante la activación de sinapsis silentes (Liao et al., 1995). Asimismo, ocurren cambios estructurales a nivel sináptico que resultan en el agregado de espinas dendríticas, así como en cambios morfológicos de las mismas. Experimentos recientes en la corteza del ratón han confirmado que las espinas son estructuras importantes para el almacenamiento de información a largo plazo (Hofer et al., 2009; Yang et al., 2009). Se conoce, además, que ciertos neuromoduladores (como la noradrenalina y la dopamina) actúan durante la LTP, por ejemplo, disminuyendo el umbral para producir la plasticidad, o aumentando la ventana temporal en la cual dos entradas puedan integrarse (Andersen et al., 2017).

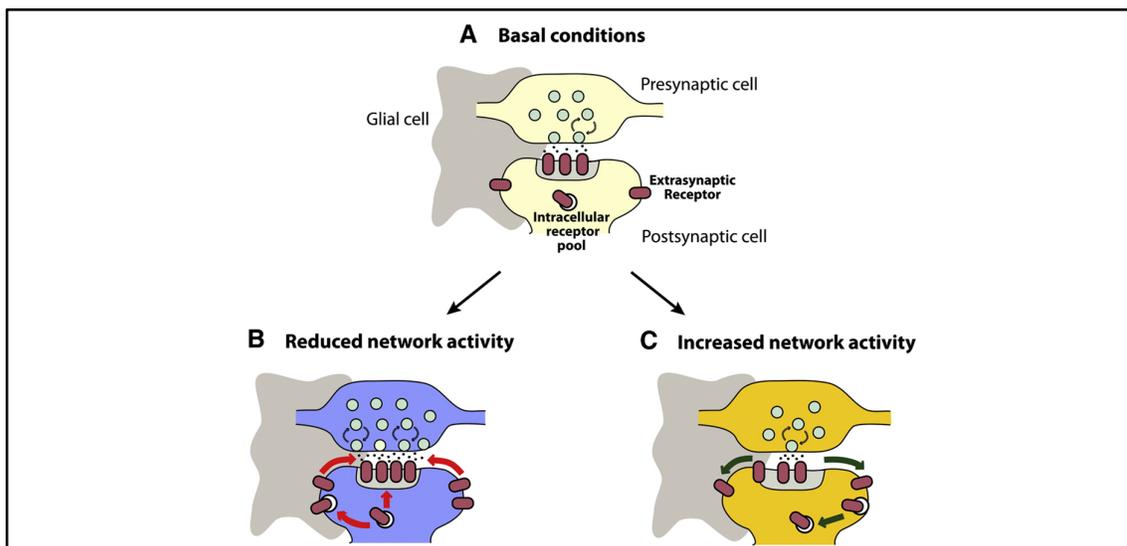
En los últimos años, mediante el uso de técnicas de optogenética, varios estudios han apoyado el vínculo causal entre LTP/LTD y la formación de la memoria. Se ha logrado producir la inactivación y reactivación de una memoria asociativa (miedo condicionado) y se han marcado células específicas activadas por el aprendizaje, que posteriormente pueden ser reactivadas con la luz recuperando una memoria. Estas células, denominadas células engrama, muestran cambios típicos de LTP (Liu et al., 2012; Nabavi et al., 2014; Ryan et al., 2015).

### **Plasticidad sináptica homeostática**

La plasticidad hebbiana como la LTP y LTD, son mecanismos de retroalimentación positiva, que permiten reforzar o debilitar la actividad sináptica del circuito neuronal involucrado. En consecuencia, una célula que ha sufrido LTP o LTD es más sensible a ser potenciada o deprimida frente a un estímulo posterior. Desde hace apenas dos décadas, algunos autores se han planteado que, frente a estos fenómenos, es necesario la existencia de mecanismos capaces de mantener cierta estabilidad a largo plazo en la actividad de los circuitos neuronales, estabilidad necesaria para el correcto almacenamiento de la memoria. Surge así el concepto de *plasticidad sináptica homeostática* (PSH), que promueve la estabilidad de los circuitos a través de ajustes compensatorios de la fuerza sináptica cuando se producen desvíos de los niveles óptimos de actividad neural, este constituye un mecanismo de retroalimentación negativa (Turrigiano, 2008). Para conseguir esto, es probable que las neuronas puedan sentir su actividad, integrar esta medida durante el paso del tiempo (minutos a horas) y ajustar sus propiedades para mantener una función estable (Turrigiano, 2008).

En la PSH, la célula responde a la perturbación, a través de dos mecanismos principales: 1) el control homeostático de la excitabilidad intrínseca; 2) ajustes de la eficacia sináptica, lo que incluye cambios en la abundancia y distribución de receptores de neurotransmisores postsinápticos y en la liberación de neurotransmisores presináptica (*Figura 5*) (Pozo and Goda, 2010; Davis and Müller, 2015). Junto con los cambios funcionales, se producen modificaciones estructurales en respuesta a cambios crónicos en la actividad (Wefelmeyer et al., 2016).

La PSH fue demostrada experimentalmente en 1998 realizando manipulaciones crónicas de la actividad de cultivos disociados de neuronas de rata, demostrando que la fuerza sináptica, como otros aspectos de la función neuronal, está regulada de manera homeostática (Turrigiano et al., 1998; O'Brien et al., 1998). Desde ese momento, se ha documentado la existencia de PSH en diferentes sistemas *in vitro* e *in vivo*. La visión emergente hoy en día destaca la existencia de múltiples mecanismos paralelos de PSH, con diferentes cambios en las propiedades sinápticas que son provocados en diferentes condiciones experimentales, tales como el método utilizado



**FIGURA 5. Esquema básico de la plasticidad sináptica homeostática en la sinapsis excitadora. (A) Condición basal.** La transmisión sináptica está mediada por la liberación de neurotransmisores desde la terminal presináptica y la activación de receptores en la célula postsináptica. La eficacia en la liberación de neurotransmisores y la activación de receptores postsinápticos determinan la fuerza sináptica. **(B,C)** Las neuronas enfrentan cambios en la actividad del circuito adaptando la fuerza pre y postsináptica. **(B)** La actividad reducida es compensada a nivel presináptico con el aumento del reciclado de vesículas, el número de vesículas ancladas y de la *pr*. A nivel postsináptico, aumentan los receptores a través de la difusión lateral desde sitios extrasinápticos y por exocitosis desde el *pool* intracelular. **(C)** Para compensar un aumento de la actividad del circuito, la neurona presináptica disminuye la *pr* mientras que la célula postsináptica reduce el número de receptores por endocitosis o por difusión lateral desde sitios sinápticos a extrasinápticos. Dependiendo de la etapa del desarrollo y de las condiciones experimentales, los cambios pre y postsinápticos pueden ocurrir juntos o separados. Las células gliales (en gris) también pueden contribuir a los cambios en la fuerza sináptica, por ejemplo, a través de la secreción de factores solubles que se unan a receptores de superficie. Tomado de Pozo and Goda, 2010.

para manipular la actividad, la preparación y la fuente de las neuronas y su edad (Pozo and Goda, 2010).

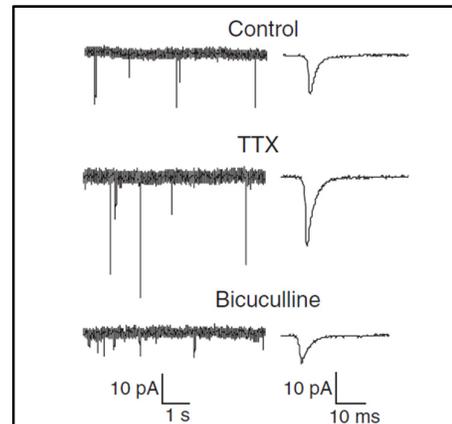
### Plasticidad homeostática postsináptica

La forma más estudiada de PSH en las sinapsis excitadoras del SNC se denomina *synaptic scaling*, y ocurre a través de la activación de mecanismos postsinápticos que involucran el ajuste compensatorio de la abundancia de AMPAR. Las primeras evidencias del *synaptic scaling* fueron obtenidas *in vitro* en cultivos de neuronas corticales, hipocámpales y de médula espinal, a través de manipulaciones farmacológicas que modificaban la actividad neuronal de forma crónica (Turrigiano et al., 1998; O'Brien et al., 1998; Lissin et al., 1998). En particular, el bloqueo prolongado de la descarga neuronal (aplicando Tetrodotoxina -TTX- bloqueante específico de canales de Na<sup>+</sup> voltaje-dependientes) o la inhibición de los receptores de

glutamato (CNQX, antagonista de los AMPAR), o el aumento de la actividad, inducida por el bloqueo de la transmisión inhibitoria (mediante bicuculina, antagonista de receptores GABA<sub>A</sub>), produce un aumento o una disminución compensatoria de las corrientes mediadas por AMPA, respectivamente (*Figura 6*).

Los cambios en la fuerza de la sinapsis glutamatérgicas puede ser medido a través del registro de las corrientes postsinápticas excitadoras miniatura (mEPSCs o "minis"), que representan la respuesta postsináptica a la liberación de neurotransmisor por vesículas individuales y pueden considerarse la fuerza unitaria de una sinapsis (*Figura 6*) (Turrigiano, 2008).

El *synaptic scaling* se ha considerado como un fenómeno global que aumenta o disminuye de forma uniforme dentro de la población de sinapsis de una neurona dada, por el mismo factor multiplicativo. Este mecanismo multiplicativo conserva las diferencias relativas de la fuerza sináptica entre las sinapsis, lo que resulta crucial para el almacenamiento de información (Turrigiano, 2008).



**FIGURA 6. La amplitud de los mEPSC aumenta en presencia de TTX, mientras que disminuye frente a la aplicación de bicuculina.** Se muestran registros representativos de los mEPSC de cultivos control y de cultivos en presencia de TTX y bicuculina por 48hs. A la izquierda los datos sin procesar; a la derecha, la forma de la onda del promedio de mEPSC de la neurona de la izquierda. Tomado de Turrigiano et al., 1998.

## Mecanismos moleculares

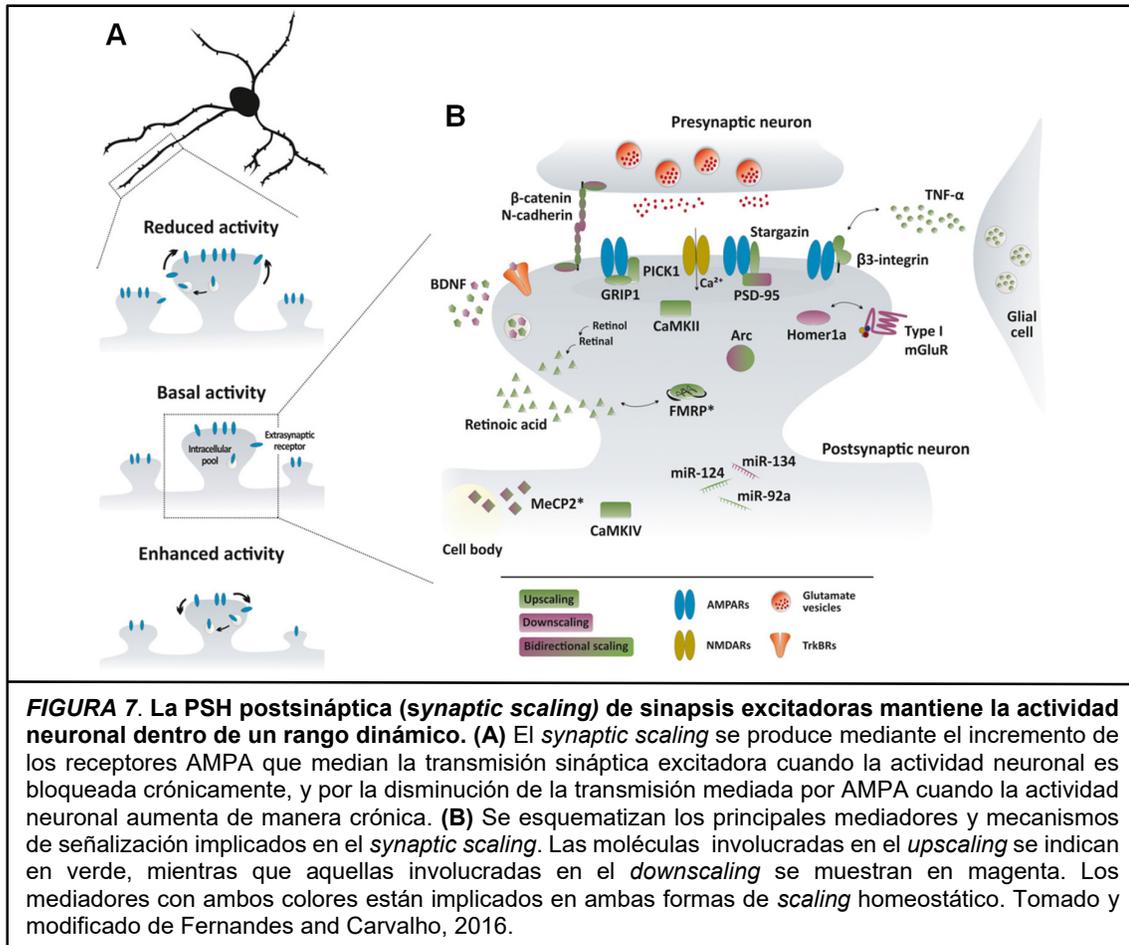
A lo largo de los años, se han detallado una variedad de mecanismos que subyacen a la expresión de la plasticidad homeostática postsináptica, regulando la composición y abundancia de los AMPAR (ver revisiones: Pozo and Goda, 2010; Vituriera et al., 2012; Fernandes and Carvalho, 2016). Algunos de los mediadores implicados hasta el momento se muestran en la *Figura 7*.

### *Proteínas de la PSD*

Proteínas de la PSD tales como stargazin, Homer1, GRIP1 y PICK1 han sido implicadas en el *synaptic scaling*. Por ejemplo, stargazin es una proteína transmembrana asociada a los AMPAR que interactúa con la PSD-95 a través de un mecanismo de fosforilación CaMKII dependiente y modula la movilidad de los AMPAR en la superficie (Bats et al., 2007). Se ha reportado que stargazin aumenta su expresión y fosforilación frente a la inactividad crónica en neuronas corticales en cultivo. Además, la expresión de un mutante de stargazin que no se puede fosforilar, bloquea la acumulación de los AMPAR en respuesta a la inactividad crónica, indicando que la fosforilación de stargazin es necesaria para el *synaptic scaling* (Louros et al., 2014). Por otra parte, Homer1 aumenta su expresión frente a aumentos crónicos de la actividad neuronal, lo que resulta en la disminución de la expresión de AMPAR sinápticos y de los mEPSCs (Hu et al., 2010). Muchas de estas proteínas de la PSD también tienen un rol durante la expresión de la plasticidad de tipo hebbiana.

### *Factores solubles liberados*

Varios estudios han investigado el rol en el *synaptic scaling* de moléculas liberadas al medio tanto por neuronas como por células gliales adyacentes, tales como el TNF- $\alpha$  (factor de necrosis tumoral- $\alpha$ ), el BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro) y el ácido retinoico (*Figura 7*). El BDNF fue la primera molécula involucrada, presentando hoy en día un rol controversial en el *synaptic scaling*, siendo una señalización que difiere según la etapa del desarrollo y el tipo celular estudiado (Fernandes and Carvalho, 2016). En los primeros estudios realizados en neuronas corticales, la aplicación de BDNF previno el incremento de la fuerza sináptica inducido por la inactividad crónica, por lo que se postuló que el BDNF regulaba de forma negativa el *synaptic scaling* (Rutherford et al., 1998). Sin embargo, efectos opuestos han sido encontrados en cultivos hipocámpales, donde la aplicación de BDNF produce un aumento de los mEPSC mediados por AMPA (Bolton et al., 2000).



Otra molécula que se ha postulado regula la fuerza sináptica, es el TNF- $\alpha$ , una citoquina proinflamatoria, que es liberada por las células gliales y produce a nivel de neuronas hipocámpales el incremento de AMPAR que contienen la subunidad GluA1 en la membrana postsináptica (Beattie, 2002; Stellwagen and Malenka, 2006). Se ha reportado que el TNF- $\alpha$  es necesario para el *synaptic scaling* en la corteza visual en experimentos *in vivo*, dado que ratones KO para TNF- $\alpha$  no la desarrollan (Kaneko et al., 2008). Si bien los estudios iniciales de Stellwagen y col. proponen que la supresión crónica de la actividad neuronal produce una liberación lenta de TNF- $\alpha$  desde las células gliales, reportes posteriores sugieren que el TNF- $\alpha$  es una molécula necesaria para que se pueda producir el *synaptic scaling*, pero no es liberada de forma dependiente de la actividad neuronal (Stellwagen and Malenka, 2006; Steinmetz and Turrigiano, 2010). En cambio, se propone que son necesarios niveles basales de TNF- $\alpha$  en el medio, que cumpliría un rol permisivo a través del mantenimiento de las sinapsis en un estado plástico (Steinmetz and Turrigiano, 2010).

El ácido retinoico y la fosfatasa calcineurina, que regula la síntesis de ácido retinoico, también han sido implicados en *synaptic scaling* (Aoto et al., 2008; Arendt et al., 2015). Se ha reportado que al aplicar ácido retinoico en las neuronas hipocampales esto resulta en un aumento multiplicativo de la amplitud de los mEPSC, y que al inducir *synaptic scaling* mediante la aplicación de TTX, se observa un aumento de la síntesis de ácido retinoico (Aoto et al., 2008).

#### *Proteínas de adhesión sinápticas*

Proteínas de adhesión sinápticas usualmente localizadas en la hendidura sináptica o en su proximidad interaccionan de forma homo o heterofílica a través de la hendidura sináptica y son reguladores dinámicos de la función sináptica. Por ejemplo, el complejo N-cadherina/ $\beta$ -catenina participa en procesos como el *synaptic scaling* regulando la expresión de los AMPAR (Thalhammer and Cingolani, 2014). Otras proteínas como las integrinas, proteínas transmembrana formadas por subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , regulan la maduración y la función sináptica, y específicamente se ha reportado que la  $\beta 3$  integrina es necesaria en la regulación del *synaptic scaling* (Cingolani and Goda, 2008).

#### *Synaptic scaling in vivo*

El *synaptic scaling* también ha sido estudiado *in vivo*. Echegoyen y col. han logrado el bloqueo crónico de la actividad *in vivo* en el hipocampo, provocado por la liberación sostenida de TTX directamente sobre el área CA1 del hipocampo, a través de la utilización de un polímero plástico (Echegoyen et al., 2007). En dicho trabajo, se evidencia que el bloqueo crónico de la actividad lleva a un incremento en la amplitud de los mEPSCs registrados *ex vivo* en neuronas de CA1 de ratas juveniles (P15), no observándose dicho aumento en ratas adultas (P30), indicando efectos dependientes de la edad. Asimismo, se han realizado experimentos en rodajas utilizando cultivos organotípicos que parcialmente preservan la conectividad y permiten manipulaciones farmacológicas crónicas de la actividad, obteniendo resultados que apoyan lo descrito *in vivo* (Kim and Tsien, 2008; Soares et al., 2013; Arendt et al., 2013).

Por otra parte, el *synaptic scaling* ha sido ampliamente estudiado *in vivo* en el sistema visual. La actividad de la red se puede alterar a través de la inyección de TTX intraocular para bloquear los PAs, o manipulando las entradas sensoriales, ya sea por exposición o por privación de la luz a los animales. Luego de las manipulaciones sensoriales se realizan rodajas agudas *ex vivo* para registrar los mEPSCs. Se ha

reportado, por ejemplo, que luego de varios días de privación visual aumenta la amplitud de los mEPSCs registrados en neuronas de la corteza visual de ratas juveniles, que revierte luego de la re-exposición a la luz (Desai et al., 2002; Goel et al., 2006). Recientemente, Keck et col. realizaron cambios en la entrada sensorial visual a través de lesiones en la retina y observaron que los niveles de actividad en la corteza visual disminuyen significativamente luego de la privación visual, seguido de un aumento gradual de la actividad en las 48hs posteriores a la privación. Estos cambios en la actividad están asociados a *synaptic scaling*, lo que se evidencia *in vitro* por un incremento de la amplitud de los mEPSCs, en concordancia con los reportes previos mencionados, que además se acompaña de un aumento del tamaño de las espinas *in vivo* (Keck et al., 2013).

En conclusión, el *synaptic scaling*, es la forma de PSH más estudiada hasta el momento, evidenciada *in vitro* e *in vivo*, donde la reducción de la actividad neuronal lleva a un aumento en la amplitud de los mEPSCs como resultado del aumento de la inserción de los AMPAR en todas las sinapsis, y de esta manera se logra restaurar los niveles de actividad observados antes del bloqueo de la actividad. Sin embargo, este mecanismo postsináptico no es el único que subyace la PSH inducida por inactividad crónica, como será expuesto a continuación.

### **Plasticidad homeostática presináptica**

La PSH presináptica se refiere al ajuste homeostático de la liberación del neurotransmisor. A pesar de que este fenómeno es robusto y altamente conservado, los mecanismos moleculares están comenzando a emerger recientemente (para revisión: Davis and Müller, 2015). Las evidencias provienen principalmente de estudios realizados en la unión neuromuscular (*neuromuscular junction* -NMJ-) de *Drosophila* y en cultivos disociados de mamíferos (*Figura 8*).

#### Unión neuromuscular de *Drosophila*

El ajuste homeostático de la función presináptica ha sido extensamente estudiado en la NMJ de *Drosophila*. Distintas evidencias sugieren que la modulación homeostática de la liberación presináptica implica un aumento en la entrada de  $Ca^{2+}$  presináptica a través de los canales Cav2.1 (el único canal responsable de la transmisión sináptica en la NMJ de *Drosophila*). Específicamente, se ha demostrado que una mutación en la subunidad  $\alpha 1$  del canal de Cav2.1 (gen *cacophony*), que forma el poro del canal, bloquea completamente los cambios homeostáticos en la entrada de  $Ca^{2+}$  y en la

liberación presináptica (Frank et al., 2006). De manera interesante, dicha mutación no previene la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del canal cuando se aumenta el  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular ni cuando se ensancha del PA, por lo que específicamente lo vuelve incapaz de responder homeostáticamente para ajustar la liberación presináptica (Müller and Davis, 2012).

Por otra parte, se ha demostrado que el ajuste homeostático de la función presináptica requiere de un aumento del número de VS en el RRP. Se ha reportado que las proteínas RIM y Rab3 presentes en la AZ están involucradas en el ajuste homeostático del reciclado de VS (Müller et al., 2011; Muller et al., 2012). En este sentido, la mutación de la proteína RIM previene la modulación homeostática de la liberación presináptica, a través de la modulación del RRP (Muller et al., 2012). Por otra parte, las proteínas Rab3 (GTPasa pequeña presente en las VS) y Rab3-GAP (proteína de activación de la GTPasa) actúan regulando el ciclo de las VS, y se ha reportado que la mutación de Rab3-GAP bloquea la inducción y expresión de la PSH, sin afectar la transmisión basal (Müller et al., 2011).

Las proteínas RIM también interactúan con los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , sin embargo, la regulación homeostática de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  no se altera en los mutantes RIM. Esto plantea que la PSH presináptica requiere de dos procesos que pueden ser separados, por un lado, la potenciación de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y por otro la modulación del RRP dependiente de las proteínas RIM (Muller et al., 2012).

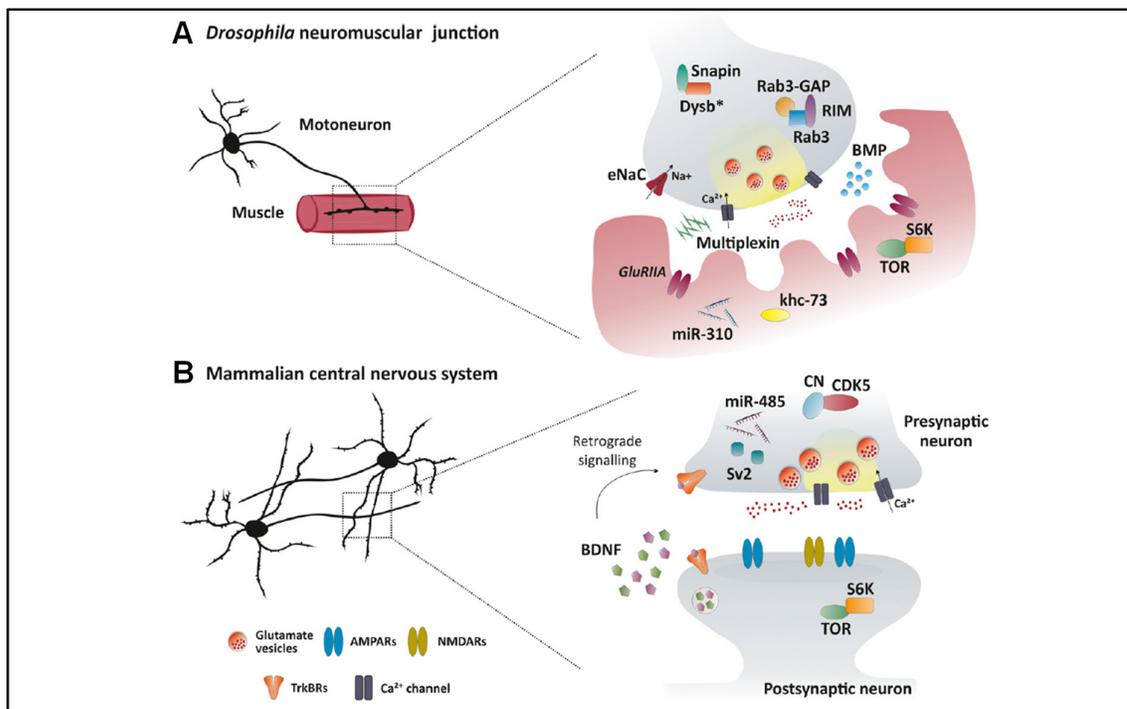
#### PSH presináptica en mamíferos

En el SNC de mamíferos se han encontrado evidencias similares que en *Drosophila*, consistentes tanto con una modulación de los *pools* de VS como con la entrada presináptica de  $\text{Ca}^{2+}$ . Estudios pioneros realizados por Murthy y col. mostraron que el bloqueo crónico de la actividad sináptica mediante la aplicación de TTX en sinapsis hipocámpales en cultivos disociados promueve cambios compensatorios en la función presináptica al incrementar el área de la AZ, el número de VS en contacto con la membrana presináptica, el tamaño del RRP y la *pr* (Murthy et al., 2001).

Al igual que en *Drosophila*, y teniendo en cuenta el alto grado de dependencia que tiene la *pr* con la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, se ha propuesto que en mamíferos la señalización mediada por  $\text{Ca}^{2+}$  tiene un rol preponderante en el ajuste homeostático de la función presináptica. En este sentido, estudios imagenológicos realizados por Zhao y col., donde analizaron simultáneamente la fusión de VS y el

$\text{Ca}^{2+}$  presináptico en sinapsis centrales excitadoras de vertebrados, evidenciaron que frente al bloqueo crónico de la actividad se produce un aumento tanto de la *pr* como de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  (Zhao et al., 2011). En este sentido, otros autores han mostrado que luego del bloqueo crónico de la actividad algunas proteínas presinápticas se encuentran enriquecidas como: el sensor de  $\text{Ca}^{2+}$  sinaptotagmina, la proteína de las VS SV2B, que está implicada en la facilitación de la *pr*, y la subunidad que forma el poro del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo P/Q (Custer, 2006; Lazarevic et al., 2011). Recientemente, Jeans y col. reportaron que cambios en las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  de los canales tipo P/Q y no los canales tipo N, median cambios homeostáticos tanto en la eficacia de la liberación del neurotransmisor como en el tamaño de los *pools* principales de VS (Jeans et al., 2017).

Por otra parte, se evidenció que la expresión de transportador vesicular de glutamato 1 (vGlut-1) en la terminal presináptica está incrementada frente al bloqueo crónico de la actividad, lo que ha sugerido la posibilidad que, además del aumento en los receptores postsinápticos, las neuronas también podrían cargar con más neurotransmisor cada VS y ambos procesos podrían colaborar en el aumento de la amplitud de los mEPSCs (Wojcik et al., 2004; Wilson, 2005; De Gois, 2005).



**FIGURA 8. La PSH presináptica en la unión neuromuscular de *Drosophila* (A) y en el sistema nervioso central de mamíferos (B).** Se muestran los mediadores moleculares que participan en los mecanismos de la plasticidad homeostática presináptica. Las moléculas implicadas en enfermedades se indican (\*). Tomado y modificado de Fernandes and Carvalho, 2016.

Si bien la mayor parte de los estudios en PSH presináptica han sido realizados *in vitro*, experimentos *in vivo* han revelado que la fuerza de las sinapsis sensoriales primarias en el bulbo olfatorio de mamíferos puede ser modificada por la experiencia sensorial de manera homeostática. Se ha reportado que la privación del olor aumenta la fuerza de sinapsis primarias a través de mecanismos tanto presinápticos, a través de un aumento en la *pr*, como mecanismos postsinápticos (Tyler et al., 2007).

#### Regulación retrógrada de la fuerza presináptica

Se postula existe una coordinación entre las fuerzas pre y post sinápticas, que es dependiente de la actividad. Por un lado, se ha postulado que la célula postsináptica puede modular la función presináptica, a través de la liberación de mensajeros desde las dendritas, por ejemplo, el óxido nítrico, que actúen a nivel de las terminales presinápticas para modificar la *pr*. Otros estudios han descrito que la activación de mTORC1 dendrítico lleva a una señalización retrógrada a través de la liberación de BDNF, que promueve el incremento de la *pr* de las terminales presinápticas opuestas (Henry et al., 2012). Por otra parte, se ha evidenciado el rol de proteínas de adhesión sináptica que directamente coordinan la actividad de la pre y post sinapsis en una sinapsis específica, como son el complejo N-cadherina/ $\beta$ -catenina y el neurologina/neurexina- $\beta$  (Futai et al., 2007; Viturera and Goda, 2013). Específicamente, la N-cadherina y la  $\beta$ -catenina están involucradas en los cambios homeostáticos de la fuerza sináptica mediante la regulación retrógrada de la función presináptica (Viturera et al., 2011). Se ha evidenciado que, en cultivos disociados de hipocampo, la ausencia de  $\beta$ -catenina postsináptica previene el ajuste homeostático de la *pr* en condiciones de inactividad crónica, sugiriendo un rol esencial para esta proteína en la regulación trans-sináptica de la función presináptica (Viturera et al., 2011).

Por otra parte, otro grado de regulación homeostática de la función presináptica se describió en cultivos disociados de hipocampo donde se observó que la *pr* responde de manera compensatoria a un incremento en la actividad dendrítica local (Branco et al., 2008).

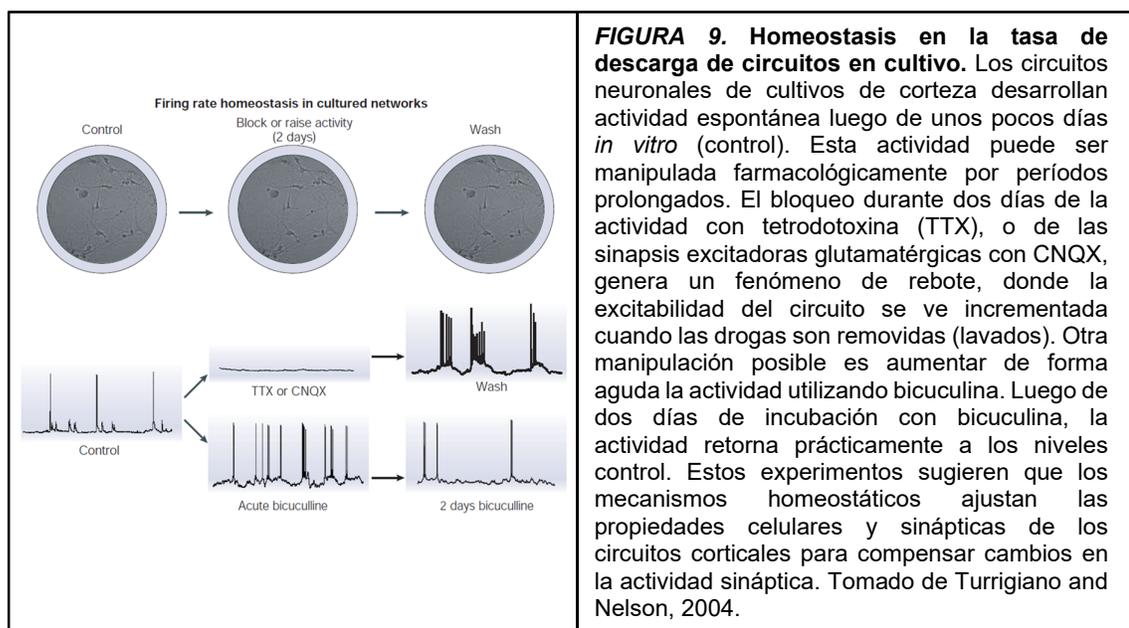
En conclusión, la PSH está mediada por el ajuste compensatorio de la función tanto pre como postsináptica; la contribución de cada uno de estos componentes depende de varios factores, como la edad del cultivo, el tipo celular o tejido estudiado. Por ejemplo, en cultivos hipocampales y de la corteza visual más jóvenes ( $\leq 14$  DIV), la

PSH inducida por inactividad crónica es exclusivamente postsináptica, y a medida que el circuito madura emerge la expresión presináptica de PSH (Wierenga, 2006).

### Plasticidad homeostática estructural y de la excitabilidad intrínseca

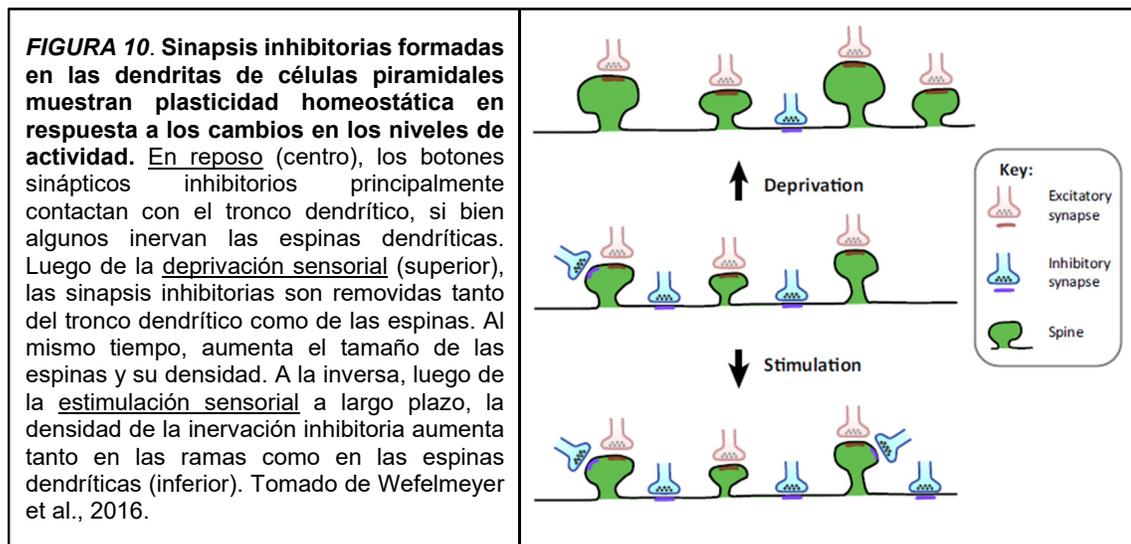
Además de las adaptaciones funcionales mencionadas de la terminal pre y postsináptica, se producen cambios en las propiedades intrínsecas de las neuronas para mantener estable la tasa de disparo, así como cambios estructurales. En estudios iniciales, se aplicaron agentes farmacológicos para disminuir (TTX, CNQX) o aumentar (bicuculina) la tasa de descarga de las neuronas en cultivo (*Figura 9*). Luego de 48 hs y de lavado el agente, se observa que las neuronas responden a la privación de la actividad a través del aumento de su excitabilidad intrínseca (Turrigiano and Nelson, 2004). Estos cambios se lograrían regulando el balance entre las conductancias voltaje dependientes entrantes y salientes, lo que ha sido documentado, por ejemplo, en neuronas neocorticales (Breton and Stuart, 2009; Desai et al., 1999; Turrigiano, 2011).

Asimismo, la regulación entre las entradas excitadoras e inhibitoras (balance excitación/inhibición- balance E/I) también es un potencial mecanismo de regulación homeostático. Tanto cambios homeostáticos en la excitabilidad intrínseca y en el balance E/I han sido reportados *in vivo* en la corteza visual de ratas sujetas a privación visual monocular (Maffei and Turrigiano, 2008).



En cuanto a cambios estructurales homeostáticos, por ejemplo, se ha reportado que existe un remodelado de las entradas inhibitorias frente a cambios crónicos en la actividad que intentan normalizar la actividad global de la red como se muestra en la *Figura 10* (Wefelmeyer et al., 2016). Durante la deprivación monocular se observa una mayor tasa de remoción de entradas inhibitorias en la corteza visual, mientras que durante la estimulación persistente (24hs) de las vibrisas se observa un aumento de las sinapsis inhibitorias en la corteza de barriles (Knott et al., 2002; Chen et al., 2012).

Por otro lado, además de los cambios estructurales de los botones presinápticos que han sido mencionados previamente, se ha visto que el segmento inicial del axón también sufre modificaciones, tanto en su longitud como en su posición para modular la excitabilidad neuronal (Wefelmeyer et al., 2016).



### Interacción entre plasticidad hebbiana y plasticidad homeostática

Estas dos formas de plasticidad frecuentemente trabajan en direcciones opuestas, por lo que resulta un desafío entender cómo se integran en el funcionamiento del SNC. Como se comentó, la plasticidad hebbiana inherentemente lleva a un proceso de retroalimentación positiva: a medida que las entradas excitadoras sobre una neurona aumentan, la tasa de disparo de la neurona postsináptica también aumenta. Esto incrementa la correlación positiva entre la neurona y sus entradas, donde las sinapsis que son reforzadas se vuelven más efectivas en la despolarización de la neurona postsináptica y van a continuar siendo reforzadas de forma ilimitada en un ciclo que puede llevar a la neurona a la saturación (Abbott and Nelson, 2000; Turrigiano, 2008).

Asimismo, ante esta situación de refuerzo extremo de determinadas sinapsis, la neurona postsináptica sería capaz de disparar ante estímulos que en principio no provocaban este efecto e incluso podría llegar a producirse un disparo sin estímulo ambiental, perdiéndose especificidad sináptica (Turrigiano, 2008). Por tanto, se ha postulado que los mecanismos de plasticidad hebbiana son potencialmente desestabilizantes. En cambio, la plasticidad homeostática involucra una retroalimentación negativa, que lleva a la neurona de vuelta a su estado original luego de una perturbación, incluyendo las perturbaciones producidas por la plasticidad hebbiana (Turrigiano, 2008; Vitureira and Goda, 2013). De esta manera se satisface la necesidad de estabilidad, es decir, mantener cierto grado de constancia en las propiedades básicas de un circuito cuando este necesita tanto de la estabilidad como del cambio.

Un escenario sugerido es que cuando la LTP de una entrada aumenta la tasa de disparo postsináptico, mecanismos de PSH reducen de manera proporcional la fuerza sináptica de todas las entradas de manera de volver a los niveles normales, sin perder las diferencias relativas introducidas por la LTP. De esta manera, la PSH evitaría la potenciación cíclica (Turrigiano, 2008).

Un ejemplo de interacción entre estos tipos de plasticidad ha sido demostrado en el hipocampo, donde se vio que frente a la inactividad crónica no sólo aumenta la abundancia de AMPAR en las sinapsis existentes como fue previamente mencionado, sino que también se promueve la presencia de nuevas sinapsis glutamatérgicas que contienen sólo NMDAR (sinapsis funcionalmente silentes por carecer de AMPAR). Así, cuando se induce LTP posteriormente a la PSH, estas sinapsis silentes se activan e incorporan AMPAR a la membrana postsináptica, expresándose la LTP y aumentando la fuerza sináptica (Arendt et al., 2013).

## **Rol de la glía en la modulación sináptica: sinapsis tripartita y multi-partita**

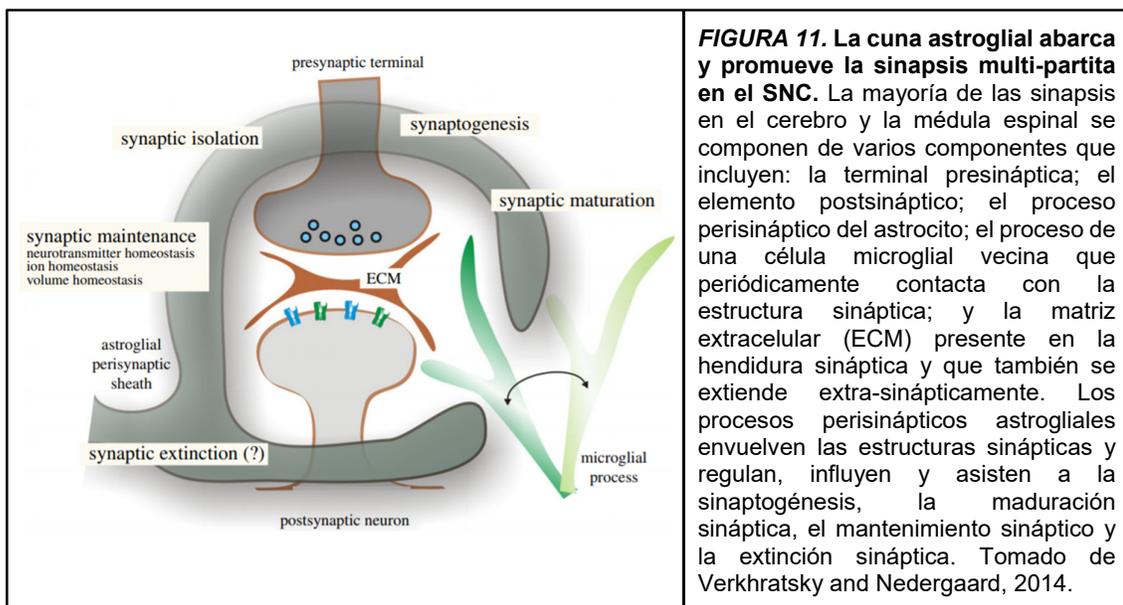
Hasta el momento, se ha comentado principalmente la participación de las neuronas en los fenómenos de plasticidad sináptica. Sin embargo, la participación de las células gliales en estos procesos ha sido ampliamente reportada en las últimas décadas.

Los astrocitos, si bien en el pasado fueron considerados simplemente como elementos de soporte para las neuronas, actualmente se consideran células de vital importancia para diversos aspectos del funcionamiento normal del SNC, incluyendo su desarrollo, la adaptación dependiente de la experiencia y el envejecimiento (Verkhratsky and Nedergaard, 2018). Los astrocitos participan activamente en el mantenimiento de la homeostasis cerebral regulando la recaptación de neurotransmisores, la sinaptogénesis, el balance electrolítico e hídrico del medio extracelular y la microcirculación cerebral, entre otras (para revisión: Verkhratsky and Nedergaard, 2018). También, participan en la función sináptica, regulando la transmisión sináptica y la plasticidad, siendo considerados desde hace dos décadas como elementos integrales y funcionales de las sinapsis, lo que se conoce bajo el término de *sinapsis tripartita* (Araque et al., 1999). De esta manera, se destaca la comunicación bidireccional entre astrocitos y neuronas, donde la actividad sináptica es detectada por los astrocitos a través de una amplia gama de receptores de neurotransmisores y canales iónicos. La activación de éstos provoca variaciones en la concentración del  $Ca^{2+}$  intracelular astrocitario y de otras vías de transducción de señales, que desencadenan la liberación de sustancias denominadas *gliotransmisores*, capaces de modular la función de las terminales pre y postsinápticas (Perea et al., 2009; Araque et al., 2014).

Los astrocitos están en asociación muy próxima con las neuronas y pueden envolver a las terminales sinápticas; según estimaciones realizadas en rodajas de hipocampo de rata un solo astrocito puede contactar hasta 140.000 sinapsis, y hasta 2 millones de sinapsis en el humano (Bushong et al., 2002; Oberheim et al., 2009). Así, los astrocitos pueden modular la acción de una sinapsis activa de manera local (modulación homosináptica) o pueden afectar la actividad de sinapsis vecinas (modulación heterosináptica) a través de la propagación de las elevaciones del  $Ca^{2+}$  intracelular desde los procesos astrocitarios cercanos a la sinapsis activa (Araque et al., 2014). Particularmente, se ha reportado que astrocitos hipocampales regulan de forma heterosináptica la fuerza presináptica de dos entradas que recibe una misma

neurona, y que dicha regulación es dependiente de la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitario por activación de NMDAR y VGCCs de tipo L astrocitarios (Letellier et al., 2016).

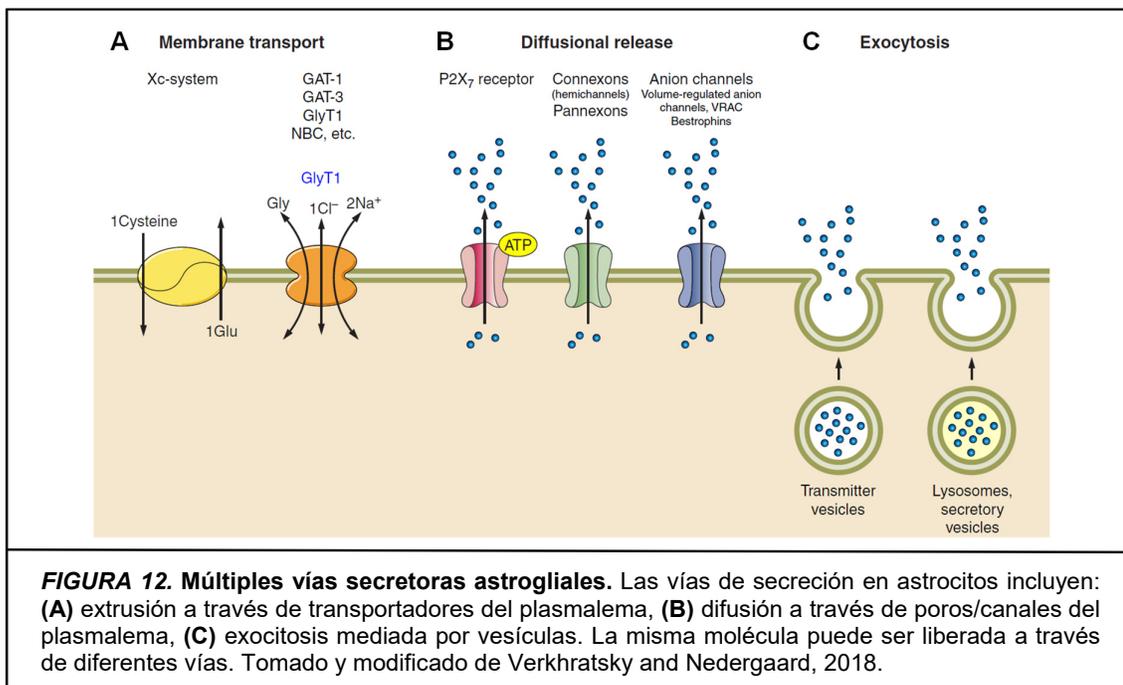
En los últimos años, la ECM presente en la hendidura sináptica y la microglía cercana a la zona sináptica se han incluido dentro de los componentes sinápticos. La microglía son las células inmunes residentes del cerebro, que expresan y secretan moléculas de señalización inmunes en procesos de inflamación. Asimismo, se ha evidenciado que estas células continuamente exploran el ambiente extracelular e interactúan con neuronas y astrocitos en condiciones fisiológicas y pueden alterar la transmisión sináptica y la plasticidad en el cerebro sano (Nimmerjahn et al., 2005; Wu et al., 2015). Por tanto, el concepto de sinapsis tripartita ha evolucionado hacia una visión más amplia que incluye un conjunto sináptico de múltiples partes, donde existen relaciones multidireccionales complejas entre todos los componentes: las terminales pre y postsinápticas, el proceso perisináptico del astrocito, la microglía y la ECM (*Figura 11*) (Verkhratsky and Nedergaard, 2014).



**FIGURA 11. La cuna astroglial abarca y promueve la sinapsis multi-partita en el SNC.** La mayoría de las sinapsis en el cerebro y la médula espinal se componen de varios componentes que incluyen: la terminal presináptica; el elemento postsináptico; el proceso perisináptico del astrocito; el proceso de una célula microglial vecina que periódicamente contacta con la estructura sináptica; y la matriz extracelular (ECM) presente en la hendidura sináptica y que también se extiende extra-sinápticamente. Los procesos perisinápticos astrogliales envuelven las estructuras sinápticas y regulan, influyen y asisten a la sinaptogénesis, la maduración sináptica, el mantenimiento sináptico y la extinción sináptica. Tomado de Verkhratsky and Nedergaard, 2014.

Los astrocitos se comunican con las neuronas y otras células gliales a través de la secreción de una gran variedad de sustancias que contribuyen a la regulación del desarrollo y la homeostasis del SNC, incluidos neurotransmisores clásicos, neuromoduladores, hormonas y péptidos, sustratos metabólicos, factores de crecimiento, eicosanoides, factores tróficos y factores inflamatorios. Estas sustancias se liberan a través de diferentes vías, como son la exocitosis basada en vesículas

(incluyen microvesículas sinápticas, vesículas de núcleo denso, lisosomas, exosomas y ectosomas), la difusión a través de canales/poros de la membrana plasmática y la extrusión a través de transportadores de membrana (*Figura 12*) (revisiones: Verkhratsky et al., 2016; Verkhratsky and Nedergaard, 2018). Asimismo, existen otras vías de comunicación neuro-glial mediadas, por ejemplo, por moléculas de adhesión homofílicas y heterofílicas. A continuación, se destacan aquellas moléculas liberadas por las células gliales que son consideradas gliotransmisores, es decir, que participan en la modulación de la transmisión sináptica.



## Gliotransmisores

Diversos gliotransmisores participan en la modulación de la transmisión sináptica y en procesos de plasticidad, como el glutamato, adenosina trifosfato (ATP), D-serina, GABA, endocannabinoides y TNF- $\alpha$ . El glutamato fue uno de los primeros gliotransmisores identificados y produce efectos tanto en la terminal presináptica como en la postsináptica en rodajas agudas de hipocampo. Por ejemplo, el glutamato liberado por astrocitos potencia la transmisión excitadora en el giro dentado actuando a través de NMDAR presinápticos, lo que aumenta la *pr* (Jourdain et al., 2007). Otros reportes realizados en la sinapsis CA3-CA1 muestran que el glutamato astrocitario activa los receptores presinápticos mGluR; cuando se produce de forma simultánea la actividad postsináptica con la activación del mGluR se evidencia inducción de LTP

(Perea and Araque, 2007). Por otro lado, también se han evidenciado efectos postsinápticos de dicho gliotransmisor, actuando en los NMDAR postsinápticos (Fellin et al., 2004).

La liberación astrocitaria de D-serina también tiene un rol durante la plasticidad sináptica. Henneberger y col., evidenciaron que la D-serina liberada por astrocitos en la región CA1 del hipocampo controla la inducción de LTP, actuando como co-agonista de los NMDAR (Henneberger et al., 2010). Un reporte más reciente ha mostrado que la activación astrocitaria no sólo es necesaria para la plasticidad sináptica y para potenciar la adquisición de memorias, pero también es suficiente para inducir LTP en la sinapsis CA3-CA1, mediada por NMDAR y de forma dependiente de D-serina (Adamsky et al., 2018). Por otra parte, el rol del TNF- $\alpha$  como gliotransmisor se ha comentado previamente, dado su participación en procesos de PSH, específicamente en el *synaptic scaling* (Stellwagen and Malenka, 2006).

El ATP también es liberado por astrocitos de la región CA1 del hipocampo en respuesta a la estimulación de las colaterales de Schaffer, que actuando en receptores presinápticos P2Y produce supresión homosináptica y heterosináptica (Zhang et al., 2003). Otras evidencias establecen que una vez liberado, el ATP es convertido a adenosina, que puede actuar en receptores presinápticos A1 o A2A para deprimir o potenciar la transmisión sináptica excitadora, respectivamente (Pascual et al., 2005; Panatier et al., 2011). El ATP y las vías señalización purinérgicas serán abordadas con más detalle en un apartado posterior.

Estos son sólo algunos ejemplos, que muestran que un único gliotransmisor puede ejercer múltiples efectos dependiendo el sitio de acción y la activación de receptores (para revisión: Araque *et al.*, 2014). Recientemente Covelo y col. han demostrado que un mismo astrocito hipocampal es capaz de liberar diferentes gliotransmisores (glutamato y ATP) en función de las características temporales y de frecuencia de la actividad neuronal, lo que produce una regulación bifásica de la *pr* en sinapsis de CA3-CA1 (Covelo and Araque, 2018). De esta manera, apoyan el concepto de que el patrón de actividad neuronal puede ser codificado por los astrocitos, quienes responden liberando diferentes gliotransmisores para regular de manera diferencial la función sináptica (Covelo and Araque, 2018).

La liberación de gliotransmisores está mediada por varios mecanismos: exocitosis dependiente de  $Ca^{2+}$ , transportadores de membrana, y la apertura de una amplia

gama de canales, que incluyen receptores purinérgicos P2X<sub>7</sub> (P2X<sub>7</sub>R), canales de aniones regulados por volumen, canales de Cl<sup>-</sup> dependientes de Ca<sup>2+</sup> bestrofina1, hemicanales de conexina y panexones (Verkhatsky et al., 2016).

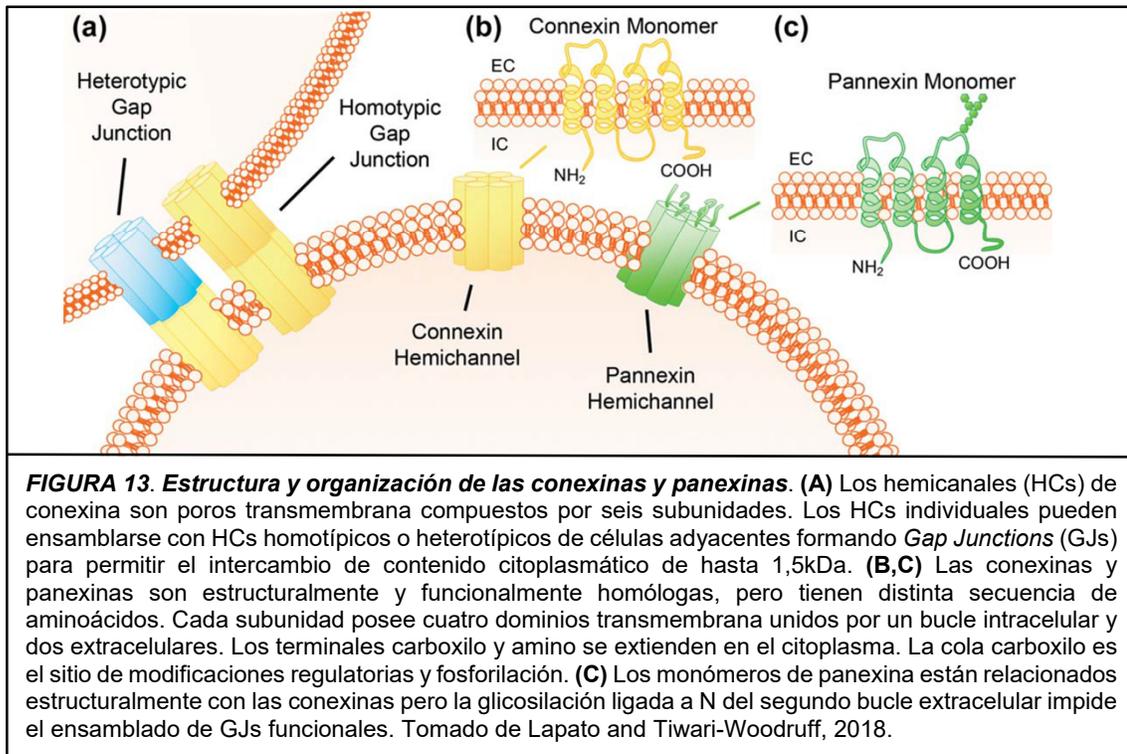
### **Conexinas y panexinas**

Las conexinas (Cxs) y las panexinas (Panxs) son dos familias de proteínas que forman poros transmembrana hexaméricos permeables a iones, metabolitos, segundos mensajeros y mediadores purinérgicos de hasta ~1kDa (Loewenstein, 1981; Bao et al., 2004). Estructuralmente, cada subunidad contiene 4 dominios transmembrana unidos por dos bucles extracelulares y uno intracelular (*Figura 13B, 13C*). Las conexinas se presentan de forma funcional bajo dos conformaciones: 1) como canales de unión en hendidura o canales intercelulares (*Gap Junctions* -GJs-), formados por el ensamblado de dos canales únicos que comunican los citoplasmas de células adyacentes y posibilita su acoplamiento funcional (*Figura 13A*) y 2) como canales únicos no ensamblados en la superficie celular (denominados conexones o hemicanales -HCs-) generando una vía de comunicación directa entre el citoplasma y el medio extracelular (*Figura 13B*). Por otra parte, las panexinas se encuentran fundamentalmente formando canales únicos no ensamblados (panexones). Estas proteínas fueron descubiertas en el año 2000 como homólogas a las inexas, proteínas formadoras de GJs en los invertebrados; sin embargo, no se ha comprobado que las panexinas formen GJs en mamíferos *in vivo*, lo que se debería a que sus residuos glicosilados impiden el ensamblaje de dos panexones (*Figura 13C*) (Panchin et al., 2000; Orellana et al., 2009; Giaume et al., 2013).

### **Expresión de conexinas y panexinas en el SNC**

Las conexinas constituyen miembros de una familia multigénica (al menos 20 en mamíferos), se denominan según su peso molecular y son expresadas en forma tejido-específica (Bennett et al., 1991, 2003). En el SNC las células gliales, particularmente los astrocitos, son la población celular con la más elevada expresión de conexinas (Giaume and McCarthy, 1996). En el cerebro adulto, la Cx43 y la Cx30 son las principales en los astrocitos y proveen el acoplamiento intercelular a través de la formación de GJs (Nagy et al., 1999; Rouach et al., 2008). La expresión de la Cx43 y la Cx30 es dependiente de la región estudiada y del desarrollo (Nagy et al., 1999). Por ejemplo, mientras los niveles de Cx43 se detectan desde estados embrionarios en ratas, la Cx30 aparece luego del día postnatal 15 (Nagy et al., 1999; Kunzelmann

et al., 1999). Se destaca que en cultivo primario los astrocitos sólo expresan la Cx43, detectándose la Cx30 después de 10-11 semanas en cultivo (Giaume et al., 1991; Kunzelmann et al., 1999). Sin embargo, se ha reportado la detección de Cx30 en astrocitos de 3 semanas después de una semana de co-cultivo con neuronas (Koulakoff et al., 2008).



Las conexinas también se expresan en oligodendrocitos (Cx29, Cx32, Cx47) y en microglía (Cx32, Cx36, Cx43) (Lapato and Tiwari-Woodruff, 2018). Los conexones compuestos por un tipo de conexina pueden formar GJs con conexones compuestos por una conexina diferente lo que define a las uniones heterotípicas (*Figura 13A*) (Nagy et al., 1999). Se conoce la existencia de uniones entre diferentes tipos de células gliales a través de GJs heterotípicas (Nagy et al., 2003; Lapato and Tiwari-Woodruff, 2018). Las neuronas también expresan varios tipos de conexinas siendo la Cx36 la más importante en la formación de GJs y el acople eléctrico entre neuronas en el cerebro (Bruzzone et al., 2003; Connors and Long, 2004; Pereda, 2014).

En relación con las panexinas, se han identificados tres miembros de la familia en mamíferos: Panx1-3. La Panx1 se expresa de forma ubicua, la Panx2 específicamente en el cerebro y la Panx3 en piel y cartílago incluyendo osteoblastos y fibroblastos sinoviales (Baranova et al., 2004; Barbe, 2006; Penuela et al., 2007). La expresión de las panexinas también es dependiente del desarrollo en el SNC, siendo la Panx1 más abundante durante las etapas tempranas del desarrollo y la Panx2 durante el desarrollo más tardío (Vogt et al., 2005; Penuela et al., 2007). Panx1 y Panx2 son particularmente abundantes en la corteza, hipocampo, tálamo reticular, neuronas motoras del tallo cerebral y mesencéfalo, el núcleo supraóptico y supraquiasmático del hipotálamo y el cerebelo. En el hipocampo, se encuentran altamente expresadas tanto en neuronas piramidales e interneuronas (Barbe, 2006).

La Panx1 es la más ampliamente estudiada y se conoce que forma panexones funcionales que median el intercambio de moléculas entre el citoplasma y el medio extracelular (MacVicar and Thompson, 2010). A nivel celular se han identificado panexones funcionales en neuronas piramidales y en astrocitos (Huang et al., 2007; Thompson et al., 2008). En neuronas, se ha reportado que se acumulan en las PSD, donde co-localizan con receptores de glutamato y proteínas scaffold como la PSD-95 (Zoidl et al., 2007). La Panx1 también se expresa en oligodendrocitos y en microglía (Sáez et al., 2003; Giaume et al., 2013).

### **Redes astrogliales de conexinas**

Las ondas de  $\text{Ca}^{2+}$  intercelulares consisten en aumentos de la concentración citoplasmática de  $\text{Ca}^{2+}$  que son comunicados entre las células y son importantes para la fisiología normal en una variedad de órganos incluyendo el cerebro. La presencia de GJs es importante para la propagación intercelular de las mismas. En los astrocitos están mediadas principalmente por Cx43 y Cx30, y se sugieren importantes para la modulación de la transmisión sináptica, regulación del flujo sanguíneo y del desarrollo (Leybaert and Sanderson, 2012). Se ha visto que las redes astrogliales mediadas por GJs formadas por Cx30 y Cx43 son importantes para facilitar la remoción de glutamato y  $\text{K}^+$  durante la actividad sináptica, modulando la excitabilidad neuronal, la *pr* y la inserción de AMPAR en el hipocampo (Pannasch et al., 2011). Otros estudios utilizando animales *knock-out* (KO) para la Cx43 han planteado la importancia de las GJs astrocitarias para las interacciones neuro-gliales relacionadas a funciones sensoriales y para la plasticidad en el sistema vibril del ratón (Han et al., 2014). Se

han observado cambios en la eficacia de la transmisión sináptica glutamatérgica en la región CA1 del hipocampo, específicamente en el contenido quantal del glutamato, sugiriendo un rol de las redes astrogiales acopladas por Cx43 en modular los *pools* presinápticos de glutamato (Chever et al., 2014b).

### **Propiedades de los conexones y panexones**

Los poros formados por los conexones son relativamente grandes, poseen conductancias que varían según el tipo de conexina, siendo de ~220pS para la Cx43 (Contreras et al., 2003). En cuanto a la Panx1, forma canales no selectivos con una alta conductancia unitaria de ~550pS (reconociéndose al menos cuatro sub-estados con 5%, 25%, 30% y 90% de la conductancia máxima) (Bao et al., 2004).

Los conexones tienden a estar cerrados a potenciales de membrana negativos, altas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular o de iones  $\text{H}^+$  intracelulares, con bloqueantes de GJs o por fosforilación de proteínas. En cambio, su apertura se produce a potenciales de membrana positivos y a bajas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (Sáez et al., 2003). Por otra parte, aumentos del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular desencadenan apertura de HCs de manera indirecta (De Vuyst et al., 2009). Los HCsCx43 son permeables a moléculas como el ATP, glutamato y D-serina (Ye et al., 2003; Kang et al., 2008; Meunier et al., 2017).

A diferencia de los conexones, los canales de Panx1 se abren a potenciales de membrana negativos y a concentraciones fisiológicas de  $\text{Ca}^{2+}$  (Bruzzzone et al., 2003; Bao et al., 2004; Bruzzzone et al., 2005). Se conoce que estos canales no selectivos permiten el pasaje de ATP y podrían mediar también la liberación de glutamato, D-serina y ácido araquidónico y sus metabolitos (Bao et al., 2004; Jiang et al., 2007; Pan et al., 2015; Wei et al., 2016). En los últimos años se ha consolidado su rol como una vía de liberación del ATP importante en varios tipos celulares, incluyendo neuronas y astrocitos, así como células T, eritrocitos, células epiteliales de las vías respiratorias, células endoteliales, entre otras (Kawamura et al., 2010; Iglesias et al., 2009; Sandilos and Bayliss, 2012). Gran variedad de estímulos producen la apertura de estos canales, entre ellos, el estiramiento de la membrana, altas concentraciones de  $\text{K}^+$  extracelular, aumentos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ , activación de NMDAR, así como la isquemia (Bao et al., 2004; Locovei et al., 2006; Thompson et al., 2006, 2008). De manera importante, su apertura puede gatillarse por activación de  $\text{P2X}_7\text{R}$  y permitir el flujo de ATP en astrocitos, que una vez liberado al intersticio, activa la apertura de

nuevos panexones pudiendo promover la liberación de más ATP (Pelegrin and Surprenant, 2006; Locovei et al., 2007; Garre et al., 2010). La activación de Panx1 también puede darse a través de los receptores P2Y (Locovei et al., 2006).

Previamente se pensaba que la apertura de conexones y panexones hacia el espacio extracelular podría ser deletéreo para las células por la pérdida de metabolitos, el colapso de los gradientes iónicos y la entrada de  $\text{Ca}^{+2}$ . Sin embargo, diferentes evidencias en los últimos años han indicado que se abren tanto en condiciones fisiológicas como patológicas y que su apertura es funcional o deletérea dependiendo de la situación (Cheung et al., 2014). En condiciones patológicas, los canales de Cx43 y Panx1 tanto gliales como neuronales ha sido implicadas en procesos de hipoxia/isquemia, de actividad epiléptica, procesos inflamatorios y en modelos de enfermedades neurodegenerativas (Thompson et al., 2008; Retamal et al., 2007; Orellana et al., 2011b; Abudara et al., 2015). Por otra parte, su apertura también se ha reportado en condiciones fisiológicas. Por ejemplo, se ha visto que la liberación de ATP a través de panexones por los astrocitos, actuando de manera autocrina, inicia una onda lenta de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular que se propaga por GJs de Cx43 y Cx30 (Torres et al., 2012). La liberación de ATP a través de conexones también contribuye a la propagación de las ondas de  $\text{Ca}^{2+}$  astrogliales (Cotrina et al., 1998; Leybaert and Sanderson, 2012). Por otra parte, la apertura de HCs con la consecuente liberación de ATP se ha reportado en condiciones fisiológicas tanto en la retina, donde promueve la mitosis y la proliferación de la retina neural, como en el oído interno, donde sería necesario para la propagación a distancia de las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  (Pearson et al., 2005; Anselmi et al., 2008).

### **Conexones y panexones como vías para la gliotransmisión**

La Cx43 y la Panx1 han sido involucradas recientemente en procesos de plasticidad sináptica al brindar una vía para la liberación de gliotransmisores como el ATP, el glutamato y la D-serina.

Diferentes reportes evidencian que la activación de HCsCx43 se asocia a la liberación de ATP (Kang et al., 2008; Chever et al., 2014a). Específicamente, se ha reportado que el ATP es liberado de forma tónica a través de HCsCx43 astrocitarios en el hipocampo, donde regula la transmisión sináptica excitadora entre las colaterales de Schaffer y las neuronas piramidales CA1 (Chever et al., 2014a). En este sentido, se ha observado que el bloqueo de los HCsCx43 disminuye la amplitud de los EPSCs

registrados en neuronas de CA1, indicando que la liberación de ATP vía HCsCx43 astrocitarios potencia la transmisión sináptica (Chever et al., 2014a). Otros estudios realizados en el bulbo olfatorio han evidenciado que la activación de los HCsCx43 aumenta la amplitud de las oscilaciones lentas neuronales e impacta en la frecuencia de disparo de las células mitrales, y proponen que este efecto es mediado por la liberación de ATP/adenosina vía HCsCx43 (Roux et al., 2015).

Recientemente se ha reportado que la activación de HCsCx43 también se asocia a la liberación de D-serina, que impacta en la LTP dependiente de NMDAR. Estudios realizados en la corteza prefrontal evidenciaron que la inhibición de los HCsCx43 astrocitarios utilizando herramientas farmacológicas y moleculares reduce el LTP en sinapsis excitadoras, que puede revertirse mediante el agregado extracelular de D-serina (Meunier et al., 2017).

Por otra parte, la activación de HCsCx43 astrocitarios también puede mediar la liberación de glutamato (Ye et al., 2003). Se ha evidenciado que la apertura de HCsCx43 en astrocitos de hipocampo (CA1) impacta en la actividad sináptica neuronal durante la activación microglial, efecto que requiere de la liberación de citoquinas proinflamatorias (IL-1beta y TNF- $\alpha$ ) desde la microglía y de la liberación glial de glutamato mediante un proceso dependiente de HCs (Abudara et al., 2015).

La participación de los HCsCx43 en la plasticidad sináptica también ha sido evidenciada en estudios *in vivo*. Por ejemplo, el bloqueo farmacológico de los HCsCx43 en la amígdala basolateral altera la consolidación de la memoria al miedo en la rata, y la administración de gliotransmisores restituye dicha función, sugiriendo una participación de los estos HCs en la función cognitiva (Stehberg et al., 2012). Asimismo, se ha reportado que la inhibición de los HCsCx43, mediante la microinfusión intraventricular de un péptido bloqueante (Gap19), deteriora la memoria espacial a corto plazo (Walrave et al., 2016).

Varios estudios han planteado que los panexones son importantes como vías de liberación de ATP en la plasticidad sináptica. El ATP liberado vía panexones modula la excitabilidad y la plasticidad sináptica mediante la regulación de la activación postsináptica de NMDAR (Kawamura et al., 2010; Prochnow et al., 2012). Además, se ha reportado que animales KO para la Panx1 presentan una potenciación de la LTP dependiente de NMDAR en el hipocampo, mientras que existe una deficiencia en la

inducción de LTD en ratones adultos (Prochnow et al., 2012; Ardiles et al., 2014). Resultados similares se obtienen mediante el bloqueo farmacológico de la Panx1, indicando que esta proteína podría regular el umbral para inducción de la plasticidad sináptica (Ardiles et al., 2014). Recientemente, se ha evidenciado que la deficiencia de la Panx1 produce cambios en la distribución sináptica en comparación con la no-sináptica de la subunidad GluN2 de los NMDAR, así como cambios en la contribución relativa de las subunidades GluN2 en la LTP y LTD en las colaterales de Schaffer (Gajardo et al., 2018). Por otra parte, la deficiencia de Panx1 lleva a alteraciones comportamentales, reportándose una potenciación de la ansiedad, mayor dificultad en el reconocimiento de objetos y déficits en la memoria espacial (Prochnow et al., 2012). Asimismo, animales Panx1 KO presentan una disminución en la flexibilidad del comportamiento, específicamente en el aprendizaje reverso de la información espacial previamente adquirida, lo que es concordante con la alteración en la LTD (Gajardo et al., 2018). Por lo anteriormente expuesto, los canales de Panx1 serían importantes para la modulación de fenómenos dependientes de actividad como la plasticidad sináptica y el comportamiento.

En conjunto, estos estudios apoyan la contribución de los conexones y los panexones como vías para gliotransmisión en la sinapsis tripartita.

### **ATP y señalización purinérgica**

Numerosa evidencia indica que el ATP y la señalización purinérgica están involucrados en diversas funciones del SNC, incluyendo la neurotransmisión, la neuromodulación y la inflamación (Fields and Stevens, 2000). Como fue mencionado, el ATP es liberado tanto por neuronas como por células gliales y se ha explorado su importancia para la interacción neuro-gliar mediante la señalización autocrina y paracrina. El ATP y sus productos de hidrólisis, el ADP y la adenosina, pueden activar diferentes tipos de receptores: el ATP y ADP se unen a receptores P2, mientras que la adenosina se une a los P1, presentando muchas veces efectos antagónicos (Fields and Burnstock, 2006). Específicamente, los efectos del ATP están mediados por dos familias de receptores purinérgicos, los P2Y, receptores de tipo metabotrópicos acoplados a proteínas G (P2Y<sub>1-8</sub>) y los P2X ionotrópicos (P2X<sub>1-7</sub>); presentan permeabilidades relativas a los iones Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> según cada subtipo (Burnstock, 2007). Los receptores P2X muestran una permeabilidad relativamente elevada al Ca<sup>2+</sup> pudiendo mediar un influjo sustancial al Ca<sup>2+</sup> en condiciones de

reposo. Una amplia gama de receptores purinérgicos existen tanto en células gliales, incluyendo oligodendrocitos, astrocitos y microglía, como en neuronas en el SNC, presentando patrones complejos de expresión (Fields and Burnstock, 2006).

El ATP de origen astrocitario facilita la transmisión glutamatérgica por efectos directos mediados por los receptores P2X presinápticos y postsinápticos (Gordon et al., 2005; Ota et al., 2013; Accorsi-Mendonça et al., 2013). También, hay evidencias de un impacto positivo del ATP de origen glial en la actividad y el tráfico de los AMPAR (Boué-Grabot and Pankratov, 2017). Por otra parte, el ATP de origen glial puede disminuir el tono GABAérgico y la transmisión sináptica inhibitoria, por lo que se ha propuesto que el ATP modula el balance E/I, hacia la excitación y por tanto facilita la inducción de LTP (Lalo et al., 2018). De manera opuesta, se ha reportado que el ATP actuando en receptores postsinápticos P2X, puede disminuir los NMDAR a través de fosforilación dependiente de  $Ca^{2+}$  y disminuir la magnitud del LTP (Lalo et al., 2016). Por tanto, el ATP astrocitario, lleva a modificaciones bidireccionales de la fuerza sináptica, teniendo un rol principal como neuromodulador.

Como se mencionó, el ATP puede ser liberado a través de canales de Panx1. Asimismo, los canales Panx1 pueden ser activados por el ATP extracelular por activación de los P2X<sub>7</sub>R (Pelegrin and Surprenant, 2006; Locovei et al., 2007). Sin embargo, niveles elevados de ATP extracelular también pueden actuar mediante retroalimentación negativa inhibiendo la actividad de los canales Panx1 directamente. Los P2X<sub>7</sub>R interactúan con la Panx1 tanto físicamente como funcionalmente, a través de señalización intracelular de  $Ca^{2+}$  (Silverman et al., 2009). Específicamente, se ha demostrado la liberación de ATP a través de panexones en astrocitos por activación de los P2X<sub>7</sub>R (Iglesias et al., 2009).

## HIPÓTESIS

Esta investigación propone un papel protagónico de la interacción neuro-glial en la regulación homeostática de la función presináptica. Se postula que la supresión crónica de la actividad neuronal promueve la liberación de factores solubles a través de canales gliales formados por conexina 43 y/o panexina 1 que modulan la liberación de neurotransmisor presináptica. En particular, se propone al ATP de origen glial como importante mediador en este ajuste compensatorio de la función sináptica.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Caracterizar el rol de la gliotransmisión mediada por canales gliales formados por conexina 43 y/o panexina 1 en la inducción y/o mantenimiento de la plasticidad sináptica homeostática.

### Objetivos específicos

1. Determinar la relevancia de las células gliales en la PSH, en particular, de factores solubles liberados al medio extracelular.
2. Investigar si los canales gliales formados por conexina 43 y/o panexina 1 están implicados en la inducción y/o mantenimiento de la PSH.
3. Analizar la contribución relativa de canales de panexina 1 neuronales y gliales en esta forma de plasticidad.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Animales

Se realizaron cultivos disociados de hipocampo de ratas de la cepa *Wistar* criadas en la Unidad de Reactivos y Biomodelos de Experimentación (URBE) de la Facultad de Medicina, Udelar. También se utilizaron ratones C57BL/6N transgénicos *knock-out* para la *Panx1* (*Panx1* KO). Para ello, se generaron ratones homocigotos *Panx1* KO en la Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación (UATE) del Instituto Pasteur de Montevideo, a partir de embriones heterocigotos obtenidos de Genentech, Inc, (USA).

### Consideraciones éticas

Se realizaron todos los esfuerzos para disminuir el número de animales empleados. Los procedimientos experimentales se cumplen en acuerdo a las normativas éticas vigentes a nivel internacional organizadas en la Ordenanza Universitaria “Uso de animales en experimentación, docencia e investigación Universitaria”, CDC Exp 4332/99, Diario Oficial N°25467, Feb. 21/00, Udelar, <http://www.csic.edu.uy/chea>. El protocolo de experimentación utilizado en esta investigación ha sido aprobado por la Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA): 070153-000127-15, titulado “*Procedimiento para obtener co-cultivos neurona-glia a partir de hipocampo murino*”. El manejo de los animales fue realizado por investigadores que cuentan con acreditación de la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA) para el uso de animales de experimentación.

### Cultivos celulares

#### Obtención de células de hipocampo para cultivo

Se realizaron cultivos disociados de hipocampo provenientes de animales neonatos en el día de nacimiento o el día posterior al nacimiento (P0 y P1, respectivamente) (Branco et al., 2008). Los animales fueron sacrificados mediante decapitación. En una cámara de flujo laminar, se extrajo el cerebro y se colocó en medio de disección compuesto por HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution, Gibco) + HEPES (10mM, Sigma). Se disecaron ambos hipocampos, se fragmentaron en 4-6 piezas cada uno y se incubaron en 3 ml de una solución enzimática compuesta por papaína (20 unidades, Sigma), EDTA (0.5mM), CaCl<sub>2</sub> (1,5mM), L-cisteína (0,2mg/ml) y DNAsa (0,1 mg/μl), durante 18 minutos a 37°C. El tratamiento enzimático se detuvo lavando con

medio BME (Basal Medium Eagle, Gibco) suplementado con glucosa (16mM, Sigma), suero fetal bovino (FBS, 10%), piruvato (1mM, Gibco), HEPES (0,01M, Sigma), Penicilina/Estreptomicina (Penicilina 100U/ml; Estreptomicina 100µg/ml, Gibco). Posteriormente se disgregó mecánicamente el tejido en medio NB (Neurobasal, Gibco) suplementado con glucosa (34mM), B27 (2,5%, Gibco), glutamax (2mM, Gibco) y Penicilina/Estreptomicina (Penicilina 100U/ml; Estreptomicina 100µg/ml, Gibco) y se centrifugó (1000rpm, 5min). El pellet celular se re-suspendió en 2 ml de medio NB suplementado como fue mencionado anteriormente y se contaron las células en una cámara de Neubauer. Las células se mantuvieron a 37°C en una estufa de cultivo, con atmósfera saturada de agua, 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub>. Todos los medios de cultivo y la solución enzimática fueron filtrados previamente a su uso.

Las células se sembraron sobre cubreobjetos de vidrio (diámetro 12mm, espesor N°1) en placas de 24 pocillos. Los cubreobjetos fueron previamente preparados mediante inmersión en ácido nítrico *overnight*, seguido de 20 lavados con agua desionizada y 15 lavados con etanol 95-99%.

#### Co-cultivos neurona/glía

Los cubreobjetos colocados en placas de 24 pocillos se trataron con una solución de colágeno de cola de rata (23%), poli-D-lisina (20µg/ml, Sigma) y ácido acético (3mM) en agua. Para obtener cultivos disociados de hipocampo compuestos por células neuronales y gliales (co-cultivos neurona/glía) se siguieron los siguientes pasos:

##### *a) Células gliales en botellas*

Se incubaron las células obtenidas como fue descrito previamente en botellas de 25cm<sup>2</sup> en medio BME suplementado durante 7-14 días hasta la formación de una monocapa.

##### *b) Monocapa de células gliales en placas*

Cuando el cultivo celular en botellas alcanzó la confluencia mencionada, se realizaron 2 lavados con PBS (buffer fosfato salino) y se tripsinizó durante 1-2 minutos a 37°C para lograr el decolamiento de las células (Trypsin-EDTA 0.05%, Gibco). Se completó la disgregación de forma mecánica, se colectaron las células por centrifugación (1000 rpm, 5min) y se sembraron 4 x 10<sup>4</sup> células por pocillo en placas de 24 pocillos en medio BME suplementado. Se incubaron en una estufa a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, durante 5-7 días hasta obtener un 70% de confluencia aproximadamente.

c) *Monocapa de células neuronales*

Por último, se procedió a sembrar neuronas sobre la monocapa de células gliales. Siguiendo el procedimiento detallado previamente, se obtuvo el pellet celular a partir de hipocampos de animales P0-P1 y se sembraron  $3,5 \times 10^4$  células por pocillo en medio NB suplementado. A las 24hs de sembradas se trató el cultivo con el antimetabólico citosina arabinosa (Ara-C,  $4\mu\text{M}$ ) para evitar el crecimiento excesivo de células gliales, permaneciendo 14-16 días *in vitro* (DIV) en la estufa a  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ .

Cultivos enriquecidos en neuronas

Previo a realizar el cultivo, los cubreobjetos fueron tratados *overnight* con una solución 1:200 de poli-D-lisina en agua. Posteriormente se realizaron dos lavados con agua de 2hs cada uno. Se obtuvieron células de hipocampo de neonatos de ratas con el procedimiento descrito y se sembraron  $1,0 \times 10^5$  células por pocillo en medio NB suplementado. A las 24hs se trataron con Ara-C ( $4\mu\text{M}$ ) para evitar el crecimiento de células gliales y se incubaron a  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , por 14-16 DIV.

Datos obtenidos previamente en el laboratorio con relación al grado de enriquecimiento de los cultivos neuronales muestran que éstos cuentan con un 2,6% de astrocitos, 0,9% de oligodendrocitos y un 2,7% de microglía, lo que refleja el alto grado de enriquecimiento obtenido.

Cultivos con ratones Panx1 KO

Con el fin de analizar la contribución relativa de los canales de Panx1 gliales y neuronales se prepararon diferentes tipos de co-cultivos siguiendo el procedimiento mencionado previamente:

a) *Co-cultivos Panx1 KO*

Co-cultivos neurona/glía donde tanto la monocapa de células gliales como las neuronas provenían de hipocampos de neonatos de ratones *Panx1 KO*.

b) *Co-cultivos Glia Panx1 KO – Neurona Panx1 WT*

Co-cultivos neurona/glía donde la monocapa de células gliales provenía de hipocampos de neonatos de ratones *Panx1 KO* y las neuronas sembradas posteriormente derivaban de hipocampos de ratas neonatas *Wistar* no manipuladas genéticamente (*Panx1 wild-type -WT*).

c) *Co-cultivos Glia Panx1 WT – Neurona Panx1 KO*

Co-cultivos neurona/glía donde la monocapa de células gliales provenía de hipocampos de ratas neonatas Wistar (Panx1 WT) y las neuronas sembradas posteriormente derivaban de hipocampos de neonatos de ratones Panx1 KO.

### Inducción de PSH

La PSH se induce provocando la inactividad crónica del circuito mediante la aplicación de TTX ( $1\mu\text{M}$ ; 24-36hs) en cultivos luego de 13-15 DIV (Turrigiano et al., 1998; Viturera et al., 2011; Tokuoka and Goda, 2008). En todos los experimentos se utilizaron cultivos controles de la misma edad no tratados como control de la actividad sináptica basal.

### Obtención de medio condicionado

#### *a) Medio condicionado de co-cultivos neurona/glía*

Se obtuvieron co-cultivos neurona/glía de ratas WT. A los 14-15 DIV se recolectó el medio de cultivos tratados con TTX ( $1\mu\text{M}$ , 24-36hs) (medio co-cultivo post-TTX) y de cultivos no tratados (medio co-cultivo control). Se centrifugó el medio (1000rpm, 5 minutos) y se utilizó para tratar cultivos enriquecidos en neuronas, reemplazando la mitad del medio de cultivo previo.

#### *b) Medio condicionado glial*

Se prepararon cultivos compuestos por una monocapa de células gliales como se describió previamente, manteniéndose en estufa de cultivo a  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ . Los cultivos fueron tratados con Ara-C ( $4\mu\text{M}$ ) cuando alcanzaron la confluencia para evitar el crecimiento excesivo de células gliales. A los 20 DIV se recolectó el medio de cultivos gliales tratados con TTX ( $1\mu\text{M}$ , 24-36hs) (medio glía post-TTX) y de cultivos no tratados (medio glía control), se centrifugó (1000rpm, 5 min) y se utilizó para tratar los cultivos enriquecidos en neuronas, reemplazando la mitad del medio de cultivo previo.

## **Farmacología**

Para el bloqueo farmacológico de los canales de conexinas y panexinas se trataron co-cultivos neurona/glía de 13-15 DIV con los agentes detallados a continuación, 15 minutos previo al agregado de TTX ( $1\mu\text{M}$ , 24-36hs), permaneciendo en el medio durante todo el tratamiento con TTX. Se utilizó el fármaco Carbenoxolona (CBX;  $50\mu\text{M}$ ), como bloqueante de amplio espectro de conexinas y panexinas (Michalski and Kawate, 2016). Para el bloqueo de la Cx43 se utilizaron dos péptidos miméticos:

Gap26 (150 $\mu$ M), inhibe HCxCx43 y GJsCx43 (Giaume et al., 2013); Gap19 (300 $\mu$ M), inhibe únicamente HCxCx43 (Abudara et al., 2014). Para el bloqueo de canales de Panx1 se utilizó el fármaco Probenecid (PBD; 500  $\mu$ M) (Silverman et al., 2008) y el péptido mimético <sup>10</sup>Panx1 (400  $\mu$ M). Los péptidos miméticos fueron sintetizados por GenScript. Los fármacos CBX y PBD adquiridos en Sigma. Para el estudio del papel del ATP extracelular se utilizaron: MgATP (500  $\mu$ M) y Benzoyl ATP (BzATP; 10  $\mu$ M) adquiridos en Sigma.

### **Inmunocitoquímica**

Cultivos de 14-16 DIV fueron fijados en paraformaldehído (PFA, 4%) durante 15 minutos a temperatura ambiente (TA). Una vez fijados, se permeabilizaron con PBS-Tritón 0,1% y se bloquearon con una solución de PBS-Tritón 0,1% conteniendo 0,2 M de glicina y 10% de FBS (30 minutos a TA). Los anticuerpos primarios se agregaron en solución de PBS-Tritón 0,1% + 5% FBS y se incubaron durante 2 horas a TA. Luego de 3 lavados de 5 minutos con PBS-Tritón 0,1%, las células se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados a diferentes fluorocromos en solución de PBS-Tritón 0,1% + 5% FBS durante 1 hora a TA. Se realizaron varios lavados con PBS-Tritón 0,1% y PBS y posteriormente los cubreobjetos fueron montados en portaobjetos con medio de montaje de base acuosa (Fluoromount™, Sigma). Los anticuerpos empleados y las diluciones se detallan en la *Tabla 1*.

### **Evaluación de la función presináptica**

La función presináptica a nivel de sinapsis individuales se estimó mediante el análisis de la inmunofluorescencia asociada al transportador vesicular de glutamato 1 (vGlut-1). El número de copias de vGlut-1 por VS se encuentra bajo estricto control, por lo que éste resulta un método confiable para estimar la cantidad relativa de VS en una terminal (Mutch et al., 2011; de Jong et al., 2012). Por un lado, la abundancia de vGlut-1 en las VS se correlaciona directamente con la *pr* (Herman et al., 2014). Asimismo, la abundancia de vGlut-1 por VS determina la capacidad de carga vesicular de glutamato y por tanto la cantidad de glutamato liberado por VS, proporcionando un mecanismo presináptico para regular el tamaño quantal (Wojcik et al., 2004; Wilson, 2005; De Gois, 2005). La abundancia de vGlut-1 es ajustada de forma compensatoria al modificar los niveles de actividad del circuito (Wilson, 2005; De Gois, 2005).

## Captación de Bromuro de Etidio

Para determinar variaciones en la expresión funcional de canales se utilizó la técnica de captación de bromuro de etidio (BrEt), un colorante que permea HCs (Contreras et al., 2002; Garre et al., 2010). Cultivos de 14-15 DIV fueron incubados en BrEt (2,5 $\mu$ M) durante 15 minutos a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, lavados con medio NB suplementado y fijados con PFA al 4% (15 minutos a TA). Posteriormente, los cultivos fueron marcados con DAPI (5 $\mu$ M, 10 minutos a TA) y se realizaron varios lavados con PBS-Tritón 0,1% y PBS. Finalmente, los cubreobjetos se montaron en portaobjetos con Fluoromount™ y se obtuvieron imágenes en microscopía confocal.

Anticuerpo	Especie	Dilución	Referencia	Descripción
anti-vGlut-1	conejo	1:7000	Synaptic Systems #135303	Transportador vesicular de glutamato 1; marcador presináptico
anti-Homer1	ratón	1:500	Synaptic Systems #160011	Proteína Homer 1; marcador postsináptico
anti-MAP-2	pollo	1:1000	Abcam #ab5392	Proteína asociada a los microtúbulos 2; marcador dendritas y soma neuronal
anti-Panx1	conejo	1:200	Alomone #ACC-234	Proteína Panexina 1
anti-Cx43	conejo	1:100	Invitrogen #71-0700	Proteína Conexina 43
anti-GFAP-Cy3	ratón	1:1000	Sigma #C9205	Proteína glial fibrilar ácida, conjugado a fluorocromo Cy3
DyLight 649	pollo	1:300	Jackson #103-495-155	Anticuerpo secundario anti-chicken conjugado a DyLight 649
Alexa Fluor 488	conejo	1:500	Invitrogen #A-11070	Anticuerpo secundario anti-rabbit conjugado a Alexa Fluor 488
Alexa Fluor 568	ratón	1:500	Invitrogen #A10037	Anticuerpo secundario anti-mouse conjugado a Alexa Fluor 568

**TABLA 1.** Detalle de los anticuerpos primarios y secundarios utilizados en la inmunocitoquímica.

## Adquisición y análisis de imágenes

Las imágenes fueron adquiridas con microscopía confocal, técnica que permite obtener imágenes de mayor resolución y contraste en comparación con la microscopía óptica convencional (por la reducción de la luz de fondo fuera del plano focal), así como la posibilidad de controlar la profundidad del plano focal en la muestra, permitiendo su estudio tridimensional. Se utilizaron dos microscopios confocales del Instituto Pasteur de Montevideo:

-Microscopio Leica, modelo DMI6000, TCS-SP5, se utilizaron los láseres Argón 488nm, HeNe 543nm, HeNe 633nm y el objetivo 63X NA1.42 (NA: apertura numérica),

inmersión en aceite. Para la adquisición de imágenes se utilizó el software LAS AF Lite.

-Microscopio Zeiss, modelo Axio Observer Z1, LSM 800, se utilizaron los láseres 405nm, 488nm, 561nm y 640nm y el objetivo 63X NA1.4, inmersión en aceite. El software de adquisición fue el ZEN 2.1.

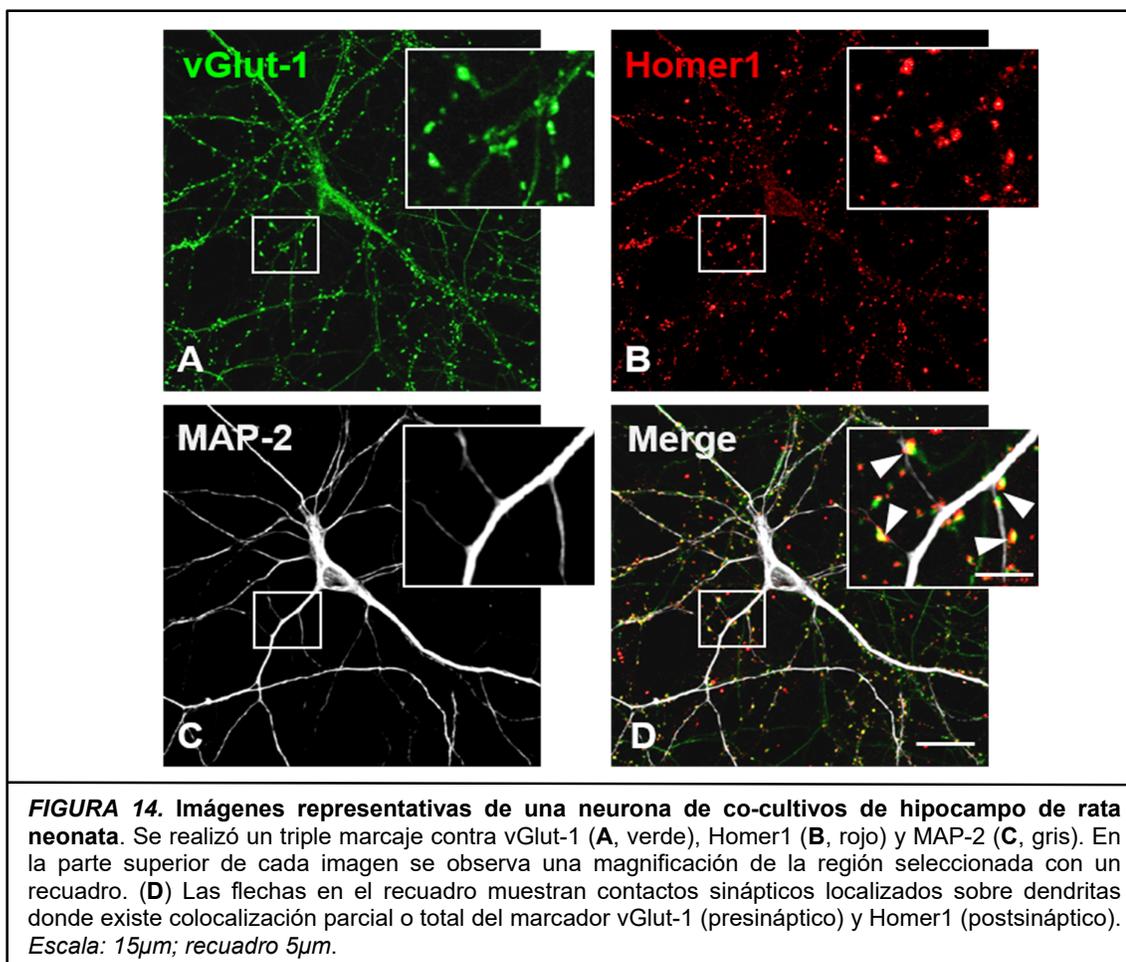
Se adquirieron *stacks* de imágenes confocales consecutivas a intervalos de 1  $\mu\text{m}$  y se realizaron proyecciones Z de intensidad máxima para el análisis empleando softwares detallados a continuación.

#### Inmunofluorescencia asociada vGlut-1

Para la cuantificación de la inmunofluorescencia asociada al marcador presináptico vGlut-1 se utilizó el software Fiji (Fiji Is Just ImageJ) (Schindelin et al., 2012). Para ello, se identificaron las sinapsis individuales como aquellas que presentaban colocalización parcial o completa entre los marcadores presináptico (vGlut-1) y postsináptico (Homer1) y se presentaban en contacto con las dendritas de una misma neurona identificadas con el marcador MAP-2 (proteína asociada a los microtúbulos 2, marcador de dendritas y soma neuronal) (*Figura 14*). Se midió la intensidad de fluorescencia media de vGlut-1 seleccionando manualmente 30-150 sinapsis por neurona con la herramienta ROI (Region Of Interest) y se promedió por neurona. Se analizaron un mínimo de 8 neuronas por condición en cada experimento independiente y se sustrajo la señal del fondo en cada imagen promediando la intensidad de fluorescencia de regiones sin marcaje.

#### Captación de BrEt

Para evaluar la captación de BrEt se analizó la fluorescencia del BrEt en células positivas para DAPI. Se distinguieron las neuronas de los astrocitos por su morfología utilizando el Contraste de Interferencia Diferencial (DIC) del microscopio confocal Zeiss. Se utilizó el software ICY (de Chaumont et al., 2012) para medir la intensidad media de fluorescencia del BrEt delimitando manualmente el área de captación de las células utilizando la herramienta ROI y se sustrajo la señal de fondo de áreas donde no se detecta captación celular. La captación de BrEt neuronal y astrocitaria se normalizó a la condición control.



### Inmunofluorescencia asociada a Panx1 y Cx43

Dado que la Panx1 se expresa tanto en neuronas como en astrocitos, se utilizó el software ICY para crear un protocolo de cuantificación que midiera la intensidad media de la inmunofluorescencia asociada a Panx1 en células positivas para GFAP (astrocitos) y positivas para MAP-2 (neuronas). Para analizar la inmunofluorescencia asociada a la Cx43 se utilizó el *plugin* de FIJI *Trainable Weka Segmentation* (Arganda-Carreras et al., 2017). Se midió la intensidad media de fluorescencia de la Cx43, el número de puntos detectados y el tamaño promedio de los mismos.

### **Análisis estadístico**

Todos los resultados se obtuvieron analizándose un mínimo de 8 células por condición en cada experimento. El número total de células analizadas y el número de experimentos independientes realizados se detalla en las figuras. Se utilizó el programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla California USA,

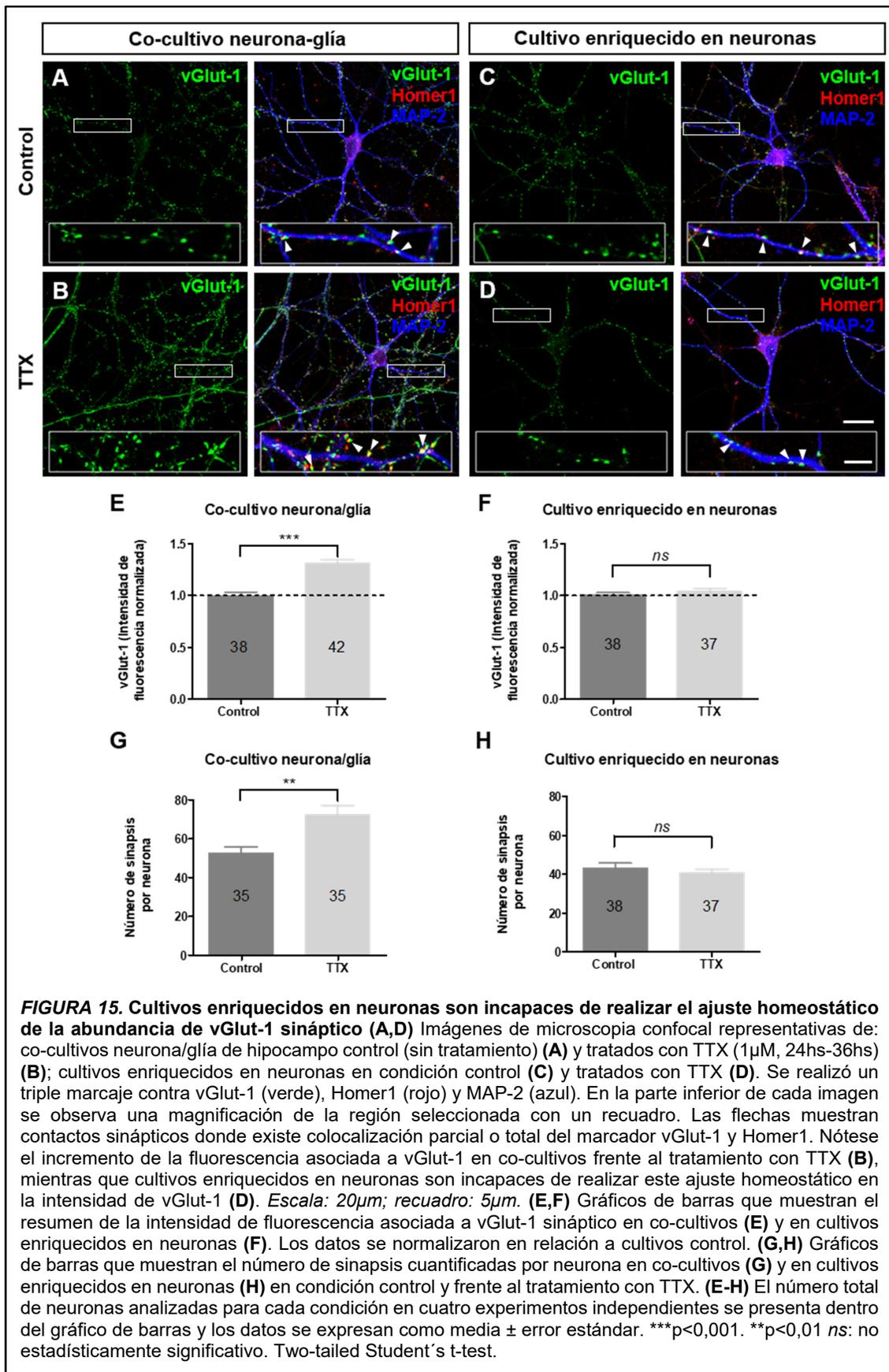
[www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)) para la confección de los gráficos y el análisis estadístico. Para la comparación entre dos grupos se realizó test *t*-Student no pareado y para la comparación entre varios grupos se aplicó ANOVA de una vía y posteriormente test de Tukey. Los datos se normalizaron a la condición control y se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM) y el valor *p* es indicado en cada caso, considerándose significativos valores de  $p < 0,05$ . En las figuras, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$ .

## RESULTADOS

### **Las células gliales son esenciales para la inducción y/o mantenimiento de la plasticidad homeostática presináptica.**

Para analizar la importancia de las células gliales en la regulación homeostática de la función presináptica se realizaron co-cultivos neurona/glía de hipocampo de rata neonata y cultivos enriquecidos en neuronas hipocampales, ambos fueron tratados con TTX luego de 13-14 DIV ( $1\mu\text{M}$ ; 24-36hs) para inducir PSH (Turrigiano et al., 1998; Tokuoka and Goda, 2008; Vitureira et al., 2011). Se utilizaron cultivos sin tratamiento como control de la función sináptica basal. Se realizó inmunocitoquímica contra tres proteínas: vGlut-1 (transportador vesicular de glutamato, marcador presináptico), Homer1 (proteína de la PSD, marcador postsináptico) y MAP-2 (proteína asociada a microtúbulos 2, marcador específico neuronal). Se cuantificó la inmunofluorescencia asociada a vGlut-1 en sinapsis individuales, definidas por la co-localización parcial o completa del marcador presináptico y el marcador postsináptico (ver recuadro magnificados de imágenes en *Figura 15A-D*). Como fue mencionado previamente, la abundancia de vGlut-1 presente en botones sinápticos se correlaciona directamente con la *pr* y el tamaño quantal, y se ajusta de manera compensatoria al modificar los niveles de actividad del circuito (Wilson et al., 2005; De Gois, 2005; Herman et al., 2014). En la *Figura 15 (A, B)* se observa que en condiciones de inactividad crónica (tratamiento con TTX) los co-cultivos neurona/glía incrementan la intensidad de fluorescencia asociada a vGlut-1 sináptico en comparación con cultivos control (sin tratamiento) (control  $1,00 \pm 0,03$ ; TTX  $1,30 \pm 0,03$ ;  $p < 0,001$ ; *Figura 15E*). Sin embargo, los cultivos enriquecidos en neuronas no incrementan la abundancia de vGlut-1 sináptico frente al tratamiento con TTX en comparación con cultivos control (control  $1,00 \pm 0,03$ ; TTX  $1,04 \pm 0,03$ ;  $p > 0,05$ ) (*Figura 15C, 15D, 15F*). En conjunto, estos resultados sugieren un papel esencial de las células gliales en la inducción y/o mantenimiento de la PSH.

En las mismas condiciones de experimentación, se evaluó también la cantidad de contactos sinápticos por neurona, observándose que en condiciones de inactividad crónica los co-cultivos presentan un incremento en el número de sinapsis por neurona (control  $52,49 \pm 3,33$ ; TTX  $72,29 \pm 4,88$ ;  $p < 0,01$ ) (*Figura 15G*).



En cambio, en cultivos enriquecidos en neuronas, el número de sinapsis cuantificadas no varía entre los cultivos control y los tratados con TTX (control  $43,08 \pm 2,67$ ; TTX  $40,59 \pm 1,78$ ;  $p > 0,05$ ) (*Figura 15H*).

De esta manera, resulta evidente que las células gliales son necesarias para que se produzca el ajuste compensatorio en la abundancia de vGlut-1 sináptico y del número de contactos sinápticos frente a la inactividad crónica del circuito.

### **Factores solubles liberados por las células gliales median la PSH presináptica.**

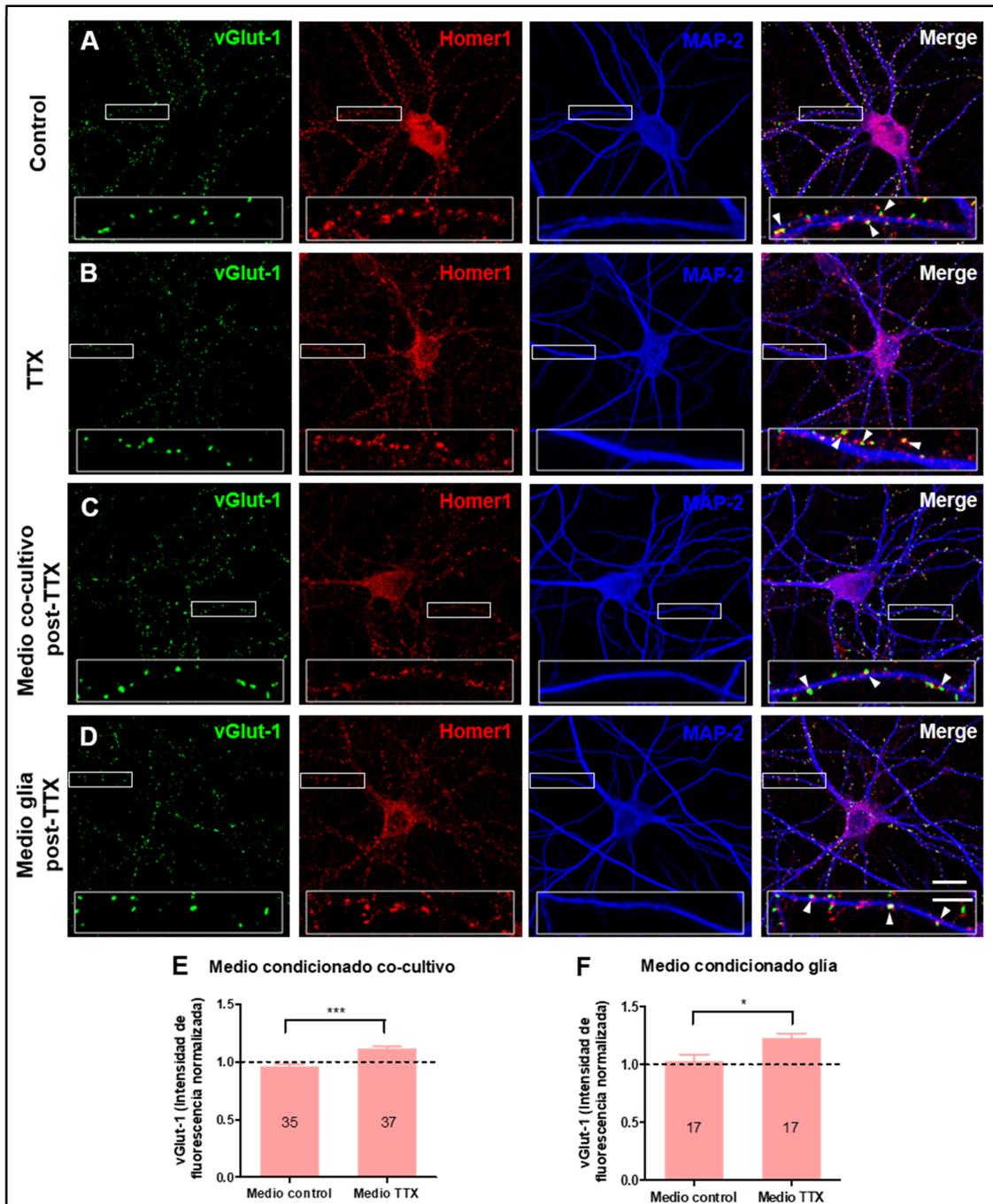
Los resultados expuestos sugieren que las células gliales cumplen una función esencial en la inducción y/o el mantenimiento de la PSH, dado que cultivos enriquecidos en neuronas son incapaces de ajustar la fuerza presináptica. En este sentido, las células gliales podrían estar modulando la actividad sináptica por diferentes vías, por ejemplo, a través de moléculas de adhesión o liberando gliotransmisores u otros factores al medio extracelular. En particular, en este trabajo se analizó la posibilidad de que, frente a la inactividad crónica del circuito, las células gliales liberaran factores solubles al medio, los cuales actuando a nivel neuronal ajusten la función sináptica en sentido compensatorio a la actividad del circuito.

Se realizaron experimentos utilizando medio condicionado proveniente de co-cultivos neurona-glía y transfiriéndolo a cultivos enriquecidos en neuronas. En primer lugar, para obtener el medio condicionado, co-cultivos neurona-glía fueron tratados con TTX a los 13-14 DIV ( $1\mu\text{M}$ ; 24-36hs) para inducir la PSH. Posteriormente se transfirió el medio de dichos cultivos (medio co-cultivo post-TTX) a cultivos enriquecidos en neuronas. Se utilizó medio proveniente de co-cultivos no tratados como control (medio co-cultivo control). Luego de 24-36hs se fijaron los cultivos enriquecidos en neuronas y se realizó inmunocitoquímica contra vGlut-1, Homer1 y MAP-2. Para evaluar cambios en la función presináptica se cuantificó la abundancia de vGlut-1 sináptico de la manera descrita anteriormente (*Figura 16*).

Al igual que en los experimentos comentados en el apartado anterior, se observa que no es posible inducir PSH presináptica en cultivos enriquecidos en neuronas (*Figura 16A, 16B*). De manera interesante, se observa que dichos cultivos al ser expuestos a medio co-cultivo post-TTX, incrementan de manera significativa la intensidad de fluorescencia asociada a vGlut-1 en comparación con cultivos expuestos a medio co-cultivo control (medio control  $0,95 \pm 0,03$ ; medio TTX  $1,10 \pm 0,03$ ;  $p < 0,001$ ) (*Figura*

16C, 16E). Estos resultados sugieren que la inducción y/o mantenimiento de la PSH dependiente de TTX promueve la liberación de factores solubles al medio extracelular, los cuales son necesarios para realizar el ajuste homeostático de la abundancia de vGlut-1 presináptico.

Con el fin de discriminar el origen celular de él o los factores liberados al medio extracelular, se realizaron experimentos similares a los expuestos previamente, pero utilizando medio condicionado proveniente de cultivos gliales (sin presencia de neuronas). Cultivos de 13-14 DIV fueron tratados con TTX ( $1\mu\text{M}$ ; 24-36hs) y cultivos sin tratamiento se utilizaron como control. El medio de dichos cultivos (medio glía post-TTX y medio glía control) fue transferido a cultivos enriquecidos en neuronas y luego de 24-36hs se fijaron los cultivos y se realizaron inmunocitoquímica contra vGlut-1, Homer1 y MAP-2 (*Figura 16D*). Sorprendentemente, los cultivos neuronales muestran un incremento del vGlut-1 sináptico frente a la aplicación de medio condicionado proveniente de cultivos gliales tratados con TTX, en comparación con medio de cultivos gliales sin tratamiento (medio control  $1,02 \pm 0,07$ ; medio TTX  $1,22 \pm 0,05$ ;  $p < 0,05$ ) (*Figura 16F*). Estos resultados no seguirían el paradigma de la PSH, en el sentido que la señal disparadora no sería un cambio en la actividad neuronal. En cambio, sugieren que cambios en la excitabilidad glial podrían estar promoviendo la liberación de factor/es al medio extracelular, los cuales modularían la función presináptica. Asimismo, podrían sugerir que es necesaria tanto la presencia de TTX como de factores solubles gliales simultáneamente para que se manifieste la PSH presináptica.



**FIGURA 16. Factores solubles liberados por las células gliales median la PSH inducida por inactividad crónica del circuito. (A-D)** Imágenes representativas de cultivos enriquecidos en neuronas de hipocampo: control (sin tratamiento) (A), con TTX [1 $\mu$ M] (B), con medio condicionado derivado de co-cultivos tratados con TTX (C) y medio condicionado de cultivos gliales tratados con TTX (D). Se realizó un triple marcaje contra vGlut-1 (verde), Homer1 (rojo) y MAP-2 (azul). En la parte inferior de cada imagen se observa una magnificación de la región seleccionada con un recuadro. Las flechas muestran contactos sinápticos donde existe colocalización parcial o total del marcador vGlut-1 y Homer1. *Escala: 15 $\mu$ m; recuadro: 5 $\mu$ m.* (E,F) Gráficos de barra que muestran la intensidad de fluorescencia asociada a vGlut-1 sináptico en cultivos enriquecidos en neuronas frente a la aplicación de medio condicionado derivado de co-cultivos control (sin tratamiento) y de co-cultivos tratados con TTX (E) y de medio condicionado derivado de cultivos gliales control y tratados con TTX (F). El número total de neuronas analizadas para cada condición en dos experimentos independientes se presenta dentro del gráfico de barras. Los datos se normalizaron con relación a la intensidad de fluorescencia asociada a vGlut-1 en cultivos enriquecidos control y se expresan como media  $\pm$  error estándar. \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ . Two-tailed Student's t-test.

## **El bloqueo farmacológico de canales formados por Cx43 y Panx1 previene el ajuste homeostático de la abundancia de vGlut-1 sináptico.**

Los conexones y panexones gliales son vías para la liberación de diferentes gliotransmisores como el glutamato y el ATP los cuales modulan la transmisión sináptica actuando a nivel de las terminales pre y postsinápticas. Recientemente, la Cx43 y la Panx1 han sido implicadas en fenómenos plásticos (Stehberg et al., 2012; Prochnow et al., 2012; Ardiles et al., 2014; Meunier et al., 2017). Con el objetivo de estudiar el papel de estos canales en la PSH, se utilizaron diversos fármacos bloqueantes y péptidos miméticos. Como primera aproximación, los co-cultivos neurona/glia (13-14 DIV) se trataron con Carbenoxolona (CBX) [50 $\mu$ M], un inhibidor de amplio espectro de GJs y HCs y canales de Panx1, 15min previo al tratamiento con TTX (1 $\mu$ M; 24-36 hs). Se estimó la función presináptica cuantificando la intensidad de fluorescencia asociada a vGlut-1 sináptico. Simultáneamente se utilizaron co-cultivos tratados con TTX y cultivos sin tratamiento como control de la inducción de la PSH y de la función sináptica basal, respectivamente (*Figura 17A, 17B*). Se observó que el tratamiento con CBX previno el incremento compensatorio de vGlut-1 en sinapsis individuales en comparación con cultivos tratados con TTX (TTX 1,43  $\pm$  0,12; CBX+TTX 1,11  $\pm$  0,06;  $p < 0,05$ ), lo sugiere la participación de GJs y HCs o de canales de Px1 en la PSH (*Figura 17E*).

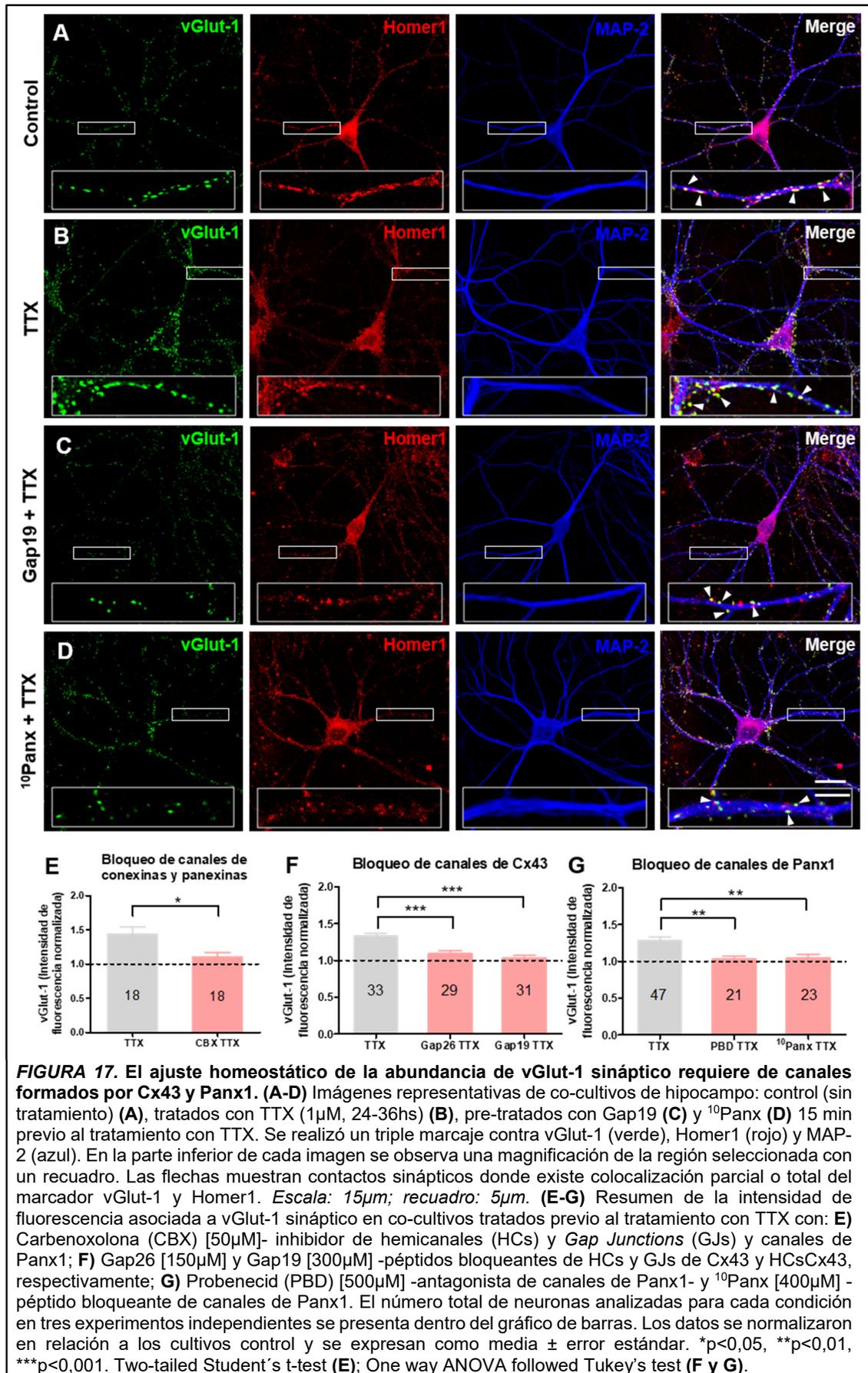
Con el fin de evaluar la contribución de HCs gliales formados por Cx43 en la PSH, se utilizaron dos péptidos miméticos - Gap26 y Gap19 - que bloquean específicamente dicha proteína. El Gap26 es un péptido mimético contra el primer bucle extracelular de la Cx43 que bloquea los HCsCx43 en minutos, pero también las GJsCx43 en períodos prolongados (>2-3hs), dado que impide el ensamblaje de canales de membranas en aposición (Evans and Leybaert, 2007; Wang et al., 2012). Por otro lado, el Gap19 es un péptido idéntico a una secuencia corta del bucle intracelular de la Cx43, y se ha demostrado que inhibe los HCsCx43 sin modificar el acoplamiento mediado por GJs (Wang et al., 2013; Abudara et al., 2014).

Se trataron co-cultivos 15 minutos previo al tratamiento con TTX con Gap26 [150 $\mu$ M] y Gap19 [300 $\mu$ M] (*Figura 17C*). De manera interesante, ambos tratamientos previenen el ajuste compensatorio de la abundancia de vGlut-1 sináptico (TTX 1,33  $\pm$  0,04; Gap26+TTX 1,09  $\pm$  0,04; Gap19+TTX 1,04  $\pm$  0,03;  $p < 0,001$ ) (*Figura 17F*). Estos resultados destacan un papel esencial de los HCsCx43 gliales en la señalización

neuro-glial de la PSH, probablemente a través de la liberación de factores solubles al medio extracelular.

Teniendo en cuenta que la liberación de gliotransmisores desde las células gliales también puede estar mediada por canales formados por Panx1, se utilizaron dos inhibidores de dichos canales: el fármaco Probenecid (PBD) [500 $\mu$ M] y el <sup>10</sup>Panx1 [400  $\mu$ M], un péptido mimético bloqueante específico de la Panx1. Estos tratamientos fueron aplicados a co-cultivos de 13-14 DIV 15min previo al tratamiento con TTX y se cuantificó la inmunofluorescencia asociada a vGlut-1 sináptico (*Figura 17D*). Se observó que, frente a ambos tratamientos, los co-cultivos fueron incapaces de realizar el ajuste compensatorio en la expresión de vGlut-1 sináptico (TTX 1,28  $\pm$  0,05; PBD+TTX 1,03  $\pm$  0,04; <sup>10</sup>Px1+TTX 1,05  $\pm$  0,04;  $p < 0,01$ ) (*Figura 17G*). Estos resultados evidencian una participación de los canales de Panx1 en la PSH, dado que las neuronas son incapaces de responder frente a la inactividad crónica en condiciones de bloqueo del canal. Es importante destacar que, a diferencia de la Cx43, la Panx1 también se expresa ampliamente en neuronas en el SNC y mediante estas herramientas farmacológicas se bloquean los canales de ambos tipos celulares, por lo que estos resultados no descartan la participación de canales de Panx1 neuronales en la PSH.

En conjunto, estos resultados sugieren que los HCsCx43 y los canales de Panx1 (gliales y/o neuronales) cumplen un papel fundamental en la inducción y/o mantenimiento de la PSH, probablemente favoreciendo la liberación al espacio extracelular de factores solubles que promuevan el ajuste compensatorio de la función presináptica.



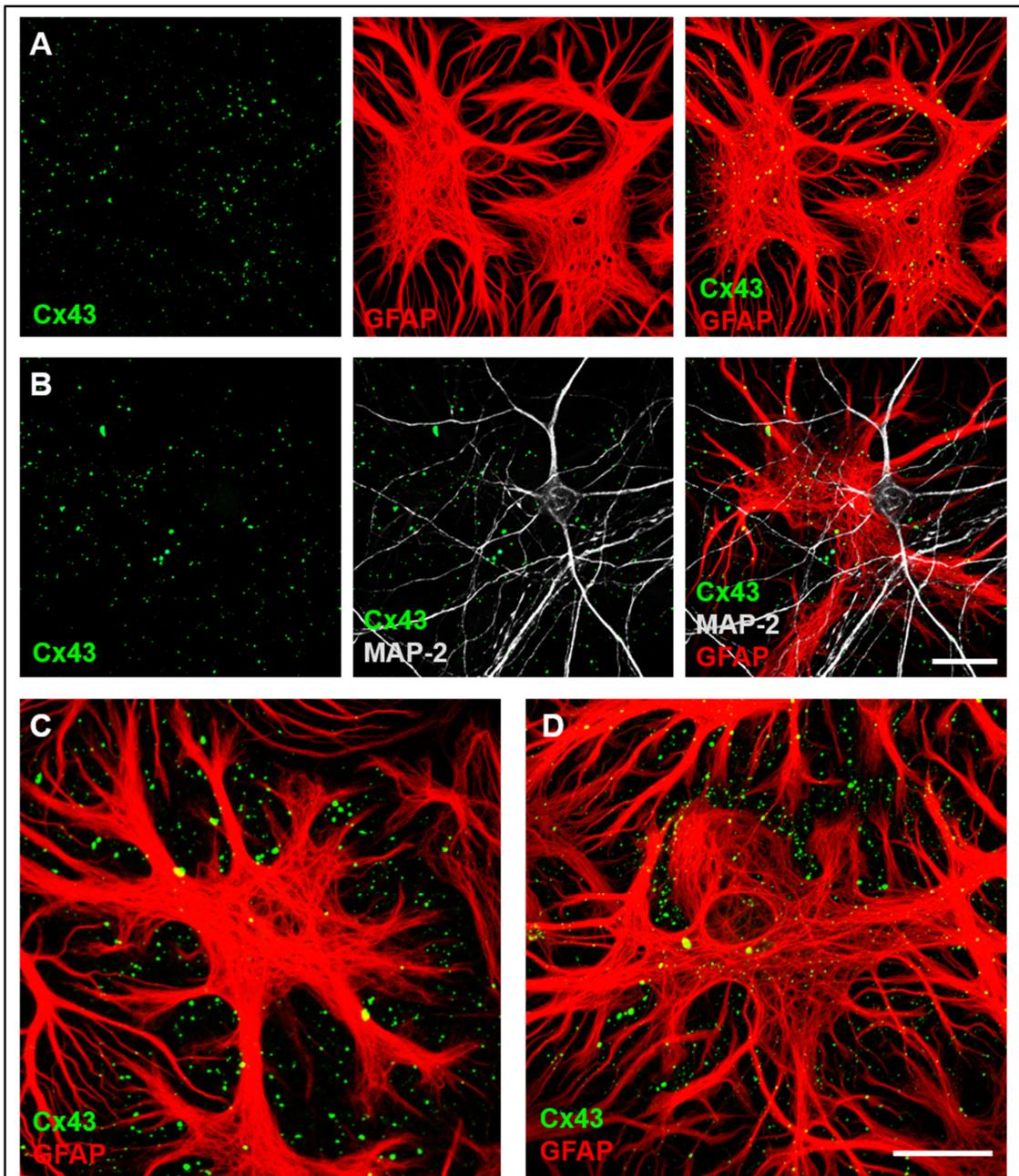
**La Cx43 se expresa en astrocitos mientras que la Panx1 se expresa tanto en astrocitos como en neuronas en cultivos.**

Con el fin de caracterizar la expresión de Cx43 y Panx1 en los co-cultivos neurona/glía empleados (14-15 DIV), se realizó inmunocitoquímica contra la Cx43 o Panx1, GFAP, un marcador astrocitario y MAP-2, un marcador neuronal. En la *Figura 18* se muestra la inmunofluorescencia asociada a Cx43. Se observa marcaje de Cx43 en células positivas para GFAP, mientras que no existe colocalización entre MAP-2 y Cx43, comprobando que la Cx43 no se expresa en neuronas en los co-cultivos empleados (*Figura 18E*). La expresión de Cx43 se observa como inmunorreactividad puntiforme de intensidad y área variable en la superficie de los astrocitos. En forma característica, la Cx43 posee un marcaje puntiforme en las zonas de contacto intercelular. Estos resultados indican que la Cx43 se expresa principalmente en astrocitos, no detectándose su expresión en neuronas, coincidiendo con resultados previamente publicados en cultivos (Dermietzel et al., 1989; Yamamoto et al., 1990).

A diferencia de la Cx43, la Panx1 se detecta en células GFAP + y MAP-2 +, observándose un marcaje de mayor intensidad en las neuronas donde puede verse expresada tanto a nivel del soma como de las dendritas (*Figura 19*).

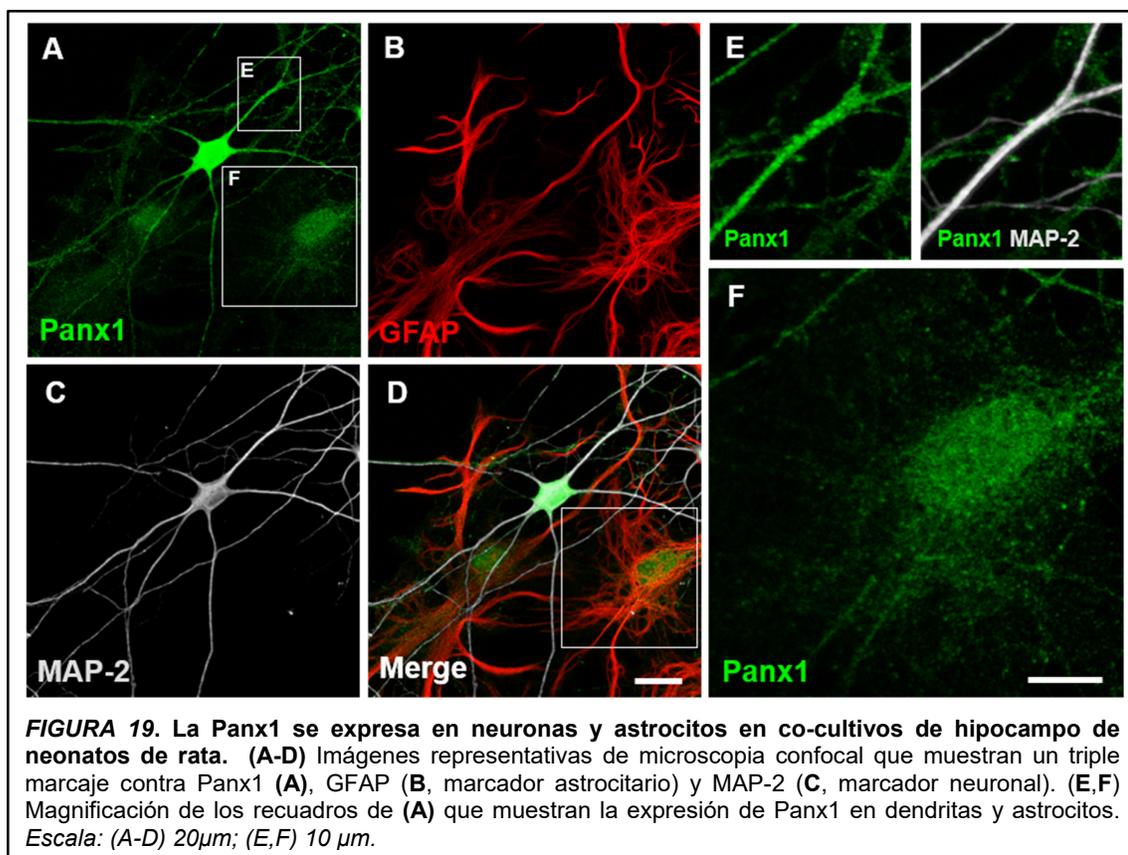
**Niveles de expresión de Cx43 y Panx1 detectados mediante inmunofluorescencia luego del tratamiento con TTX.**

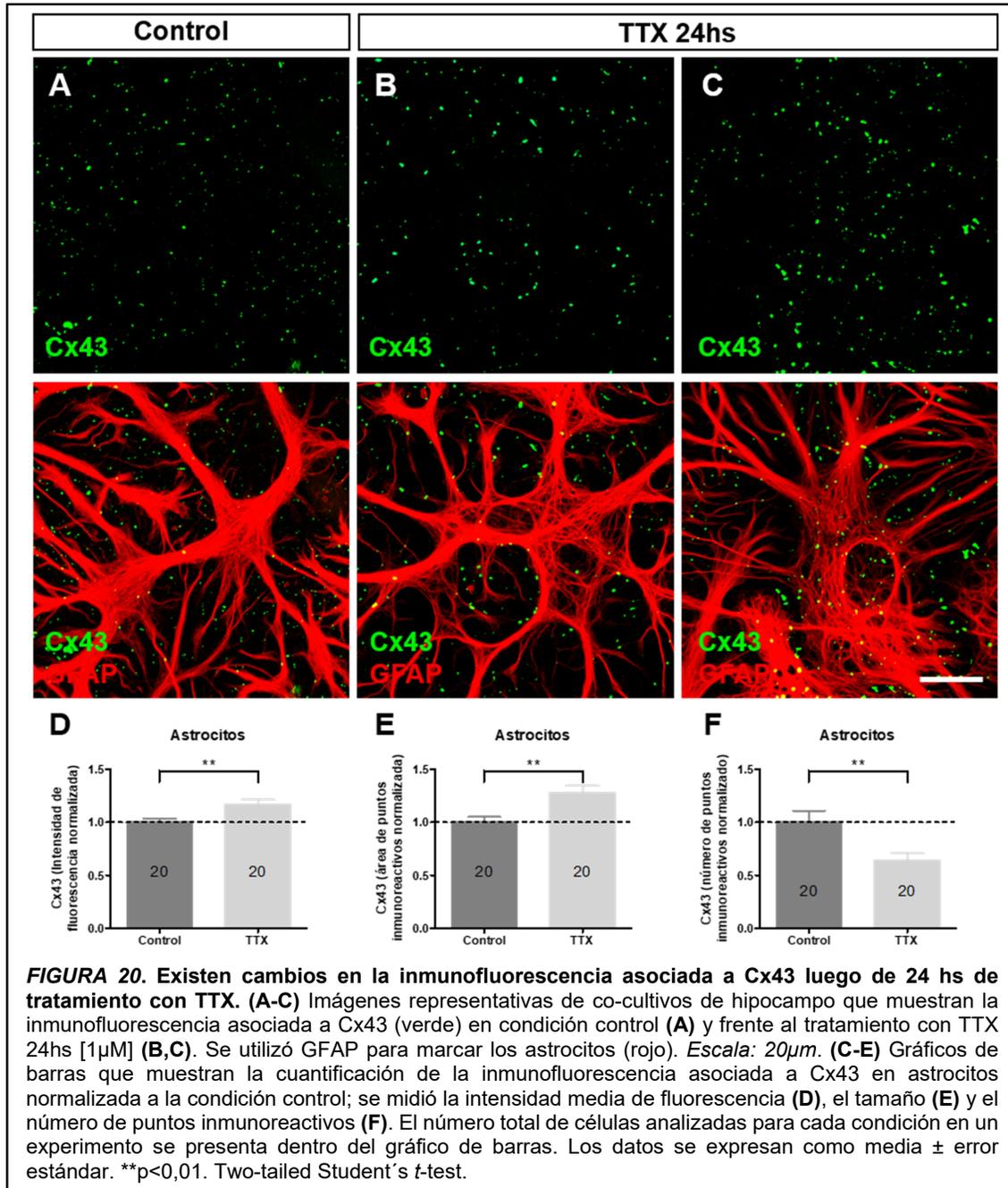
Teniendo en cuenta los resultados presentados anteriormente, los canales de Cx43 y Panx1 tienen un rol fundamental en el ajuste homeostático de la función presináptica. En este sentido, luego de caracterizada la expresión de estas proteínas en condición control, se evaluó la existencia de variaciones en los niveles de expresión frente a la inducción de PSH mediante técnica de detección inmune (Garre et al., 2010). Se prepararon co-cultivos neurona/glía que fueron tratados con TTX a los 13-14 DIV (1 $\mu$ M; 24hs); se realizó inmunocitoquímica con los marcadores detallados en el apartado previo, y se cuantificó la inmunofluorescencia asociada a Cx43 y Panx1. Se utilizaron cultivos sin tratamiento como control de la expresión basal.



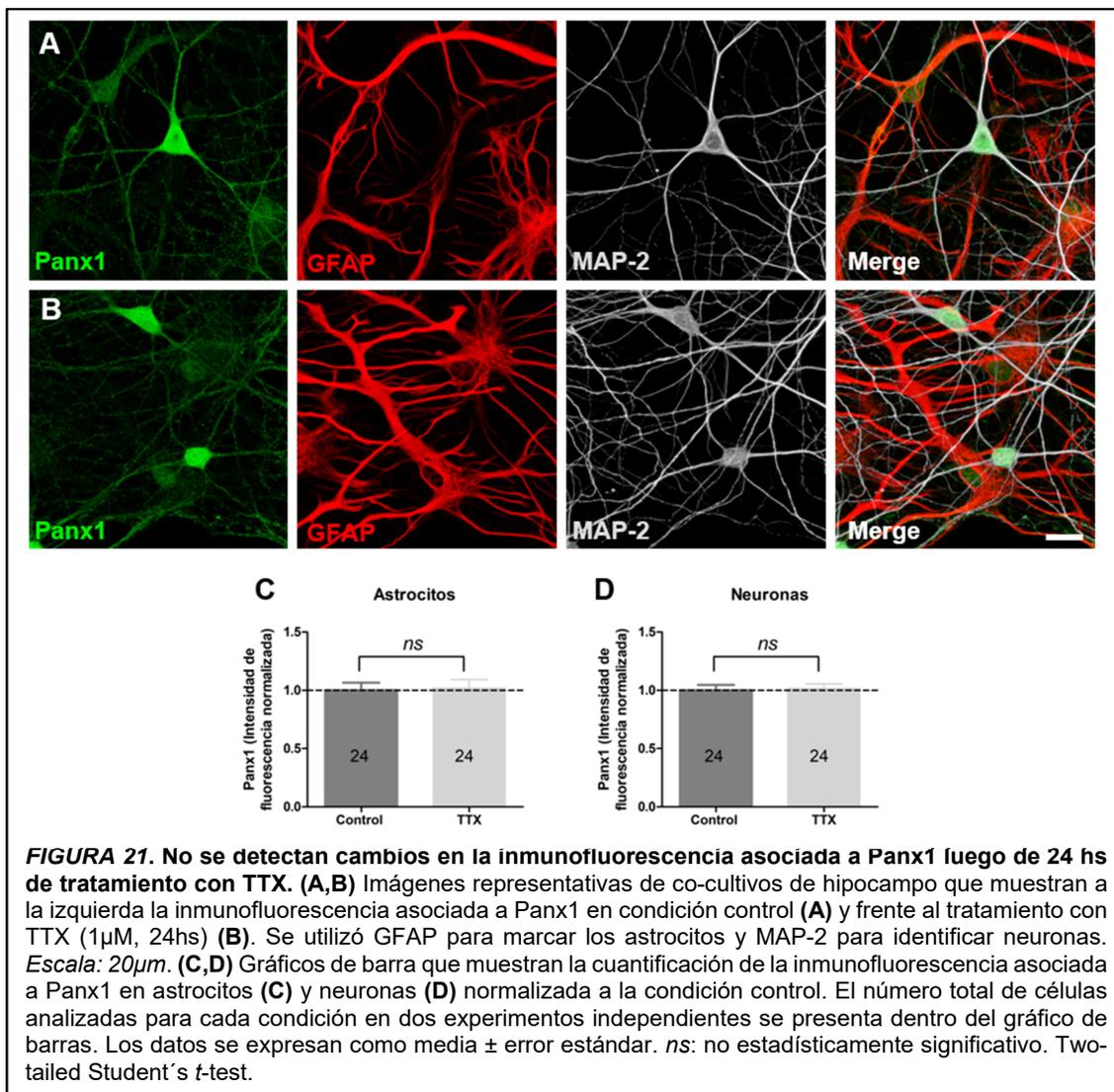
**FIGURA 18.** La Cx43 se expresa en astrocitos en co-cultivos de hipocampo de neonatos de rata. (A-D) Imágenes representativas de microscopia confocal que muestran la expresión de la Cx43. (A,C,D) Doble marcaje contra Cx43 (verde) y GFAP (rojo, marcador astrocitario); se destaca la co-localización de la Cx43 con células GFAP positivas. Nótese el predominio de la inmunoreactividad puntiforme de la Cx43 en las zonas de contacto intercelular. (B) Triple marcaje contra Cx43 (verde), GFAP (rojo) y MAP-2 (gris, marcador neuronal); se muestra que no existe co-localización entre la Cx43 y MAP-2. Escala: 20 $\mu$ m.

En el caso de la Cx43, se analizó la intensidad de fluorescencia de los puntos inmunorreactivos presentes en astrocitos (células GFAP +) en condición control (*Figura 20A*) y luego de 24hs de tratamiento con TTX (*Figura 20B, 20C*). Estos resultados son preliminares, dado que sólo se cuenta con un experimento. Se observó un aumento en la intensidad de fluorescencia de Cx43 astrocitaria (control  $1,00 \pm 0,03$ ; TTX  $1,17 \pm 0,05$ ;  $p < 0,01$ ). Por otro lado, se observaron diferencias en el tamaño de los puntos inmunorreactivos, que frente al tratamiento con TTX aparecen de mayor área (control  $1,00 \pm 0,05$ ; TTX  $1,27 \pm 0,07$ ;  $p < 0,01$ ), así como una disminución en el número de puntos inmunorreactivos cuantificados por imagen (control  $1,00 \pm 0,11$ ; TTX  $0,63 \pm 0,07$ ;  $p < 0,01$ ) (*Figura 20D, 20E, 20F*). Junto con el aumento del tamaño de los puntos inmunorreactivos de Cx43, se observa en algunos astrocitos una redistribución celular del marcaje, aumentando en las zonas de contacto intercelular luego del tratamiento con TTX.





En cuanto a los niveles de expresión de Panx1, se analizó la intensidad de fluorescencia de Panx1 en astrocitos (células GFAP +) y en neuronas (células MAP-2 +), en condición control (*Figura 21A*) y frente al tratamiento con TTX 24 hs (*Figura 21B*). No se observaron diferencias significativas en la intensidad de fluorescencia asociada a Panx1 en astrocitos (control  $1,00 \pm 0,07$ ; TTX  $1,02 \pm 0,07$ ;  $p > 0,05$ ) (*Figura 21C*) ni en neuronas (control  $1,00 \pm 0,05$ ; TTX  $1,02 \pm 0,04$ ;  $p > 0,05$ ) (*Figura 21D*). Tampoco se observan cambios en distribución celular de la fluorescencia asociada a Panx1 frente al tratamiento con TTX. En el caso de los astrocitos se marca toda la superficie GFAP +, predominando el marcaje a nivel del núcleo tanto en la situación control como con el tratamiento con TTX. En las neuronas, se observa el marcaje predominante a nivel del soma, al igual que en la condición control, sin distinguir tampoco cambios a nivel dendrítico.



## **El aumento en la permeabilidad de canales gliales y neuronales es necesario para la inducción y/o mantenimiento de la PSH.**

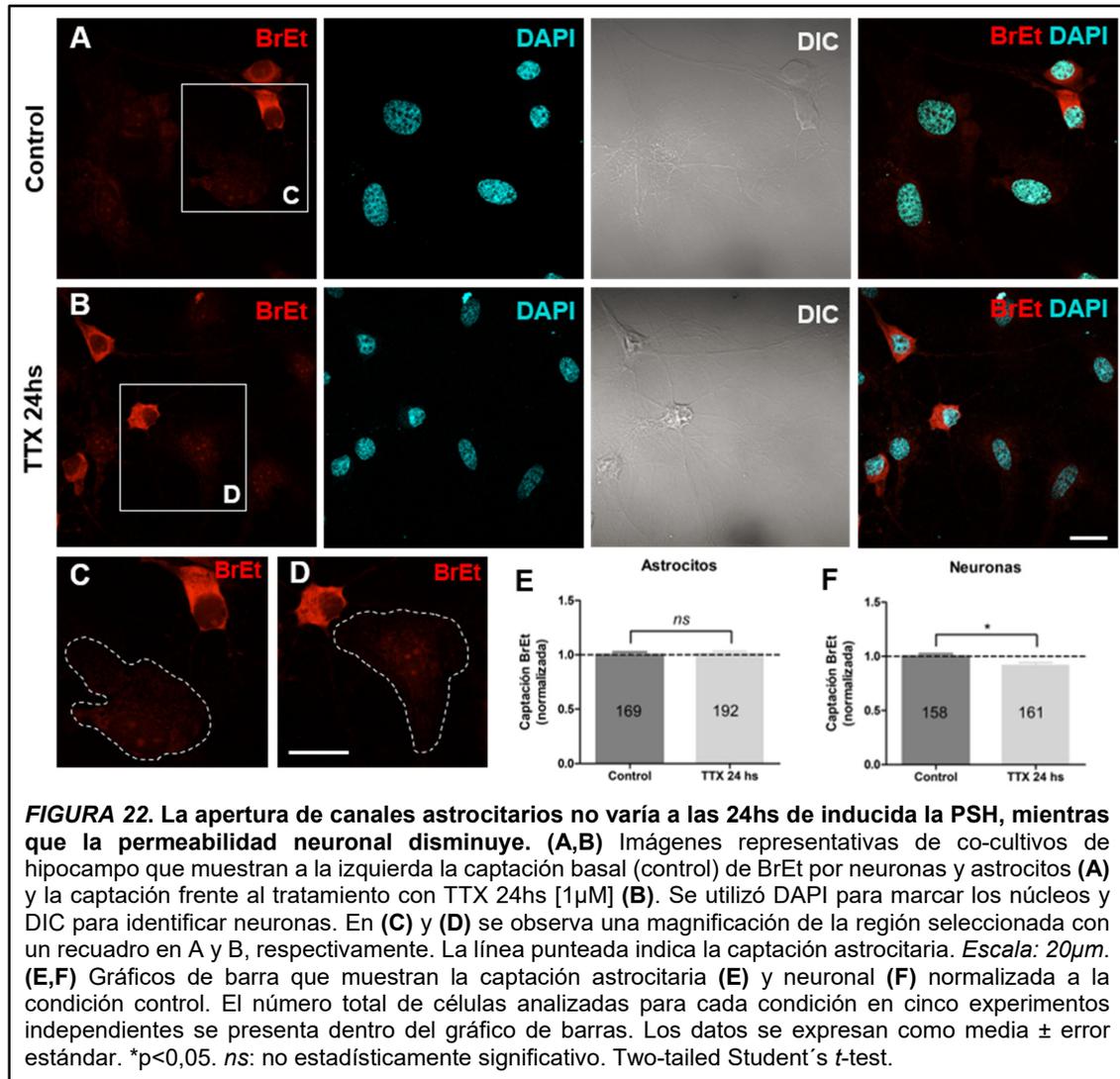
La actividad de los conexones y panexones puede ser evaluada determinando la captación celular de colorantes que permean los canales cuando son aplicados en el medio extracelular (Giaume et al., 2013). En este trabajo se utilizó el Bromuro de Etidio (BrEt; PM 394), un colorante que permea HCs y fluoresce al unirse en forma irreversible al ADN y ARN; esta técnica ha sido extensamente utilizada para estudiar cambios en la expresión funcional de canales tanto en cultivos disociados como en rodajas (Giaume et al., 2012).

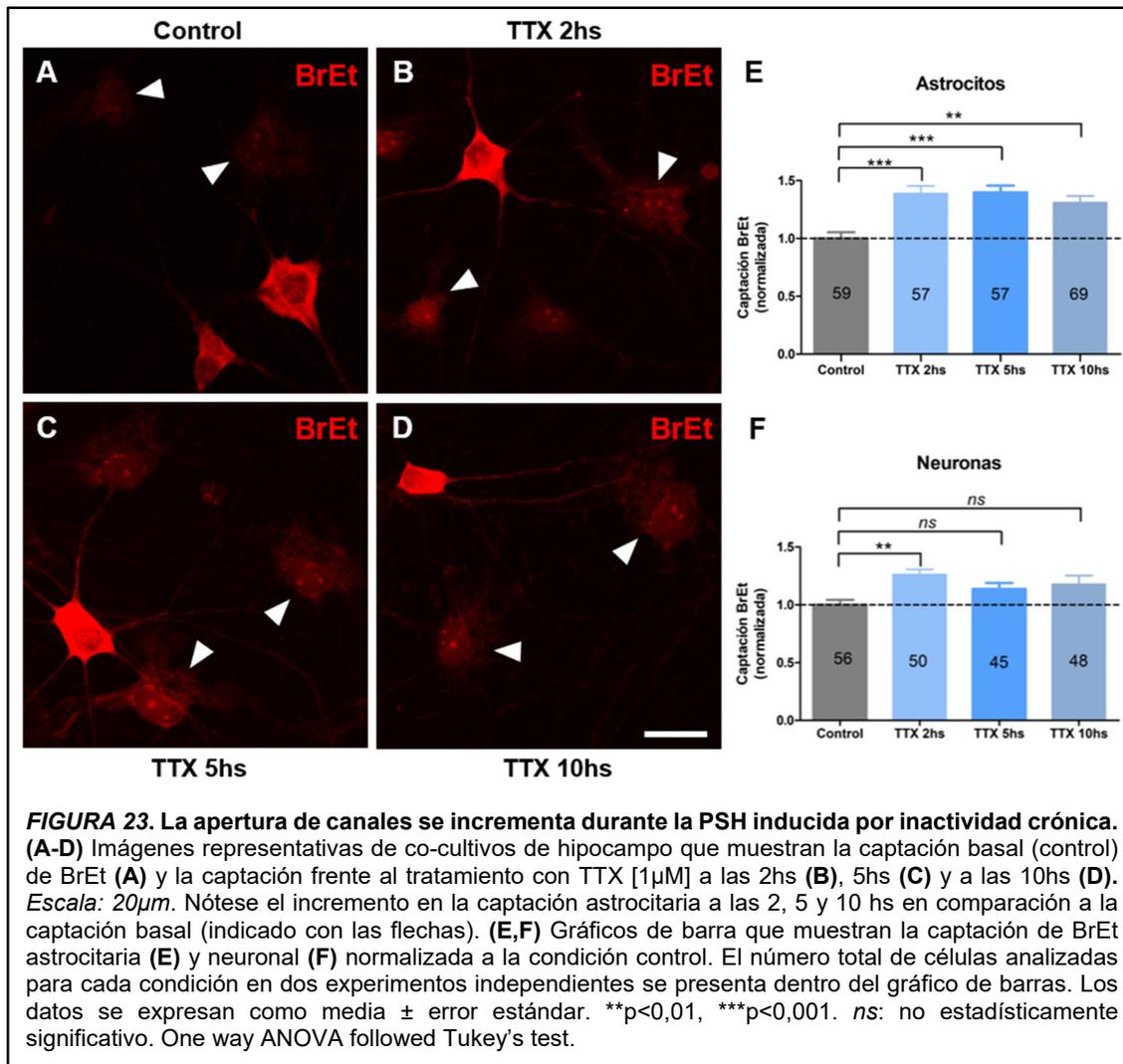
Se utilizaron co-cultivos neurona/glía tratados con TTX (1 $\mu$ M; 24hs) y cultivos control para evaluar la captación basal. A los 14-15 DIV, 15 minutos previos a la fijación de los cultivos, se aplicó BrEt (2,5 $\mu$ M, 37°C) y posteriormente se lavaron los cultivos con medio de cultivos para interrumpir la captación y disminuir el fondo. La intensidad de fluorescencia del BrEt se evaluó mediante microscopia confocal. Se utilizó DAPI para marcar los núcleos celulares y DIC para identificar a las neuronas por su morfología, si bien la captación del BrEt resulta suficiente en la mayoría de los casos para identificar el tipo celular. En la *Figura 22* se muestra la captación en condición control (A) y con TTX 24hs (B). En ambas condiciones, se visualiza captación basal tanto en neuronas como en astrocitos, siendo más intensa en neuronas a nivel somático.

Se cuantificó la intensidad de fluorescencia asociada al BrEt en condición control y con TTX, no observándose diferencias significativas en la captación astrocitaria (control  $1,00 \pm 0,03$ ; TTX  $1,01 \pm 0,02$ ;  $p > 0,05$ ) (*Figura 22E*). En cambio, en neuronas se observó una disminución en la captación del BrEt luego de 24hs de tratamiento con TTX en comparación con la captación basal (control  $1,00 \pm 0,02$ ; TTX  $0,92 \pm 0,03$ ;  $p < 0,05$ ) (*Figura 22F*).

Dado que la apertura de canales necesarios para la inducción y/o mantenimiento de la PSH podría darse previo a las 24hs, también se analizó la captación de BrEt a diferentes tiempos - 2hs, 5hs y 10hs - luego de aplicado el TTX. Como se muestra en la *Figura 23*, se observó un aumento significativo en la captación astrocitaria a las 2hs, 5hs, y 10hs (control  $1,00 \pm 0,05$ ; TTX 2hs  $1,39 \pm 0,06$ ; TTX 5hs  $1,40 \pm 0,06$ ; TTX 10hs  $1,30 \pm 0,06$ ;  $p < 0,001$ ). En cuanto a la captación neuronal, se observa un incremento significativo en la fluorescencia de BrEt cuantificada a las 2hs (control  $1,00 \pm 0,04$ ; TTX 2hs  $1,26 \pm 0,04$ ;  $p < 0,01$ ), observándose aumentos no significativos a las 5hs y

10hs (TTX 5hs  $1,14 \pm 0,05$ ; TTX 10hs  $1,18 \pm 0,07$ ;  $p > 0,05$ ). Estos resultados evidencian que durante la PSH inducida por inactividad crónica del circuito hay un aumento de la permeabilidad neuronal y astrocitaria, posiblemente mediado por panexones y/o HCs.



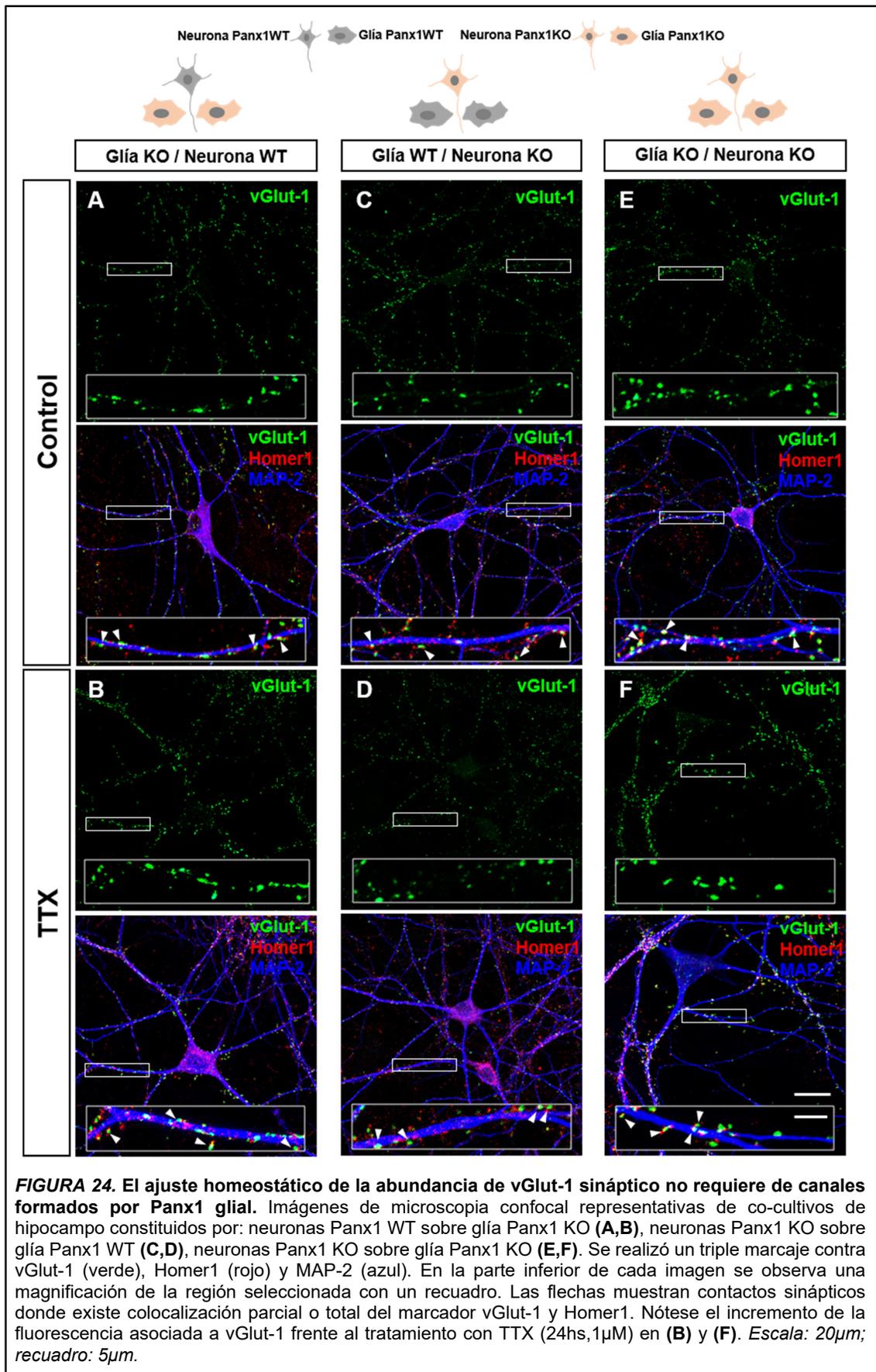


### Los canales de Panx1 gliales no son necesarios para el ajuste homeostático de la expresión de vGlut-1 sináptico.

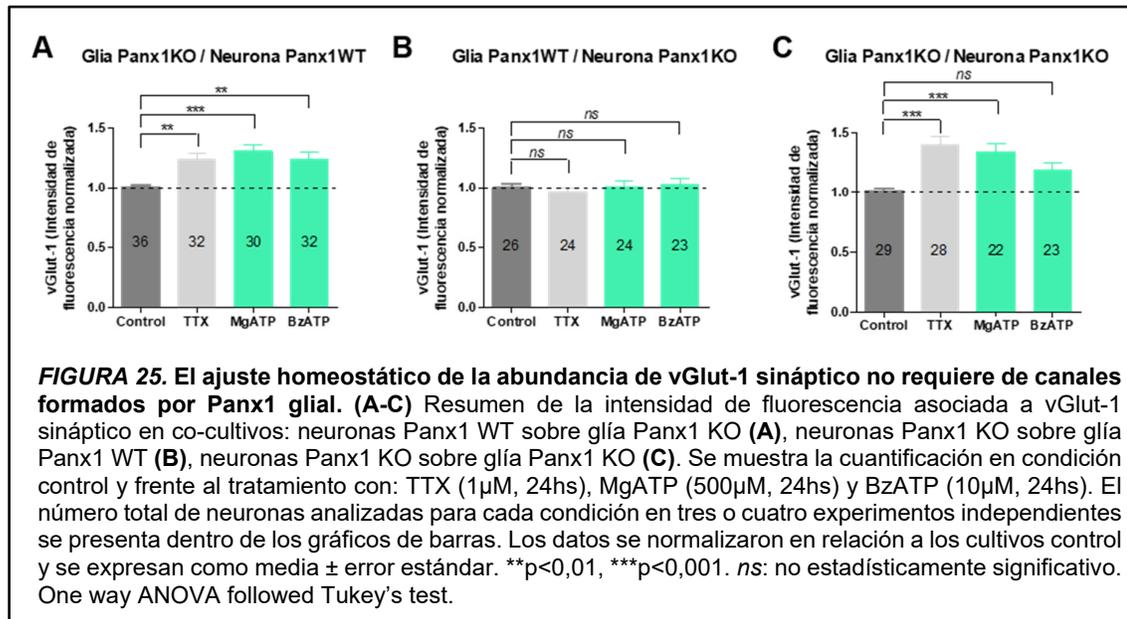
Para confirmar el papel de los canales de Panx1 en la PSH, se utilizaron animales transgénicos Panx1 KO. Teniendo en cuenta que los canales de Panx1 se expresan tanto en células gliales como en neuronas, se realizaron diferentes tipos de co-cultivos con el fin de analizar la contribución relativa de los panexones astrocitarios y neuronales en la PSH presináptica. Se prepararon tres tipos de co-cultivos: **a)** co-cultivos donde se sembraron neuronas provenientes del hipocampo de animales Panx1 WT sobre una monocapa de células gliales derivadas de animales Panx1 KO; **b)** co-cultivos donde neuronas provenientes de animales Panx1 KO se sembraron sobre células gliales de animales Panx1 WT; **c)** co-cultivos donde tanto células gliales como neuronales provenían de animales transgénicos Panx1 KO. Cada uno de estos cultivos permanecieron 13-14 DIV a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, cuando fueron tratados con TTX (1µM; 24hs) para inducir PSH. Se utilizaron co-cultivos sin tratamiento como control. Posteriormente se analizó la abundancia de vGlut-1 sináptico mediante inmunofluorescencia en cada condición de la forma mencionada en apartados previos.

En el caso de los co-cultivos descritos en **a)** se observó que frente al tratamiento con TTX existe un aumento de la inmunofluorescencia asociada a vGlut-1 sináptico (control  $1,00 \pm 0,03$ ; TTX  $1,24 \pm 0,05$ ;  $p < 0,001$ ) (*Figuras 24A, 24B y 25A*). Es decir, cuando la Panx1 no se expresa en células gliales, se puede igualmente inducir PSH, sugiriendo que los canales de Panx1 gliales no son indispensables para este tipo de plasticidad. En el caso de los co-cultivos detallados en **b)** se observó que no hay cambios en la inmunofluorescencia asociada a vGlut-1 luego de la aplicación de TTX (control  $1,00 \pm 0,04$ ; TTX  $0,96 \pm 0,04$ ;  $p > 0,05$ ) (*Figuras 24C, 24D, 25B*), sugiriendo que neuronas que carecen de Panx1 son incapaces de realizar el ajuste homeostático de la función presináptica frente a la inactividad crónica. Por último, al realizar co-cultivos donde tanto neuronas como células gliales derivan de animales Panx1 KO (**c**), de manera sorprendente, se observó que ajustan la abundancia de vGlut-1 sináptico en condiciones de inactividad crónica en comparación con cultivos no tratados (control  $1,00 \pm 0,03$ ; TTX  $1,40 \pm 0,07$ ;  $p < 0,01$ ) (*Figuras 24E, 24F, 25C*).

En conjunto, estos resultados sugieren que la Panx1 glial no sería necesaria para la inducción y/o mantenimiento de la PSH presináptica. En cuanto a la Panx1 neuronal,



si bien el resultado obtenido en **b)** sugiere una función indispensable para el ajuste homeostático de la abundancia de vGlut-1, esto no se observa en la condición **c)** cuando tanto células gliales como neuronales carecen de Panx1, cuya interpretación será profundizada en la Discusión.



### El ATP extracelular y la activación de los P2X<sub>7</sub>R modulan la abundancia de vGlut-1 sináptico.

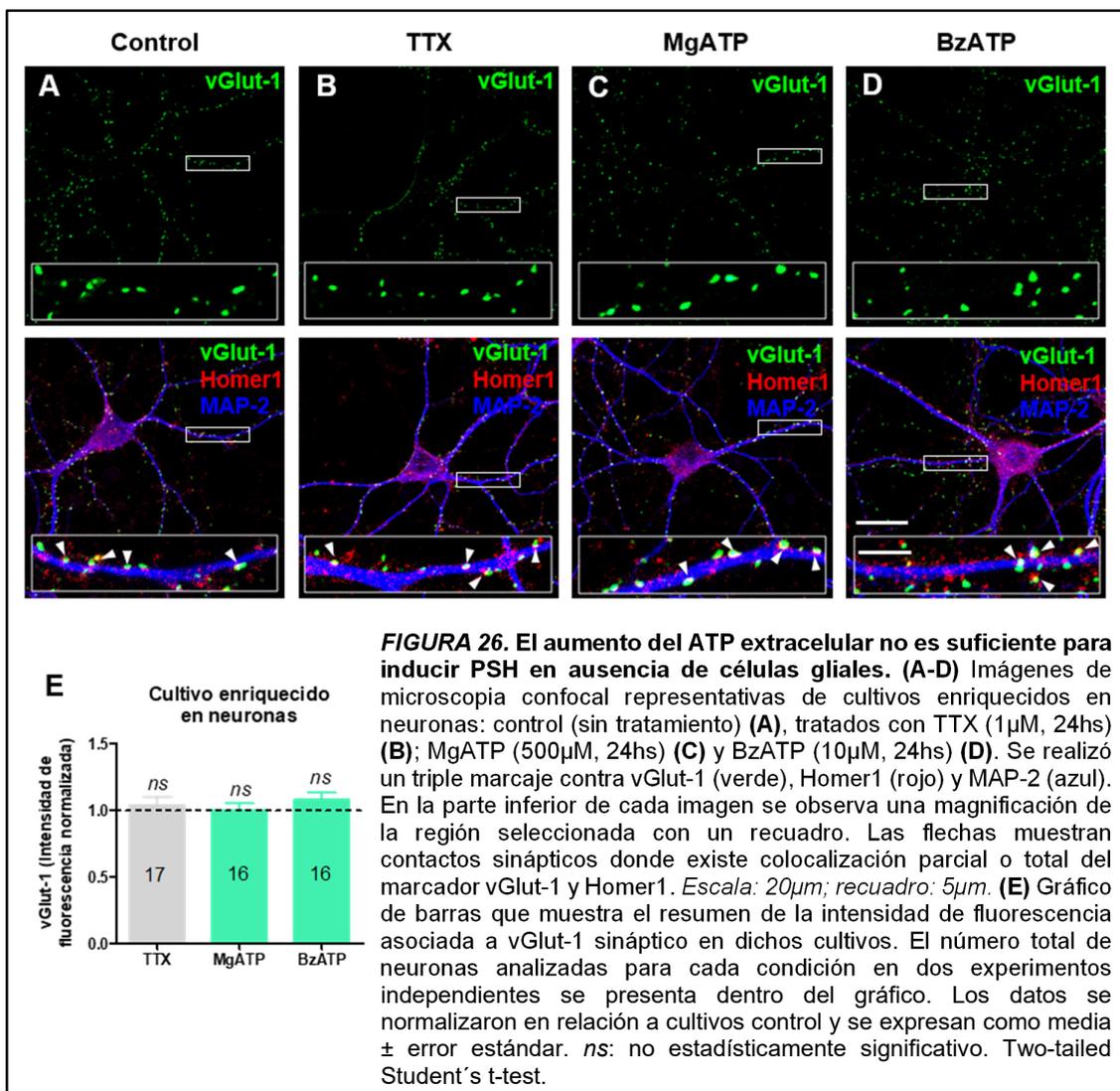
Como se ha mencionado, el ATP ha sido propuesto como un factor modulador de la transmisión sináptica, pudiendo ser liberado por las células gliales a través de conexiones y/o panexones, según el modelo estudiado. Asimismo, las neuronas también son capaces de liberar ATP a través de panexones de Panx1. En este sentido, se investigó cómo afecta la función presináptica el aumento de la concentración del ATP extracelular en los diferentes co-cultivos detallados en el apartado anterior en **a)**, **b)** y **c)**, a través del agregado de MgATP (500µM; 24hs) al medio de cultivos. Además, se utilizó el BzATP (10µM; 24hs), un agonista específico de los receptores de ATP de tipo P2X<sub>7</sub>. En la *Figura 25* se muestra la cuantificación de la fluorescencia asociada a vGlut-1 en los distintos co-cultivos. Se observa que en ausencia de Panx1 glial y presencia de Panx1 neuronal, la intensidad de vGlut-1 sináptico aumenta significativamente frente a ambos tratamientos (MgATP 1,30 ± 0,06; BzATP 1,24 ± 0,06; p < 0,001; p < 0,01) (*Figura 25A*). En cambio, en presencia de Panx1 glial y ausencia de Panx1 neuronal, no hay cambios en la intensidad de vGlut-1 sináptico

frente a dichos tratamientos, mimetizando los resultados obtenidos luego de la inactivación crónica con TTX (MgATP  $1,01 \pm 0,05$ ; BzATP  $1,03 \pm 0,04$ ;  $p > 0,05$ ) (*Figura 25B*). Esto sugiere que la modulación de la función presináptica por el ATP extracelular y los P2X<sub>7</sub>R requiere de canales de Panx1 neuronales. En la *Figura 25C*, se muestran los resultados obtenidos en co-cultivos que no expresan la Panx1 endógena en glía y neuronas, observándose un incremento significativo de vGlut-1 sináptico luego del tratamiento con MgATP, mientras que luego del tratamiento con BzATP se observa un incremento que no resulta estadísticamente significativo en comparación con el control sin tratamiento (MgATP  $1,34 \pm 0,07$ ; BzATP  $1,19 \pm 0,06$ ;  $p < 0,01$ ;  $p > 0,05$ ).

En conjunto estos resultados sugieren que la función presináptica es sensible a cambios en la concentración de ATP extracelular. Así un incremento en la concentración extracelular de este nucleótido mimetiza el incremento observado en la función presináptica en respuesta a la inactividad crónica del circuito. Por otra parte, los cultivos que presentan Panx1 glial, pero carecen de Panx1 neuronal, son insensibles a los cambios extracelulares de ATP. Por otra parte, la activación de los P2X<sub>7</sub>R, no produce cambios presinápticos significativos en cultivos sin Panx1 neuronal sugiriendo que es necesaria la interacción entre los P2X<sub>7</sub>R y la Panx1 para su función.

## En ausencia de células gliales, el aumento del ATP extracelular no es suficiente para la inducción y/o mantenimiento de la PSH presináptica.

Según los datos expuestos hasta el momento, una posibilidad es que las células gliales sean importantes como vía de liberación del ATP, que modula la actividad presináptica. Para verificar esto, se realizaron cultivos enriquecidos en neuronas de ratas WT y se trataron con MgATP (500 $\mu$ M) y BzATP (10 $\mu$ M) durante 24hs para inducir PSH presináptica. En la *Figura 26* se muestran los resultados obtenidos, donde se observa que dichos tratamientos no producen cambios en la abundancia de vGlut-1 sináptico (TTX 1,04  $\pm$  0,06; MgATP 1,00  $\pm$  0,05; BzATP 1,08  $\pm$  0,05;  $p > 0,05$ ). Se sugiere entonces que, en cultivos en ausencia de células gliales, el aumento del ATP extracelular, así como la activación específica de los P2X<sub>7</sub>R, no es suficiente para la inducción y/o mantenimiento de la PSH.



## DISCUSIÓN

En el presente trabajo se explora la participación de las células gliales en la inducción y/o mantenimiento de la PSH presináptica. Factores gliales como el TNF- $\alpha$  han sido involucrados en una forma de PSH postsináptica denominada *synaptic scaling* (Stellwagen and Malenka, 2006), que implica un aumento de la cantidad de AMPAR anclados en la membrana postsináptica y, por lo tanto, de la respuesta postsináptica frente a la inactividad prolongada. Sin embargo, la importancia de las células gliales en el ajuste homeostático de la función presináptica no ha sido reportado hasta el momento.

En este trabajo se utilizaron cultivos disociados de hipocampo murino de animales neonatos. Este modelo *in vitro* ha sido el más utilizado en el estudio de la PSH (Turrigiano, 2008; Pozo and Goda, 2010). Asimismo, los cultivos permiten explorar mecanismos moleculares que subyacen los cambios homeostáticos de la función presináptica a nivel de sinapsis individuales fácilmente identificables. La función presináptica fue evaluada a través de la cuantificación de la inmunofluorescencia asociada al transportador vesicular de glutamato vGlut-1 en sinapsis individuales. La abundancia del vGlut-1 sináptico resulta útil para estimar cambios en la función presináptica, dado que el aumento de su expresión se relaciona con dos parámetros que determinan la fuerza sináptica. Por un lado, un aumento del número de copias de vGlut-1 por VS determina una mayor acumulación de glutamato dentro de la VS, produciendo una mayor liberación de glutamato a la hendidura y por tanto un aumento del tamaño quantal (Wojcik et al., 2004; Wilson, 2005). Por otro lado, se ha reportado que la abundancia de vGlut-1 en las VS se correlaciona directamente con la *pr* (Herman et al., 2014). A su vez, se destaca que la abundancia de vGlut-1 (a diferencia de otras proteínas de las VS como la sinaptofisina o la sinapsina) es sensible a cambios de la actividad, ajustando su expresión de forma compensatoria al modificar los niveles de actividad del circuito (Wilson et al., 2005; De Gois, 2005).

Para la inducción de la PSH presináptica, se provocó un cambio en la actividad del circuito a través de la aplicación de un tratamiento crónico con TTX ampliamente utilizado (1 $\mu$ M; 24-48hs a los 13-14 DIV) (Turrigiano et al., 1998; Tokuoka and Goda, 2008; Vitureira et al., 2011). Frente al mismo, se evidencia que los co-cultivos neurona/glía aumentan la expresión de vGlut-1 de manera compensatoria, de acuerdo al paradigma homeostático (Burrone and Murthy, 2003; Turrigiano, 2008; Pozo and

Goda, 2010). El marcador utilizado, entonces, es lo suficientemente sensible para detectar los cambios de la función presináptica frente a la inactividad crónica. Además, se evidenció un aumento del número de contactos sinápticos en los co-cultivos con respecto al control, lo que implica otra estrategia para ajustar la fuerza sináptica de forma compensatoria y coincide con reportes previos (Burrone and Murthy, 2003; Arendt et al., 2013).

### **Las células gliales participan en la PSH presináptica a través de la liberación de factores solubles**

Para explorar la importancia de las células gliales en la PSH presináptica, se realizaron cultivos enriquecidos en neuronas hipocampales, que presentan porcentajes bajos de células gliales (<7%), y se trataron con TTX. De manera interesante, no se observó incremento del vGlut-1 sináptico frente a dicho tratamiento, así como tampoco en el número de contactos sinápticos cuantificados. Se evidencia entonces que, en ausencia de células gliales, las neuronas son incapaces de realizar el ajuste compensatorio de la fuerza presináptica frente a la inactividad crónica.

Surge entonces la interrogante de que rol están cumpliendo las células gliales en el proceso de PSH. Una posibilidad que explique dicho resultado es la existencia de vías de señalización neuro-gliales que sean las responsables de sensor los cambios en la actividad y mediar los mecanismos necesarios para realizar el ajuste compensatorio. Estas vías de señalización podrían depender, por ejemplo, de moléculas de adhesión o de factores liberados al medio extracelular. Particularmente, los gliotransmisores liberados por las células gliales de manera dependiente de la actividad sináptica podrían estar involucrados, dado que se ha visto su participación en la modulación de la transmisión sináptica (Araque et al., 2014; Covelo and Araque, 2018). Los resultados muestran que el medio condicionado obtenido de co-cultivos neurona/glia tratados con TTX, cuando es transferido a cultivos enriquecidos en neuronas (24-36 hs) es suficiente para producir un aumento en la función presináptica, en comparación con medio condicionado de co-cultivos control (sin tratamiento). De esta manera, se sugiere que, frente a la inactividad crónica, en co-cultivos se produce una liberación al medio extracelular de uno o varios factores solubles que producen finalmente el ajuste compensatorio neuronal. En estas condiciones, se evidencia que es necesaria la presencia de células gliales para que se libere él o los factores implicados, pero no se puede conocer el origen celular del mismo (glial o neuronal o ambos). Experimentos

similares fueron realizados utilizando medio condicionado proveniente de cultivos gliales, tratados con TTX y sin tratamiento (control); en estas condiciones se observa un aumento en la abundancia de vGlut-1 sináptico luego de aplicar el medio post-TTX, no observándose diferencias frente al medio control. De esta manera se evidencia que factores de origen glial son necesarios para mediar la PSH presináptica, y que estos factores podrían liberarse incluso en ausencia de neuronas.

Resulta importante destacar que hasta ahora no se conocen los mecanismos por los cuales se sensa la actividad del circuito en la PSH, y se desencadenan los ajustes homeostáticos de la actividad. En este sentido, los resultados mencionados sobre el medio glial post-TTX, no seguirían el paradigma de la PSH, dado que el disparador no sería un cambio en la actividad neuronal, sino en la excitabilidad glial.

En este sentido, cambios en la excitabilidad glial podrían ser suficientes para desencadenar la liberación de factores solubles y como consecuencia modular el ajuste de la función presináptica. Las células gliales, específicamente los astrocitos, poseen una gran variedad de canales de membrana (Verkhratsky and Nedergaard, 2018). Si bien estos están presentes en una densidad mucho menor que en neuronas, los astrocitos poseen canales de  $\text{Na}^+$  dependientes de voltaje sensibles al TTX (Sontheimer et al., 1994; Verkhratsky and Steinhäuser, 2000). La homeostasis del  $\text{Na}^+$  intracelular es muy importante dado que controla la actividad de varios transportadores, por ejemplo, de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPasa}$  y del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . Se ha reportado que el bloqueo de canales de  $\text{Na}^+$  voltaje-dependientes en astrocitos reduce la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPasa}$ , que conlleva cambios en los gradientes transmembrana de  $\text{Na}^+$  (Sontheimer et al., 1994). La reducción en la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPasa}$  podría producir la despolarización del astrocito por la actividad electrogénica de la bomba, lo que podría disparar por ejemplo, la apertura de  $\text{HCsCx43}$ . Esto sería sólo una de las hipótesis posibles, dado que existen una gran cantidad de transportadores astrocitarios dependientes de la concentración intracelular de  $\text{Na}^+$  y se ha reportado también que la señalización del  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular están muy relacionadas (Parpura and Verkhratsky, 2012; Verkhratsky et al., 2018).

Por otra parte, la modulación de la función presináptica producida en cultivos enriquecidos en neuronas con el medio post-TTX glial también podría indicar que sea necesaria la presencia basal de factores liberados por la glía cuando se realiza la

manipulación con TTX en las neuronas (si persistiera el TTX en el medio condicionado, si bien la concentración sería menor de la utilizada habitualmente para inducir PSH). Restan realizar experimentos para estudiar esta posibilidad.

Si bien la idea de que los factores solubles implicados sean gliotransmisores como el ATP, glutamato, D-serina o TNF- $\alpha$ , también podrían estar involucrados otros factores, por ejemplo, factores de crecimiento, que se ha visto son necesarios para la expresión de la PSH presináptica en la NMJ (Goold and Davis, 2007).

### **Los conexones y panexones, vías para la gliotransmisión, son necesarios para el ajuste homeostático de la función presináptica**

Las células gliales han sido implicadas en mecanismos de plasticidad sináptica anteriormente, siendo la liberación dependiente de conexones y panexones una de las vías para la gliotransmisión. En este trabajo se realizó el bloqueo farmacológico de los HCsCx43 y de los canales de Panx1, observándose que la inhibición de estos impide el ajuste compensatorio de la función presináptica frente a la inactividad prolongada, postulando que la señalización dependiente de conexones y panexones es necesaria.

En una aproximación inicial, se utilizó un bloqueante de amplio espectro de GJs y HCs y de canales de Px1 como la Carbenoxolona. El bloqueo de la compensación con esta maniobra, podría deberse entonces a una desincronización de las redes astrocitarias por su acción en las GJs, por su efecto en conexones y panexones, o asimismo por efectos propios en la excitabilidad neuronal como ha sido reportado por Rouach y col. (Rouach et al., 2003). Por tanto, luego se utilizaron herramientas más específicas como los péptidos miméticos, que son péptidos idénticos a ciertas secuencias de las Cxs o Panx (Giaume et al., 2013). Los Cx43 es la conexina más abundantes en cultivos astrocitarios, si bien también puede expresarse la Cx30 astrocitaria cuando se realizan co-cultivos, dado que la presencia de neuronas en el cultivo induce la expresión de Cx30 astrocitaria, un efecto dependiente de la interacción física entre estas células (Koulakoff et al., 2008).

El bloqueo específico de los HCsCx43 se logró con el péptido mimético Gap19, que bloquea los HCsCx43 sin bloquear las GJsCx43, ni bloquear HCsCx30 ni canales de Panx1 (Giaume et al., 2013; Abudara et al., 2014). Al aplicar este péptido, se observó que la función presináptica no se ajusta de manera compensatoria frente a la inactividad crónica, señalando que los HCsCx43 son indispensables para la PSH

presináptica. De acuerdo con los resultados obtenidos, varios reportes han mostrado que la activación de los HCsCx43 astrocitarios impacta en la actividad sináptica y la plasticidad (Stehberg et al., 2012; Abudara et al., 2015).

Se destaca que la expresión de HCsCx43 ha sido reportada tanto en astrocitos como en microglía y dado que los co-cultivos utilizados contienen ambos tipos gliales, no se descarta una participación de los HCs microgliales, considerando que astrocitos y microglía pueden ser socios en la modulación de la transmisión excitatoria (Pascual et al., 2012).

Por otra parte, se utilizó el péptido mimético Gap26 que también inhibe los HCsCx43 en los minutos posteriores a su aplicación, pero que de manera retardada (> 3 h) es capaz de inhibir las GJs (Evans and Leybaert, 2007; Giaume et al., 2013). Por tanto, dado el tratamiento crónico que se utiliza en los experimentos (24-36hs), con este péptido probablemente se están afectando las demás funciones astrocitarias que dependen de la funcionalidad de las redes astrogliales acopladas por GJsCx43, cuya importancia para la transmisión glutamatérgica basal y en plasticidad ya ha sido comentada (Rouach et al., 2008; Pannasch et al., 2011; Chever et al., 2014b).

Hay que considerar que al aplicar dichos péptidos se podrían producir alteraciones basales en el sistema que impidieran la inducción de fenómenos plásticos posteriores como la PSH. Sin embargo, se observó que al aplicar los péptidos en cultivos controles durante 24-36hs (sin TTX), no se producen cambios significativos en la abundancia de vGlut-1 sináptico (*Figura 28- Anexos*).

Con relación al estudio de los panexones-Panx1 y la PSH presináptica se utilizaron herramientas farmacológicas que bloquean los canales de Panx1, así como herramientas moleculares. Se observa que tanto mediante el uso de Probenecid, como del péptido mimético <sup>10</sup>Panx1, se impide el aumento compensatorio de vGlut-1, sugiriendo la implicancia de estos canales de en la PSH presináptica. En relación con estos hallazgos, el rol de la Panx1 ha sido previamente evidenciado en otros tipos de plasticidad sináptica, observándose que en animales Panx1 KO hay una alteración en el estado de plasticidad, se potencia la LTP, mientras que no se puede inducir LTD en adultos. Estas alteraciones *in vitro* se acompañan de alteraciones *in vivo* en el comportamiento, relacionadas al deterioro de la memoria espacial y de la flexibilidad de los aprendizajes (Ardiles et al., 2014; Prochnow et al., 2012; Gajardo et al., 2018).

A diferencia de lo observado con los péptidos miméticos Gap19 y Gap26, al analizar el efecto del <sup>10</sup>Panx1 sobre la actividad basal, se destaca un aumento significativo de la abundancia de vGlut-1 sináptico, sugiriendo que los canales de Panx1 están regulando la función presináptica basal, lo que concuerda con los reportes previos mencionados (*Figura 28- Anexos*). Contrariamente, el Probenecid, no produce cambios similares en la función basal, lo que podría deberse a diferencias en los mecanismos de acción y/o especificidades de estos inhibidores.

Por otra parte, se realizó la caracterización de la distribución celular de los canales de Cx43 y Panx1 mediante inmunocitoquímica en los co-cultivos utilizados. De acuerdo con la bibliografía, se observó marcaje de Cx43 en astrocitos y de Panx1 tanto en astrocitos como en neuronas. La Cx43 se detecta como marcaje puntiforme de tamaño y abundancia variable en células GFAP positivas, en concordancia con reportes previos (Koulakoff et al., 2008; Rouach et al., 2008). En algunos astrocitos se localiza preferentemente en las zonas de contacto celular. En algunos sectores se observa un marcaje punteado de Cx43 fuera de regiones marcadas con GFAP. Sin embargo, se conoce que este marcador astrocitario no define el contorno citoplásmico de los astrocitos, llegando a marcar sólo el 15% del volumen total en algunos astrocitos protoplasmáticos del hipocampo (Bushong et al., 2002). Esto se debe a que sólo se marcan los procesos astrocitarios mayores y no los procesos periféricos ni perisinápticos (Reichenbach et al., 2010). Asimismo, es posible que pudiera corresponder a Cx43 microglial, célula que no fue identificada en estos experimentos. En cambio, el marcaje de la Panx1 es citoplásmico y se presenta en astrocitos y neuronas, siendo de mayor intensidad en estas últimas, en concordancia con lo reportado (Vogt et al., 2005; Zoidl et al., 2007). En este trabajo no se investigó la localización subcelular de la Panx1 neuronal, pero Zoidl y col. ha mostrado que la Panx1 se acumula en sitios postsinápticos en sinapsis hipocámpales y de corteza (Zoidl et al., 2007). Sin embargo, hay que considerar que análisis inmunohistoquímicos de la expresión de Panx1 han mostrado que diferentes anticuerpos anti-Panx1 presentan marcaje en diferentes sitios subcelulares neuronales, lo que podría explicarse por diferentes conformaciones o asociaciones a otras proteínas en los cuerpos celulares y dendritas (Cone et al., 2013; Dahl, 2015).

### **La PSH inducida por inactividad crónica produciría cambios en la expresión de Cx43, sin alterar la expresión de la Panx1.**

Se ha evidenciado que los conexones y panexones son necesarios para la PSH presináptica, y se plantea que existan cambios en la actividad de dichos canales que permitan, por ejemplo, la liberación de gliotransmisores. Un aumento de la actividad de conexones y panexones podría estar mediado por el aumento en el número de canales expresados en la superficie de la membrana. Por otra parte, cambios en la probabilidad de apertura de los canales también determinarían un aumento de la actividad, sin afectar su expresión en la superficie celular. Estas dos posibilidades fueron analizadas en este trabajo.

Estudios realizados mediante detección inmune muestran cambios en la expresión de la Cx43 astrocitaria frente al tratamiento con TTX (24hs), observándose una mayor intensidad de fluorescencia, una mayor área de los puntos inmunoreactivos de la Cx43, y un menor número total de puntos con respecto a la condición control. Si bien estos resultados son preliminares, dado que corresponden a un experimento, podrían sugerir que la Cx43 cambia su patrón de expresión para formar *clusters* o placas en las zonas de contacto intercelular. Estudios previos han indicado que, en el caso de las GJsCx43, la formación de *clusters* es un requerimiento para que la unión sea funcional (Bukauskas et al., 2000). Teniendo esto en consideración, sería interesante investigar si existen variaciones en el acoplamiento inter-astrocitario durante la PSH. En oposición a estos resultados, un reporte previo refiere no encontrar cambios en la expresión de la Cx43 en co-cultivos de corteza tratados con TTX (1 $\mu$ M) (Koulakoff et al., 2008). Esta discordancia podría deberse a las diferencias en la edad de los cultivos utilizados al momento de la manipulación de la actividad, dado que estos autores aplicaron TTX a los 7 DIV, y durante 5 días.

En cuanto a la Panx1, no se evidenciaron cambios significativos en la expresión ni astrocitaria ni neuronal mediante inmunofluorescencia luego de 24hs de tratamiento con TTX. La estrategia utilizada para la detección de cambios en la expresión de Cx43 y Panx1 mediante inmunofluorescencia tiene sus fortalezas y sus limitaciones. Por un lado, puede ser útil para detectar cambios en los patrones de expresión. Sin embargo, para cuantificar la proteína membrana, se podría utilizar la técnica de biotinización y Western Blot. Trabajos previos han detectado variaciones de Cx43 mediante el análisis de la proteína de superficie, que no se detectaban por inmunofluorescencia

de Cx43, por lo que sería interesante investigar si esto sucede durante la PSH (Garre et al., 2010). Por otra parte, estos análisis de detección inmune fueron realizados a las 24hs de aplicado el TTX, pero sería interesante estudiar la expresión a diferentes horarios, dado que pueden haberse producido cambios que sean necesarios para la inducción de la PSH y no para el mantenimiento, por ejemplo.

### **La apertura de canales astrocitarios y neuronales aumenta durante la PSH**

Se estudiaron variaciones en la actividad de conexiones y panexones durante la PSH inducida por inactividad crónica mediante la técnica de captación de Bromuro de Etidio, que permite detectar cambios en la expresión funcional de los canales, a diferencia de la estrategia previamente utilizada. Los resultados obtenidos muestran que existe un aumento en la permeabilidad de los canales astrocitarios luego de 2hs, 5hs y 10hs de alterada la actividad del circuito con TTX, no detectando un cambio con respecto a la condición control a las 24hs. A su vez, la captación neuronal también se ve afectada, aumentando a las 2hs, mientras que a las 24hs disminuye. Por tanto, mediante esta técnica detectamos cambios en la permeabilidad astrocitaria y neuronal, y su curso temporal en el contexto de la PSH inducida por TTX. Se evidencia así que la apertura de canales neuronales es necesaria en las fases tempranas de la PSH, mientras que los canales astrocitarios permanecen abiertos más tiempo. En el caso de las neuronas, los canales de Panx1 podrían ser responsables de este aumento en la captación, y dado que estos canales son considerados vías para la liberación de ATP, se podría sugerir que la liberación de ATP neuronal sea importante en la PSH inducida por inactividad crónica. En cambio, en astrocitos, tanto los canales de Panx1 como los HCsCx43 podrían estar involucrados en el aumento de la captación. Asimismo, la apertura de estos canales podría mediar la liberación de gliotransmisores. Se destaca también que la apertura de HCsCx43 puede permitir la entrada de  $Ca^{2+}$  al astrocito, brindando otra vía para la regulación de la gliotransmisión. En este sentido, se podrían aplicar las herramientas farmacológicas utilizadas previamente para investigar cuales canales están implicados en astrocitos, siendo posible que sólo la Cx43 o la Panx1 sean los responsables de este aumento en la captación, o que estén ambos involucrados al mismo o a diferentes tiempos. Por ejemplo, en astrocitos espinales en contexto inflamatorio, se ha reportado que hay primero una apertura de canales de Panx1 y luego de HCsCx43 (Garre et al., 2010).

## **El ajuste homeostático de la función presináptica no requiere de panexones gliales**

Los resultados mencionados sugieren que los canales de Panx1 están implicados en la PSH presináptica. La utilización de antagonistas y péptidos miméticos inhiben tanto canales de Panx1 gliales como neuronales dado que los bloqueantes son colocados en el medio extracelular del cultivo. A través de la utilización de animales Panx1 KO y Panx1 WT se investigó la contribución relativa de canales Panx1 gliales y neuronales en co-cultivos. Por un lado, los resultados obtenidos plantean que la Panx1 neuronal es esencial para la compensación de la función presináptica, dado que en co-cultivos con glía Panx1 WT y neuronas Panx1 KO no se produce el ajuste compensatorio en la abundancia de vGlut-1 sináptico frente a la aplicación de TTX. Estos resultados, en conjunto con los hallazgos previos que evidencian un aumento en la permeabilidad neuronal durante las primeras horas luego del tratamiento con TTX, apoyan el planteo de que la apertura de canales de Panx1 neuronales es necesaria para la inducción y/o mantenimiento de la PSH presináptica.

En cambio, la Panx1 glial no sería esencial para mediar la señalización neuro-glial durante la PSH presináptica, dado que co-cultivos con glía deficiente de Panx1, son capaces de ajustar de manera compensatoria la función presináptica.

De manera inesperada, en los co-cultivos compuestos por neuronas y células gliales Panx1 KO, se observó un aumento significativo en la abundancia de vGlut-1 sináptico frente a la inactividad crónica, contradiciendo el resultado previo mencionado en cultivos con glía WT y neurona KO, donde la Panx1 neuronal resulta indispensable para ajustar la función presináptica. En este sentido, una explicación posible podría ser la existencia de mecanismos de compensación, ampliamente reportada con la utilización de animales KO totales para diferentes proteínas. Particularmente en la Panx1, dado que existen dos isoformas más -Panx2 y Panx3- se podría plantear que exista una compensación en el sistema que se desencadene frente a la ausencia total de la proteína en el cultivo. Específicamente la Panx2 se expresa de manera abundante en el cerebro, incluyendo en las neuronas, en la membrana de vesículas intracelulares (Boassa et al., 2015). Una hipótesis es que la Panx2 presente en compartimientos subcelulares, frente a la ausencia de la Panx1 en el cultivo (tanto en células gliales como neuronales), se inserte en la membrana y forme panexones funcionales, recuperando la actividad perdida. Por otra parte, recientemente se ha

sugerido un mecanismo de compensación por parte de la Panx3 en el órgano vomeronasal en animales Panx1 KO, que sería capaz de liberar ATP para mantener los niveles necesarios (Whyte-Fagundes et al., 2018). También se ha reportado que proteínas gliales pueden cambiar sus niveles de expresión en los animales Panx1 KO. Suadicani y col. mostraron que los astrocitos derivados de animales Panx1 KO presentan un mayor acoplamiento, lo que se debe a un aumento en los niveles de expresión de Cx43 de 1,6 veces en comparación con astrocitos de animales control (Suadicani et al., 2012). Esto podría explicar que la Cx43 esté compensando la función de la Panx1 glial y por esto no se vean alteraciones en la PSH presináptica al utilizar glía procedente de animales Panx1 KO.

Es importante tener en cuenta que los experimentos realizados para el análisis diferencial de la contribución de panexones gliales y neuronales en la PSH, se realizaron utilizando ratas WT y ratones KO, por lo que sería relevante confirmar dichos resultados mediante la utilización de ratones WT y KO.

### **Modulación de la función presináptica por el ATP y la activación de los P2X<sub>7</sub>R**

Tomando en consideración los resultados expuestos, los HCsCx43 y los canales de Panx1 cumplen un rol importante en la PSH presináptica. Se ha demostrado que tanto el glutamato como el ATP permean HCsCx43 astrocitarios. Asimismo, los canales de Panx1 tanto gliales como neuronales son considerados vías importantes para la liberación del ATP, que una vez liberado actúa de manera autocrina o paracrina en receptores purinérgicos. La liberación de glutamato a través de canales de Panx1 es más discutida, si bien se ha reportado tanto liberación de ATP y glutamato por canales Panx1 en microglía (Orellana et al., 2011a).

Estudios realizados en el laboratorio han comenzado a investigar el rol del ATP en la PSH, a través de la manipulación de los niveles extracelulares de ATP en co-cultivos neurona/glía WT<sup>1</sup>. Se ha visto que el tratamiento con Apirasa (5U/ml) – enzima que degrada el ATP – previene el incremento compensatorio en la intensidad de fluorescencia asociada a vGlut-1 sináptico cuando se aplica 15 minutos previo al TTX. A su vez, el tratamiento con MgATP (500µM; 24hs), al ser aplicado al medio extracelular de co-cultivos en condiciones basales, promueve un aumento en la abundancia de vGlut-1 similar al producido frente al tratamiento con TTX. Resultados

---

<sup>1</sup> Datos no publicados provenientes de la Tesis de Maestría que está realizando Alberto Rafael.

semejantes se obtienen si se aplica BzATP (10 $\mu$ M; 24hs) – agonista de los receptores de ATP de tipo P2X<sub>7</sub> – al medio extracelular. Se destaca que el ATP se une al P2X<sub>7</sub>R y lo activa, lo que puede provocar la liberación de gliotransmisores por el propio canal del P2X<sub>7</sub>, así como producir la entrada de Ca<sup>2+</sup> a través del poro. Además, la activación de los P2X<sub>7</sub>R puede gatillar la apertura de canales de Panx1 que median la liberación de ATP en astrocitos (Pelegrin and Surprenant, 2006; Locovei et al., 2007; Iglesias et al., 2009).

Es importante señalar que la liberación del ATP al medio podría también involucrar la excitotoxicidad dependiente del Ca<sup>2+</sup>, además de las vías mencionadas a través de conexiones, panexones, y el canal del P2X<sub>7</sub>R.

Teniendo en consideración estos resultados mencionados que sugieren un papel importante del ATP extracelular y de la señalización purinérgica en cultivos WT, en este trabajo se realizaron tratamientos con MgATP y BzATP en co-cultivos de animales Panx1 KO. Se observó que existe una modulación de la función presináptica con dichos tratamientos en cultivos deficientes en Panx1 glial y presencia de Panx1 neuronal, mientras que no hay cambios presinápticos en la abundancia de vGlut-1 en cultivos en presencia de Panx1 glial y ausencia de Panx1 neuronal. Esto sugiere que el incremento de la función presináptica producido por el ATP y la activación de los P2X<sub>7</sub>R requiere de canales de Panx1 neuronales. En cultivos completamente Panx1 KO, sin embargo, también se observa un cambio significativo de vGlut-1 sináptico al agregar MgATP. Estos resultados son semejantes a los obtenidos frente al tratamiento con TTX, planteando las mismas discusiones.

En conjunto, se observa que la presencia de la Panx1 neuronal es necesaria para que la activación específica de los P2X<sub>7</sub>R provoque incrementos significativos en la función presináptica. Esto estaría de acuerdo con la interacción física y funcional específica que tienen el canal de Panx1 y los P2X<sub>7</sub>R (Locovei et al., 2007; Silverman et al., 2009). La señalización purinérgica dependiente de los P2X<sub>7</sub>R es relevante, y su activación podría provocar entrada de Ca<sup>2+</sup> en la presinapsis, modulando la función presináptica y la *pr*. Asimismo, la activación de los P2X<sub>7</sub>R produce apertura de canales Panx1, tanto en astrocitos como en neuronas, contribuyendo a la liberación de más ATP.

### **El ATP no sería el único gliotransmisor implicado en la PSH presináptica**

Según lo expuesto hasta el momento, las células gliales podrían ser necesarias para la liberación de gliotransmisores, particularmente el ATP, que modula la PSH

presináptica. Asimismo, estudios preliminares del laboratorio, muestran que al aplicar Ácido Fluorocítrico (50  $\mu$ M) – un inhibidor del ciclo de Krebs que compromete preferentemente el metabolismo glial – a co-cultivos previo al tratamiento con TTX, se impide el incremento compensatorio de vGlut-1<sup>2</sup>. Estos resultados, en conjunto con los expuestos hasta el momento en este trabajo, proponen que el ATP de origen glial cumpla un papel esencial.

Sin embargo, el agregado de MgATP en cultivos enriquecidos en neuronas, no es suficiente para producir cambios en vGlut-1 sináptico, planteando que la función de las células gliales como fuente de ATP extracelular no es lo único importante para los mecanismos de PSH presináptica. Posiblemente, haya otros gliotransmisores involucrados, como el glutamato. De acuerdo por lo reportado por Covelo y Araque, el mismo astrocito hipocampal puede tener una liberación bifásica regulada de glutamato y de ATP dependiendo de la actividad neuronal (Covelo and Araque, 2018).

Resultados similares a los obtenidos con el MgATP se evidenciaron al activar los P2X<sub>7</sub>R en cultivos enriquecidos en neuronas, sugiriendo que la activación de los P2X<sub>7</sub>R neuronales no es suficiente por sí sola para desencadenar cambios presinápticos en ausencia de células gliales. Estos resultados también podrían sugerir que los P2X<sub>7</sub>R gliales u otros receptores purinérgicos gliales y/o neuronales estén implicados en la señalización.

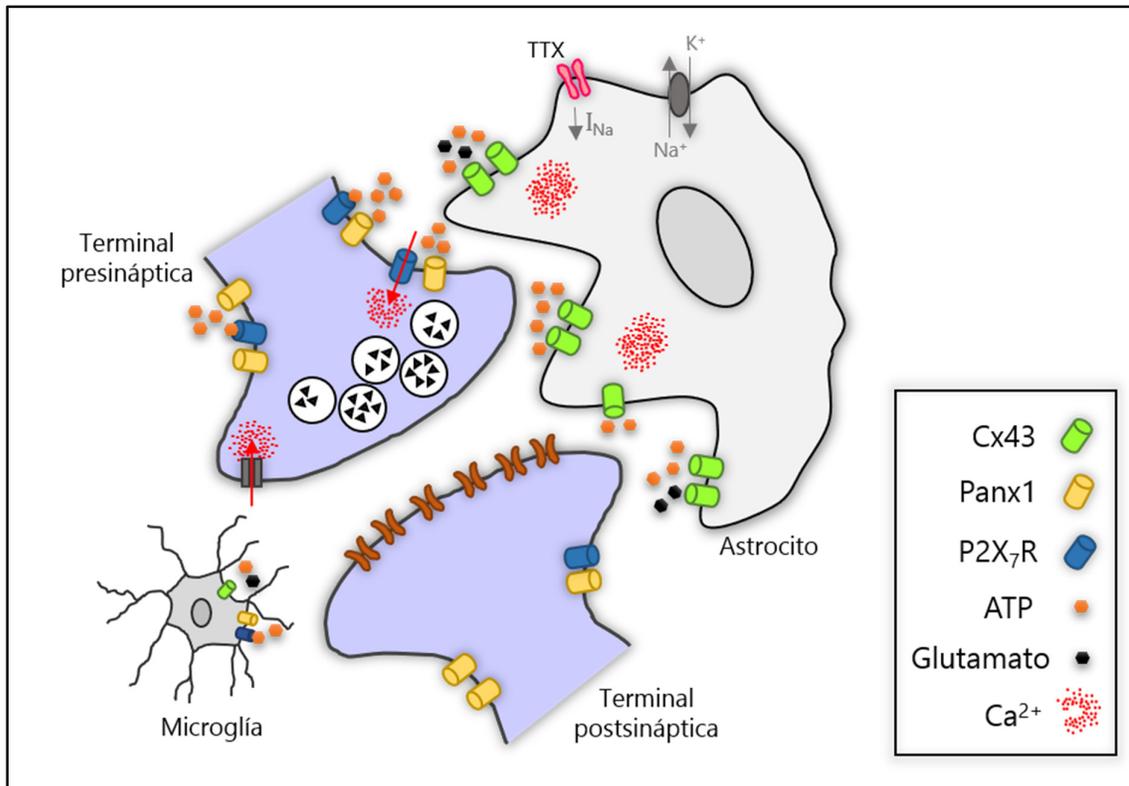
En conjunto, se evidencia que la comunicación bidireccional entre neuronas y glía es indispensable para la PSH presináptica, siendo necesaria la apertura de conexiones gliales y panexones neuronales. Asimismo, el ATP es capaz de modular la función presináptica, pero no es por sí solo suficiente para producir los fenómenos plásticos en ausencia de células gliales. Tanto panexones como conexones podrían contribuir a mantener niveles de ATP necesarios para la inducción y/o mantenimiento de la PSH presináptica.

Tomando en consideración los resultados de esta tesis, un escenario posible es planteado en el esquema de la *Figura 27*. Frente a la inactividad crónica inducida con TTX en el circuito, las células gliales serían capaces de sensar la disminución en la actividad neuronal y/o de su propia excitabilidad, por una vía de señalización dependiente de las variaciones del Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> intracelular. Como consecuencia se

---

<sup>2</sup> Datos no publicados provenientes de la Tesis de Maestría que está realizando Alberto Rafael.

produciría la liberación de gliotransmisores como el ATP a través de HCxCx43 astrocitarios. El ATP, a través de la activación de los P2X<sub>7</sub>R presinápticos, produciría la apertura de canales de Panx1 neuronales que contribuirían a la liberación de más ATP. Asimismo, la activación de P2X<sub>7</sub>R presinápticos podrían mediar aumentos del Ca<sup>2+</sup> intracelular y la consecuente modulación de la *pr*. Otros gliotransmisores liberados por HCxCx43 como el glutamato estarían involucrados. Asimismo, no se descarta una participación microglial.



**FIGURA 27. Posible modelo esquemático de la interacción neuro-glial en la regulación de la PSH presináptica.** La inactividad crónica del circuito inducida con TTX, podría causar cambios en la señalización del Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> astroglial, que tendría como consecuencia la liberación de gliotransmisores como el ATP a través de HCxCx43. El ATP a nivel presináptico activaría los P2X<sub>7</sub>R neuronales y produciría la liberación de más ATP mediado por canales de Panx1 neuronales. La activación de los P2X<sub>7</sub>R neuronales también podría aumentar la entrada de Ca<sup>2+</sup> a la terminal presináptica y modular la *pr*. Otros gliotransmisores liberados por HCxCx43 como el glutamato podrían estar involucrados. Asimismo, no se descarta una participación microglial.

## CONCLUSIONES

En resumen, en este trabajo se demuestra una participación esencial de las células gliales en los mecanismos de PSH presináptica. Particularmente, la liberación de factores solubles por parte de estas células es indispensable para modular la función presináptica.

Asimismo, se observa que la inducción y/o el mantenimiento de la PSH inducida por inactividad crónica produce la apertura de canales gliales y neuronales.

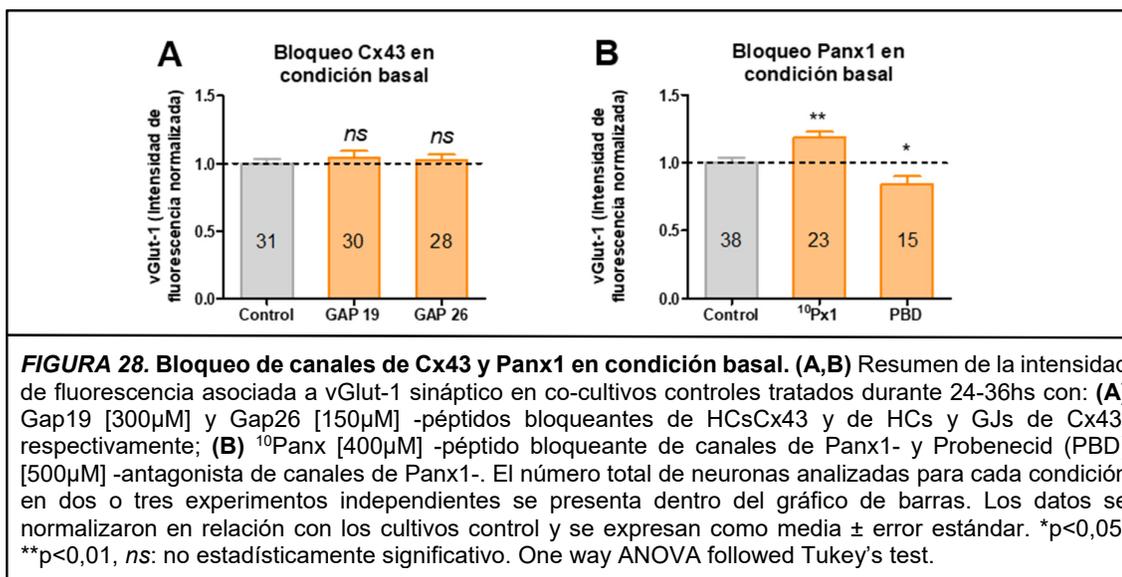
Específicamente, se demuestra la participación de HCsCx43 y canales de Panx1. Los HCsCx43 gliales, vías para la liberación de gliotransmisores, son indispensables para mediar los ajustes homeostáticos de la función presináptica. Asimismo, los canales de Panx1 participan de la PSH presináptica, observándose un rol principal de los canales neuronales.

De esta manera, el presente trabajo destaca la importancia de la interacción neuroglial en la modulación homeostática de la función presináptica, demostrando una participación esencial de las células gliales, de los HCsCx43 y de canales de Panx1 en este proceso.

## PERSPECTIVAS

- Se planea complementar los resultados obtenidos realizando estudios funcionales para evaluar la *pr*, ya sea utilizando técnicas de imagenología funcional como los marcadores FM o pHluorinas, que permiten monitorizar la función presináptica, y/o técnicas de electrofisiología, por ejemplo, a través de la medición del *paired-pulse ratio* (PPR) (Branco et al., 2008; Tokuoka and Goda, 2008; Vituriera et al., 2011).
- Para determinar si existen variaciones en los niveles de ATP durante la PSH, se medirá la concentración extracelular de ATP en el medio de cultivos tratados con TTX y cultivos sin tratamiento.
- Se estudiará la implicancia diferencial de los distintos tipos de células gliales en la PSH presináptica realizando diferentes tipos de cultivos enriquecidos en microglía y astrocitos.
- Se estudiarán los niveles de Panx2 y Cx43 en co-cultivos provenientes de animales Panx1 KO mediante Western Blot.

## ANEXOS



## REFERENCIAS

- Abbott, L.F., and S.B. Nelson. 2000. Synaptic plasticity: Taming the beast. *Nat. Neurosci.* 3:1178–1183. doi:10.1038/81453.
- Abbott, L.F., and W.G. Regehr. 2004. Synaptic computation. *Nature.* 431:796–803. doi:10.1038/nature03010.
- Abudara, V., J. Bechberger, M. Freitas-Andrade, M. De Bock, N. Wang, G. Bultynck, C.C. Naus, L. Leybaert, and C. Giaume. 2014. The connexin43 mimetic peptide Gap19 inhibits hemichannels without altering gap junctional communication in astrocytes. *Front. Cell. Neurosci.* 8:1–8. doi:10.3389/fncel.2014.00306.
- Abudara, V., L. Roux, G. Dall'Arcangelo, I. Matias, J. Dulong, J.P. Mothet, N. Rouach, and C. Giaume. 2015. Activated microglia impairs neuroglial interaction by opening Cx43 hemichannels in hippocampal astrocytes. *Glia.* 63:795–811. doi:10.1002/glia.22785.
- Accorsi-Mendonça, D., D.B. Zoccal, L.G.H. Bonagamba, and B.H. Machado. 2013. Glial cells modulate the synaptic transmission of NTS neurons sending projections to ventral medulla of Wistar rats. *Physiol. Rep.* 1:n/a-n/a. doi:10.1002/phy2.80.
- Adamsky, A., A. Kol, T. Kreisel, A. Doron, N. Ozeri-Engelhard, T. Melcer, R. Refaeli, H. Horn, L. Regev, M. Groyzman, M. London, and I. Goshen. 2018. Astrocytic Activation Generates De Novo Neuronal Potentiation and Memory Enhancement. *Cell.* 174:59–71.e14. doi:10.1016/j.cell.2018.05.002.
- Alabi, A.A., and R.W. Tsien. 2012. Synaptic Vesicle Pools and Dynamics. 1–18. doi:10.1101/cshperspect.a013680.
- Andersen, N., N. Krauth, and S. Nabavi. 2017. Hebbian plasticity in vivo: relevance and induction. *Curr. Opin. Neurobiol.* 45:188–192. doi:10.1016/j.conb.2017.06.001.
- Anselmi, F., V.H. Hernandez, G. Crispino, A. Seydel, S. Ortolano, S.D. Roper, N. Kessar, W. Richardson, G. Rickheit, M.A. Filippov, H. Monyer, and F. Mammano. 2008. ATP release through connexin hemichannels and gap junction transfer of second messengers propagate Ca<sup>2+</sup> signals across the inner ear. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105:18770–18775. doi:10.1073/pnas.0800793105.
- Aoto, J., C.I. Nam, M.M. Poon, P. Ting, and L. Chen. 2008. Synaptic Signaling by All-Trans Retinoic Acid in Homeostatic Synaptic Plasticity. *Neuron.* 60:308–320. doi:10.1016/j.neuron.2008.08.012.
- Araque, A., G. Carmignoto, P.G. Haydon, S.H.R. Oliet, R. Robitaille, and A. Volterra. 2014. Gliotransmitters travel in time and space. *Neuron.* 81:728–739. doi:10.1016/j.neuron.2014.02.007.
- Araque, A., V. Parpura, R. Sanzgiri, and P.G. Haydon. 1999. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *22:207–208.*
- Ardiles, A.O., C. Flores-muñoz, G. Toro-ayala, A.M. Cárdenas, A.G. Palacios, P. Muñoz, M. Fuenzalida, J.C. Saez, and A.D. Martinez. 2014. Pannexin 1 Regulates Bidirectional Hippocampal Synaptic Plasticity in Adult Mice. *Front. Cell. Neurosci.* 8:1–11. doi:10.3389/fncel.2014.00171.
- Arendt, K.L., F. Sarti, and L. Chen. 2013. Chronic Inactivation of a Neural Circuit Enhances LTP by Inducing Silent Synapse Formation. *J. Neurosci.* 33:2087–2096. doi:10.1523/JNEUROSCI.3880-12.2013.
- Arendt, K.L., Z. Zhang, S. Ganesan, M. Hintze, M.M. Shin, Y. Tang, A. Cho, I.A. Graef, and L. Chen. 2015. Calcineurin mediates homeostatic synaptic plasticity by regulating retinoic acid synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112:E5744–E5752. doi:10.1073/pnas.1510239112.
- Arganda-Carreras, I., V. Kaynig, C. Rueden, K.W. Eliceiri, J. Schindelin, A. Cardona, and H.S. Seung. 2017. Trainable Weka Segmentation: A machine learning tool for microscopy pixel classification. *Bioinformatics.* 33:2424–2426. doi:10.1093/bioinformatics/btx180.
- Azevedo, F.A.C., L.R.B. Carvalho, L.T. Grinberg, J.M. Farfel, R.E.L. Ferretti, R.E.P. Leite, W.J. Filho, R. Lent, and S. Herculano-Houzel. 2009. Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *J. Comp. Neurol.* 513:532–541. doi:10.1002/cne.21974.
- Bao, L., S. Locovei, and G. Dahl. 2004. Pannexin membrane channels are mechanosensitive conduits

- for ATP. *FEBS Lett.* 572:65–68. doi:10.1016/j.febslet.2004.07.009.
- Baranova, A., D. Ivanov, N. Petrash, A. Pestova, M. Skoblov, I. Kelmanson, D. Shagin, S. Nazarenko, E. Geraymovych, O. Litvin, A. Tiunova, T.L. Born, N. Usman, D. Staroverov, S. Lukyanov, and Y. Panchin. 2004. The mammalian pannexin family is homologous to the invertebrate innexin gap junction proteins. *Genomics.* 83:706–716. doi:10.1016/j.ygeno.2003.09.025.
- Barbe, M.T. 2006. Cell-Cell Communication Beyond Connexins: The Pannexin Channels. *Physiology.* 21:103–114. doi:10.1152/physiol.00048.2005.
- von Bartheld, C.S., J. Bahney, and S. Herculano-Houzel. 2016. The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain: A review of 150 years of cell counting. *J. Comp. Neurol.* 524:3865–3895. doi:10.1002/cne.24040.
- Bats, C., L. Groc, and D. Choquet. 2007. The Interaction between Stargazin and PSD-95 Regulates AMPA Receptor Surface Trafficking. *Neuron.* 53:719–734. doi:10.1016/j.neuron.2007.01.030.
- Beattie, E.C. 2002. Control of Synaptic Strength by Glial TNF $\alpha$ . *Science (80- ).* 295:2282–2285. doi:10.1126/science.1067859.
- Bekkers, J.M., and C.F. Stevens. 1990. Presynaptic mechanism for long-term potentiation in the hippocampus. *Nature.* 346:724–729. doi:10.1038/346724a0.
- Bennett, M. V, L.C. Barrio, T. a Bargiello, D.C. Spray, E. Hertzberg, and J.C. Sáez. 1991. Gap junctions: new tools, new answers, new questions. *Neuron.* 6:305–320. doi:10.1016/0896-6273(91)90241-Q.
- Bennett, M.V.L., J.E. Contreras, F.F. Bukauskas, and J.C. Sáez. 2003. New roles for astrocytes: Gap junction hemichannels have something to communicate. *Trends Neurosci.* 26:610–617. doi:10.1016/j.tins.2003.09.008.
- Bennett, M.V.L., and R.S. Zukin. 2004. Electrical Coupling and Neuronal Synchronization in the Mammalian Brain. *Neuron.* 41:495–511. doi:10.1016/S0896-6273(04)00043-1.
- Biederer, T., P.S. Kaeser, and T.A. Blanpied. 2017. Transcellular Nanoalignment of Synaptic Function. *Neuron.* 96:680–696. doi:10.1016/j.neuron.2017.10.006.
- Boassa, D., P. Nguyen, J. Hu, M.H. Ellisman, and G.E. Sosinsky. 2015. Pannexin2 oligomers localize in the membranes of endosomal vesicles in mammalian cells while Pannexin1 channels traffic to the plasma membrane. *Front. Cell. Neurosci.* 8:1–15. doi:10.3389/fncel.2014.00468.
- Bolton, M.M., A.J. Pittman, and D.C. Lo. 2000. Brain-derived neurotrophic factor differentially regulates excitatory and inhibitory synaptic transmission in hippocampal cultures. *J. Neurosci.* 20:3221–3232. doi:10.1523/jneurosci.1234-11.2011.
- Boué-Grabot, E., and Y. Pankratov. 2017. Modulation of Central Synapses by Astrocyte-Released ATP and Postsynaptic P2X Receptors. *Neural Plast.* 2017. doi:10.1155/2017/9454275.
- Branco, T., and K. Staras. 2009. The probability of neurotransmitter release: Variability and feedback control at single synapses. *Nat. Rev. Neurosci.* 10:373–383. doi:10.1038/nrn2634.
- Branco, T., K. Staras, K.J. Darcy, and Y. Goda. 2008. Local Dendritic Activity Sets Release Probability at Hippocampal Synapses. *Neuron.* 59:475–485. doi:10.1016/j.neuron.2008.07.006.
- Breton, J.-D., and G.J. Stuart. 2009. Loss of sensory input increases the intrinsic excitability of layer 5 pyramidal neurons in rat barrel cortex. *J. Physiol.* 587:5107–5119. doi:10.1113/jphysiol.2009.180943.
- Bruzzone, R., M.T. Barbe, N.J. Jakob, and H. Monyer. 2005. Pharmacological properties of homomeric and heteromeric pannexin hemichannels expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Neurochem.* 92:1033–1043. doi:10.1111/j.1471-4159.2004.02947.x.
- Bruzzone, R., S.G. Hormuzdi, M.T. Barbe, A. Herb, and H. Monyer. 2003. Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100:13644–13649. doi:10.1073/pnas.2233464100.
- Bukauskas, F.F., K. Jordan, A. Bukauskiene, M.V.L. Bennett, P.D. Lampe, D.W. Laird, and V.K. Verselis. 2000. Clustering of connexin 43-enhanced green fluorescent protein gap junction channels and functional coupling in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97:2556–2561. doi:10.1073/pnas.050588497.

- Burnstock, G. 2007. Physiology and Pathophysiology of Purinergic Neurotransmission. 659–797. doi:10.1152/physrev.00043.2006.
- Burrone, J., and V.N. Murthy. 2003. Synaptic gain control and homeostasis. *Curr. Opin. Neurobiol.* 13:560–567. doi:10.1016/j.conb.2003.09.007.
- Bushong, E. a, M.E. Martone, Y.Z. Jones, and M.H. Ellisman. 2002. Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J. Neurosci.* 22:183–192. doi:22/1/183 [pii].
- De Camilli, P., V. Haucke, K. Takei, and E. Mugnaini. 2003. The structure of synapses. In Synapses. M. Cowman, T.C. Südhof, and C.F. Stevens, editors. The Johns Hopkins University Press. 89–133.
- Del Castillo, J., and B. Katz. 1954. Quantal components of the end-plate potential. *J. Physiol.* 124:560–573. doi:10.1113/jphysiol.1954.sp005129.
- de Chaumont, F., S. Dallongeville, N. Chenouard, N. Hervé, S. Pop, T. Provoost, V. Meas-Yedid, P. Pankajakshan, T. Lecomte, Y. Le Montagner, T. Lagache, A. Dufour, and J.-C. Olivo-Marin. 2012. Icy: an open bioimage informatics platform for extended reproducible research. *Nat. Methods.* 9:690–696. doi:10.1038/nmeth.2075.
- Chen, J.L., K.L. Villa, J.W. Cha, P.T.C. So, Y. Kubota, and E. Nedivi. 2012. Clustered Dynamics of Inhibitory Synapses and Dendritic Spines in the Adult Neocortex. *Neuron.* 74:361–373. doi:10.1016/j.neuron.2012.02.030.
- Chen, X., L. Vinade, R.D. Leapman, J.D. Petersen, T. Nakagawa, T.M. Phillips, M. Sheng, and T.S. Reese. 2005. Mass of the postsynaptic density and enumeration of three key molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102:11551–11556. doi:10.1073/pnas.0505359102.
- Cheung, G., O. Chever, and N. Rouach. 2014. Connexons and pannexons: newcomers in neurophysiology. *Front. Cell. Neurosci.* 8:1–19. doi:10.3389/fncel.2014.00348.
- Chever, O., C.-Y. Lee, and N. Rouach. 2014a. Astroglial Connexin43 Hemichannels Tune Basal Excitatory Synaptic Transmission. *J. Neurosci.* 34:11228–11232. doi:10.1523/JNEUROSCI.0015-14.2014.
- Chever, O., U. Pannasch, P. Ezan, N. Rouach, and N. Rouach. 2014b. Astroglial connexin 43 sustains glutamatergic synaptic efficacy. *Phil. Trans. R. Soc. BT.*
- Choquet, D., and A. Triller. 2013. The dynamic synapse. *Neuron.* 80:691–703. doi:10.1016/j.neuron.2013.10.013.
- Cingolani, L.A., and Y. Goda. 2008. Differential involvement of  $\beta 3$  integrin in pre- and postsynaptic forms of adaptation to chronic activity deprivation. *Neuron Glia Biol.* 4:179–187. doi:10.1017/S1740925X0999024X.
- Cone, A.C., C. Ambrosi, E. Scemes, M.E. Martone, and G.E. Sosinsky. 2013. A comparative antibody analysis of pannexin1 expression in four rat brain regions reveals varying subcellular localizations. *Front. Pharmacol.* 4 FEB:1–19. doi:10.3389/fphar.2013.00006.
- Connors, B.W., and M.A. Long. 2004. Electrical Synapses in the Mammalian Brain. *Annu. Rev. Neurosci.* 27:393–418. doi:10.1146/annurev.neuro.26.041002.131128.
- Contreras, J.E., J.C. Saez, F.F. Bukauskas, and M.V.L. Bennett. 2003. Gating and regulation of connexin 43 (Cx43) hemichannels. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100:11388–11393. doi:10.1073/pnas.1434298100.
- Contreras, J.E., H.A. Sanchez, E.A. Eugenin, D. Speidel, M. Theis, K. Willecke, F.F. Bukauskas, M.V.L. Bennett, and J.C. Saez. 2002. Metabolic inhibition induces opening of unapposed connexin 43 gap junction hemichannels and reduces gap junctional communication in cortical astrocytes in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99:495–500. doi:10.1073/pnas.012589799.
- Cotrina, M.L., J.H. Lin, a Alves-Rodrigues, S. Liu, J. Li, H. Azmi-Ghadimi, J. Kang, C.C. Naus, and M. Nedergaard. 1998. Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95:15735–15740. doi:10.1073/pnas.95.26.15735.
- Covelo, A., and A. Araque. 2018. Neuronal activity determines distinct gliotransmitter release from a single astrocyte. *Elife.* 7:1–19. doi:10.7554/eLife.32237.

- Custer, K.L. 2006. Synaptic Vesicle Protein 2 Enhances Release Probability at Quiescent Synapses. *J. Neurosci.* 26:1303–1313. doi:10.1523/JNEUROSCI.2699-05.2006.
- Dahl, G. 2015. ATP release through pannexon channels. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 370. doi:10.1098/rstb.2014.0191.
- Dani, A., B. Huang, J. Bergan, C. Dulac, and X. Zhuang. 2010. Superresolution Imaging of Chemical Synapses in the Brain. *Neuron.* 68:843–856. doi:10.1016/j.neuron.2010.11.021.
- Davis, G.W., and M. Müller. 2015. Homeostatic Control of Presynaptic Neurotransmitter Release. *Annu. Rev. Physiol.* 77:251–270. doi:10.1146/annurev-physiol-021014-071740.
- Dermietzel, R., O. Traub, T.K. Hwang, E. Beyer, M. V Bennett, D.C. Spray, and K. Willecke. 1989. Differential expression of three gap junction proteins in developing and mature brain tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86:10148–10152. doi:10.1073/pnas.86.24.10148.
- Desai, N.S., R.H. Cudmore, S.B. Nelson, and G.G. Turrigiano. 2002. Critical periods for experience-dependent synaptic scaling in visual cortex. *Nat. Neurosci.* 5:783–789. doi:10.1038/nn878.
- Desai, N.S., L.C. Rutherford, and G.G. Turrigiano. 1999. BDNF regulates the intrinsic excitability of cortical neurons. *Learn. Mem. (Cold Spring Harb. NY).* 6:284–291. doi:10.1101/lm.6.3.284.
- Dityatev, A., and M. Schachner. 2003. Extracellular matrix molecules and synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* 4:456–468. doi:10.1038/nrn1115.
- Dobrunz, L.E., and C.F. Stevens. 1997. Heterogeneity of release probability, facilitation, and depletion at central synapses. *Neuron.* 18:995–1008.
- Echegoyen, J., A. Neu, K.D. Graber, and I. Soltesz. 2007. Homeostatic plasticity studies using in vivo hippocampal activity-blockade: Synaptic scaling, intrinsic plasticity and age-dependence. *PLoS One.* 2. doi:10.1371/journal.pone.0000700.
- Evans, W.H., and L. Leybaert. 2007. Mimetic peptides as blockers of connexin channel-facilitated intercellular communication. *Cell Commun. Adhes.* 14:265–273. doi:10.1080/15419060801891034.
- Fellin, T., O. Pascual, S. Gobbo, T. Pozzan, P.G. Haydon, and G. Carmignoto. 2004. Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors. *Neuron.* 43:729–743. doi:10.1016/j.neuron.2004.08.011.
- Fernandes, D., and A.L. Carvalho. 2016. Mechanisms of homeostatic plasticity in the excitatory synapse. *J. Neurochem.* 139:973–996. doi:10.1111/jnc.13687.
- Fields, R.D., and G. Burnstock. 2006. Purinergic Signalling in Neuron-Glia Interactions. *Nat Rev Neurosci.* 7:1–291. doi:10.1002/9780470032244.
- Fields, R.D., and B. Stevens. 2000. ATP: An extracellular signaling molecule between neurons and glia. *Trends Neurosci.* 23:625–633. doi:10.1016/S0166-2236(00)01674-X.
- Fioravante, D., and W.G. Regehr. 2011. Short-term forms of presynaptic plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.* 21:269–274. doi:10.1016/j.conb.2011.02.003.
- Foster, M., and C.S. Sherrington. 1897. A Textbook of Physiology, Part Three: The Central Nervous System, Seventh Edition. *MacMillan Co Ltd.* 929.
- Frank, C.A., M.J. Kennedy, C.P.P. Goold, K.W. Marek, and G.W.W. Davis. 2006. Mechanisms Underlying the Rapid Induction and Sustained Expression of Synaptic Homeostasis. *Neuron.* 52:663–677. doi:10.1016/j.neuron.2006.09.029.
- Futai, K., M.J. Kim, T. Hashikawa, P. Scheiffele, M. Sheng, and Y. Hayashi. 2007. Retrograde modulation of presynaptic release probability through signaling mediated by PSD-95-neuroigin. *Nat. Neurosci.* 10:186–195. doi:10.1038/nn1837.
- Gajardo, I., C.S. Salazar, D. Lopez-Espíndola, C. Estay, C. Flores-Muñoz, C. Elgueta, A.M. Gonzalez-Jamett, A.D. Martínez, P. Muñoz, and Á.O. Ardiles. 2018. Lack of pannexin 1 alters synaptic glun2 subunit composition and spatial reversal learning in mice. *Front. Mol. Neurosci.* 11:114. doi:10.3389/fnmol.2018.00114.
- Garre, J.M., M. a. Retamal, P. Cassina, L. Barbeito, F.F. Bukauskas, J.C. Saez, M.V.L. Bennett, and V.

- Abudara. 2010. FGF-1 induces ATP release from spinal astrocytes in culture and opens pannexin and connexin hemichannels. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107:22659–22664. doi:10.1073/pnas.1013793107.
- Giaume, C., C. Fromaget, A. El Aoumari, J. Cordier, J. Glowinski, and D. Grost. 1991. Gap junctions in cultured astrocytes: Single-channel currents and characterization of channel-forming protein. *Neuron.* 6:133–143. doi:10.1016/0896-6273(91)90128-M.
- Giaume, C., L. Leybaert, C.C. Naus, and J.C. Sáez. 2013. Connexin and pannexin hemichannels in brain glial cells: Properties, pharmacology, and roles. *Front. Pharmacol.* 4 JUL:1–17. doi:10.3389/fphar.2013.00088.
- Giaume, C., and K.D. McCarthy. 1996. Control of gap-junctional communication in astrocytic networks. *Trends Neurosci.* 19:319–325. doi:10.1016/0166-2236(96)10046-1.
- Giaume, C., J.A. Orellana, V. Abudara, and J.C. Sáez. 2012. Connexin-Based Channels in Astrocytes: How to Study Their Properties. *In Astrocytes: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol. 814, R. Milner, editor. Springer Science+Business Media. 283–303.
- Goel, A., B. Jiang, L.W. Xu, L. Song, A. Kirkwood, and H.K. Lee. 2006. Cross-modal regulation of synaptic AMPA receptors in primary sensory cortices by visual experience. *Nat. Neurosci.* 9:1001–1003. doi:10.1038/nn1725.
- De Gois, S. 2005. Homeostatic Scaling of Vesicular Glutamate and GABA Transporter Expression in Rat Neocortical Circuits. *J. Neurosci.* 25:7121–7133. doi:10.1523/JNEUROSCI.5221-04.2005.
- Goold, C.P., and G.W. Davis. 2007. The BMP Ligand Gbb Gates the Expression of Synaptic Homeostasis Independent of Synaptic Growth Control. *Neuron.* 56:109–123. doi:10.1016/j.neuron.2007.08.006.
- Gordon, G.R.J., D. V Baimoukhametova, S. a Hewitt, W.R. a K.J.S. Rajapaksha, T.E. Fisher, and J.S. Bains. 2005. Norepinephrine triggers release of glial ATP to increase postsynaptic efficacy. *Nat. Neurosci.* 8:1078–1086. doi:10.1038/nn1498.
- Han, Y., H. xiao Yu, M. li Sun, Y. Wang, W. Xi, and Y. qin Yu. 2014. Astrocyte-restricted disruption of connexin-43 impairs neuronal plasticity in mouse barrel cortex. *Eur. J. Neurosci.* 39:35–45. doi:10.1111/ejn.12394.
- Hebb, D.O. 1949. The Organization of Behavior; A Neuropsychological Theory. *Am. J. Psychol.* 63:633. doi:10.2307/1418888.
- Henneberger, C., T. Papouin, S.H.R. Oliet, and D.A. Rusakov. 2010. Long-term potentiation depends on release of d-serine from astrocytes. *Nature.* 463:232–236. doi:10.1038/nature08673.
- Henry, F.E., A.J. McCartney, R. Neely, A.S. Perez, C.J.L. Carruthers, E.L. Stuenkel, K. Inoki, and M.A. Sutton. 2012. Retrograde Changes in Presynaptic Function Driven by Dendritic mTORC1. *J. Neurosci.* 32:17128–17142. doi:10.1523/JNEUROSCI.2149-12.2012.
- Herculano-Houzel, S. 2014. The glia/neuron ratio: How it varies uniformly across brain structures and species and what that means for brain physiology and evolution. *Glia.* 62:1377–1391. doi:10.1002/glia.22683.
- Herman, M.A., F. Ackermann, T. Trimbuch, and C. Rosenmund. 2014. Vesicular Glutamate Transporter Expression Level Affects Synaptic Vesicle Release Probability at Hippocampal Synapses in Culture. *J. Neurosci.* 34:11781–11791. doi:10.1523/JNEUROSCI.1444-14.2014.
- Hofer, S.B., T.D. Mrsic-Flogel, T. Bonhoeffer, and M. Hübener. 2009. Experience leaves a lasting structural trace in cortical circuits. *Nature.* 457:313–317. doi:10.1038/nature07487.
- Holderith, N., A. Lorincz, G. Katona, B. Rózsa, A. Kulik, M. Watanabe, and Z. Nusser. 2012. Release probability of hippocampal glutamatergic terminals scales with the size of the active zone. *Nat. Neurosci.* 15:988–997. doi:10.1038/nn.3137.
- Hruska, M., N. Henderson, S.J. Le Marchand, H. Jafri, and M.B. Dalva. 2018. Synaptic nanomodules underlie the organization and plasticity of spine synapses. *Nat. Neurosci.* 21:671–682. doi:10.1038/s41593-018-0138-9.
- Hu, J.H., J.M. Park, S. Park, B. Xiao, M.H. Dehoff, S. Kim, T. Hayashi, M.K. Schwarz, R.L. Huganir, P.H. Seeburg, D.J. Linden, and P.F. Worley. 2010. Homeostatic Scaling Requires Group I mGluR Activation

- Mediated by Homer1a. *Neuron*. 68:1128–1142. doi:10.1016/j.neuron.2010.11.008.
- Huang, Y.-J., Y. Maruyama, G. Dvoryanchikov, E. Pereira, N. Chaudhari, and S.D. Roper. 2007. The role of pannexin 1 hemichannels in ATP release and cell-cell communication in mouse taste buds. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104:6436–6441. doi:10.1073/pnas.0611280104.
- Iglesias, R., G. Dahl, F. Qiu, D.C. Spray, and E. Scemes. 2009. Pannexin 1 The molecular substrate of astrocyte “hemichannels.” *J Neurosci.* 29:7092–7097. doi:10.1523/JNEUROSCI.6062-08.2009.PANNEXIN1.
- Jeans, A.F., F.C. van Heusden, B. Al-Mubarak, Z. Padamsey, and N.J. Emptage. 2017. Homeostatic Presynaptic Plasticity Is Specifically Regulated by P/Q-type Ca<sup>2+</sup> Channels at Mammalian Hippocampal Synapses. *Cell Rep.* 21:341–350. doi:10.1016/j.celrep.2017.09.061.
- Jiang, H., A.G. Zhu, M. Mamczur, J.R. Falck, K.M. Lerea, and J.C. McGiff. 2007. Stimulation of rat erythrocyte P2X 7 receptor induces the release of epoxyeicosatrienoic acids. *Br. J. Pharmacol.* 151:1033–1040. doi:10.1038/sj.bjp.0707311.
- de Jong, A.P.H., S.K. Schmitz, R.F.G. Toonen, and M. Verhage. 2012. Dendritic position is a major determinant of presynaptic strength. *J. Cell Biol.* 197:327–337. doi:10.1083/jcb.201112135.
- Jourdain, P., L.H. Bergersen, K. Bhaukaurally, P. Bezzi, M. Santello, M. Domercq, C. Matute, F. Tonello, V. Gundersen, and A. Volterra. 2007. Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength. *Nat. Neurosci.* 10:331–339. doi:10.1038/nn1849.
- Kandel, E.R. 2001. The molecular biology of memory storage: A dialogue between gene and synapses. *Science (80- )*. 294:1030–1038. doi:10.1126/science.1067020.
- Kaneko, M., D. Stellwagen, R.C. Malenka, and M.P. Stryker. 2008. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Mediates One Component of Competitive, Experience-Dependent Plasticity in Developing Visual Cortex. *Neuron*. 58:673–680. doi:10.1016/j.neuron.2008.04.023.
- Kang, J., N. Kang, D. Lovatt, A. Torres, Z. Zhao, J. Lin, and M. Nedergaard. 2008. Connexin 43 hemichannels are permeable to ATP. *J. Neurosci.* 28:4702–4711. doi:10.1523/JNEUROSCI.5048-07.2008.
- Kawamura, M., D.N. Ruskin, and S.A. Masino. 2010. Metabolic Autocrine Regulation of Neurons Involves Cooperation among Pannexin Hemichannels, Adenosine Receptors, and KATP Channels. *J. Neurosci.* 30:3886–3895. doi:10.1523/JNEUROSCI.0055-10.2010.
- Keck, T., G.B. Keller, R.I. Jacobsen, U.T. Eysel, T. Bonhoeffer, and M. Hübener. 2013. Synaptic scaling and homeostatic plasticity in the mouse visual cortex in vivo. *Neuron*. 80:327–334. doi:10.1016/j.neuron.2013.08.018.
- Kim, J., and R.W. Tsien. 2008. Synapse-Specific Adaptations to Inactivity in Hippocampal Circuits Achieve Homeostatic Gain Control while Dampening Network Reverberation. *Neuron*. 58:925–937. doi:10.1016/j.neuron.2008.05.009.
- Knott, G.W., C. Quairiaux, C. Genoud, and E. Welker. 2002. Formation of dendritic spines with GABAergic synapses induced by whisker stimulation in adult mice. *Neuron*. 34:265–273. doi:10.1016/S0896-6273(02)00663-3.
- Koulakoff, A., P. Ezan, and C. Giaume. 2008. Neurons control the expression of connexin 30 and connexin 43 in mouse cortical astrocytes. *Glia*. 56:1299–1311. doi:10.1002/glia.20698.
- Kunzelmann, P., W. Schröder, O. Traub, C. Steinhäuser, R. Dermietzel, and K. Willecke. 1999. Late onset and increasing expression of the gap junction protein connexin30 in adult murine brain and long-term cultured astrocytes. *Glia*. 25:111–119. doi:10.1002/(SICI)1098-1136(19990115)25:2<111::AID-GLIA2>3.0.CO;2-I.
- Lalo, U., A. Bogdanov, and Y. Pankratov. 2018. Diversity of Astroglial Effects on Aging- and Experience-Related Cortical Metaplasticity. 11:1–14. doi:10.3389/fnmol.2018.00239.
- Lalo, U., O. Palygin, A. Verkhatsky, S.G.N. Grant, and Y. Pankratov. 2016. ATP from synaptic terminals and astrocytes regulates NMDA receptors and synaptic plasticity through PSD-95 multi-protein complex. *Sci. Rep.* 6:1–20. doi:10.1038/srep33609.
- Lapato, A.S., and S.K. Tiwari-Woodruff. 2018. Connexins and pannexins: At the junction of neuro-glial

- homeostasis & disease. *J. Neurosci. Res.* 96:31–44. doi:10.1002/jnr.24088.
- Lazarevic, V., C. Schone, M. Heine, E.D. Gundelfinger, and A. Fejtova. 2011. Extensive Remodeling of the Presynaptic Cytomatrix upon Homeostatic Adaptation to Network Activity Silencing. *J. Neurosci.* 31:10189–10200. doi:10.1523/JNEUROSCI.2088-11.2011.
- Letellier, M., Y.K. Park, T.E. Chater, P.H. Chipman, S.G. Gautam, T. Oshima-Takago, and Y. Goda. 2016. Astrocytes regulate heterogeneity of presynaptic strengths in hippocampal networks. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113:E2685–E2694. doi:10.1073/pnas.1523717113.
- Leybaert, L., and M.J. Sanderson. 2012. Intercellular Ca<sup>2+</sup> Waves: Mechanisms and Function. *Physiol. Rev.* 92:1359–1392. doi:10.1152/physrev.00029.2011.
- Liao, D., N.A. Hessler, and R. Malinow. 1995. Activation of postsynaptically silent synapses during pairing-induced LTP in CA1 region of hippocampal slice. *Nature.* 375:400–404. doi:10.1038/375400a0.
- Lisman, J.E., S. Raghavachari, and R.W. Tsien. 2007. The sequence of events that underlie quantal transmission at central glutamatergic synapses. *Nat. Rev. Neurosci.* 8:597–609. doi:10.1038/nrn2191.
- Lissin, D. V., S.N. Gomperts, R.C. Carroll, C.W. Christine, D. Kalman, M. Kitamura, S. Hardy, R.A. Nicoll, R.C. Malenka, and M. von Zastrow. 1998. Activity differentially regulates the surface expression of synaptic AMPA and NMDA glutamate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:7097–7102. doi:10.1073/pnas.95.12.7097.
- Liu, X., S. Ramirez, P.T. Pang, C.B. Puryear, A. Govindarajan, K. Deisseroth, and S. Tonegawa. 2012. Optogenetic stimulation of a hippocampal engram activates fear memory recall. *Nature.* 484:381–385. doi:10.1038/nature11028.
- Locovei, S., L. Bao, and G. Dahl. 2006. Pannexin 1 in erythrocytes : Function without a gap. 103:7655–7659.
- Locovei, S., E. Scemes, F. Qiu, D.C. Spray, and G. Dahl. 2007. Pannexin1 is part of the pore forming unit of the P2X7receptor death complex. *FEBS Lett.* 581:483–488. doi:10.1016/j.febslet.2006.12.056.
- Loewenstein, W.R. 1981. Junctional intercellular communication: the cell-to-cell membrane channel. *Physiol. Rev.* 61:829–913. doi:10.1152/physrev.1981.61.4.829.
- Louros, S.R., B.M. Hooks, L. Litvina, A.L. Carvalho, and C. Chen. 2014. A role for stargazin in experience-dependent plasticity. *Cell Rep.* 7:1614–1625. doi:10.1016/j.celrep.2014.04.054.
- Lüscher, C., and R.C. Malenka. 2012. NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4:1–15. doi:10.1101/cshperspect.a005710.
- MacVicar, B.A., and R.J. Thompson. 2010. Non-junction functions of pannexin-1 channels. *Trends Neurosci.* 33:93–102. doi:10.1016/j.tins.2009.11.007.
- Maffei, A., and G.G. Turrigiano. 2008. Multiple Modes of Network Homeostasis in Visual Cortical Layer 2/3. *J. Neurosci.* 28:4377–4384. doi:10.1523/JNEUROSCI.5298-07.2008.
- Malinow, R. 1991. Transmission Between Pairs of Hippocampal Slice Neurons: Quantal Levels, Oscillations, and LTP. *Science (80- )*. 252:20–22. doi:10.1126/science.1850871.
- Meunier, C., N. Wang, C. Yi, G. Dallerac, P. Ezan, A. Koulakoff, L. Leybaert, and C. Giaume. 2017. Contribution of astroglial Cx43 hemichannels to the modulation of glutamatergic currents by D-serine in the mouse prefrontal cortex. *J. Neurosci.* 37:2204–16. doi:10.1523/JNEUROSCI.2204-16.2017.
- Michalski, K., and T. Kawate. 2016. Carbenoxolone inhibits Pannexin1 channels through interactions in the first extracellular loop. *J. Gen. Physiol.* 147:165–174. doi:10.1085/jgp.201511505.
- Müller, M., and G.W. Davis. 2012. Transsynaptic control of presynaptic Ca<sup>2+</sup>-influx achieves homeostatic potentiation of neurotransmitter release. *Curr. Biol.* 22:1102–1108. doi:10.1016/j.cub.2012.04.018.
- Muller, M., K.S.Y. Liu, S.J. Sigrist, and G.W. Davis. 2012. RIM Controls Homeostatic Plasticity through Modulation of the Readily-Releasable Vesicle Pool. *J. Neurosci.* 32:16574–16585. doi:10.1523/JNEUROSCI.0981-12.2012.
- Müller, M., E.C.G. Pym, A. Tong, and G.W. Davis. 2011. Rab3-GAP Controls the Progression of

- Synaptic Homeostasis at a Late Stage of Vesicle Release. *Neuron*. 69:749–762. doi:10.1016/j.neuron.2011.01.025.
- Murthy, V.N. 1998. Synaptic plasticity : Step-wise strengthening. *Curr. Biol.* 650–653.
- Murthy, V.N., T. Schikorski, C.F. Stevens, and Y. Zhu. 2001. Inactivity produces increases in neurotransmitter release and synapse size. *Neuron*. 32:673–682. doi:10.1016/S0896-6273(01)00500-1.
- Murthy, V.N., T.J. Sejnowski, and C.F. Stevens. 1997. Heterogeneous release properties of visualized individual hippocampal synapses. *Neuron*. 18:599–612. doi:10.1016/S0896-6273(00)80301-3.
- Mutch, S.A., P. Kensel-Hammes, J.C. Gadd, B.S. Fujimoto, R.W. Allen, P.G. Schiro, R.M. Lorenz, C.L. Kuyper, J.S. Kuo, S.M. Bajjalieh, and D.T. Chiu. 2011. Protein Quantification at the Single Vesicle Level Reveals That a Subset of Synaptic Vesicle Proteins Are Trafficked with High Precision. *J. Neurosci.* 31:1461–1470. doi:10.1523/JNEUROSCI.3805-10.2011.
- Nabavi, S., R. Fox, C.D. Proulx, J.Y. Lin, R.Y. Tsien, and R. Malinow. 2014. Engineering a memory with LTD and LTP. *Nature*. 511:348–352. doi:10.1038/nature13294.
- Nagy, J.I., A. V. Ionescu, B.D. Lynn, and J.E. Rash. 2003. Coupling of Astrocyte Connexins Cx26, Cx30, Cx43 to Oligodendrocyte Cx29, Cx32, Cx47: Implications from Normal and Connexin32 Knockout Mice. *Glia*. 44:205–218. doi:10.1002/glia.10278.
- Nagy, J.I., D. Patel, P.A.Y. Ochalski, and G.L. Stelmack. 1999. Connexin30 in rodent, cat and human brain: Selective expression in gray matter astrocytes, co-localization with connexin43 at gap junction and late developmental appearance. *Neuroscience*. 88:447–468. doi:10.1016/S0306-4522(98)00191-2.
- Nimmerjahn, A., F. Kirchhoff, and F. Helmchen. 2005. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science (80-. )*. 308:1314–1318. doi:10.1126/science.1110647.
- O'Brien, R.J., S. Kamboj, M.D. Ehlers, K.R. Rosen, G.D. Fischbach, and R.L. Huganir. 1998. Activity-dependent modulation of synaptic AMPA recdptor accumulation. *Neuron*. 21:1067–1078.
- Oberheim, N.A., T. Takano, X. Han, W. He, J.H.C. Lin, F. Wang, Q. Xu, J.D. Wyatt, W. Pilcher, J.G. Ojemann, B.R. Ransom, S.A. Goldman, and M. Nedergaard. 2009. Uniquely Hominid Features of Adult Human Astrocytes. *J. Neurosci.* 29:3276–3287. doi:10.1523/JNEUROSCI.4707-08.2009.
- Orellana, J. a., N. Froger, P. Ezan, J.X. Jiang, M.V.L. Bennett, C.C. Naus, C. Giaume, and J.C. Sáez. 2011a. ATP and glutamate released via astroglial connexin 43 hemichannels mediate neuronal death through activation of pannexin 1 hemichannels. *J. Neurochem.* 118:826–840. doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07210.x.
- Orellana, J.A., P.J. Sáez, K.F. Shoji, K.A. Schalper, N. Palacios-Prado, V. Velarde, C. Giaume, M.V.L. Bennett, and J.C. Sáez. 2009. Modulation of brain hemichannels and gap junction channels by pro-inflammatory agents and their possible role in neurodegeneration. *Antioxid. Redox Signal.* 11:369–99. doi:10.1089/ars.2008.2130.
- Orellana, J.A., K.F. Shoji, P. Ezan, E. Amigou, P.J. Sáez, J.X. Jiang, C.C. Naus, J.C. Sáez, and C. Giaume. 2011b. Amyloid B-Induced death in neurons involves glial and neuronal hemichannels. *J. Neurosci.* 31:4962–4977. doi:10.1523/JNEUROSCI.6417-10.2011.
- Ota, Y., A.T. Zanetti, R.M. Hallock, Y. Ota, A.T. Zanetti, and R.M. Hallock. 2013. The role of astrocytes in the regulation of synaptic plasticity and memory formation. *Neural Plast.* 2013:185463. doi:10.1155/2013/185463.
- Pan, H.C., Y.C. Chou, and S.H. Sun. 2015. P2X7R-mediated Ca<sup>2+</sup>-independent d-serine release via pannexin-1 of the P2X7R-pannexin-1 complex in astrocytes. *Glia*. 63:877–893. doi:10.1002/glia.22790.
- Panatier, A., J. Vallée, M. Haber, K.K. Murai, J.C. Lacaille, and R. Robitaille. 2011. Astrocytes are endogenous regulators of basal transmission at central synapses. *Cell*. 146:785–798. doi:10.1016/j.cell.2011.07.022.
- Panchin, Y., I. Kelmanson, M. Matz, K. Lukyanov, N. Usman, and S. Lukyanov. 2000. A ubiquitous family of putative gap junction molecules [2]. *Curr. Biol.* 10:473–474. doi:10.1016/S0960-9822(00)00576-5.

- Pannasch, U., L. Vargová, J. Reingruber, P. Ezan, D. Holcman, C. Giaume, E. Syková, and N. Rouach. 2011. Astroglial networks scale synaptic activity and plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108:8467–8472. doi:10.1073/pnas.1016650108.
- Parpura, V., and A. Verkhratsky. 2012. Homeostatic function of astrocytes: Ca<sup>2+</sup> and Na<sup>+</sup> signalling. *Transl. Neurosci.* 3:334–344. doi:10.2478/s13380-012-0040-y.
- Pascual, O., S. Ben Achour, P. Rostaing, A. Triller, and A. Bessis. 2012. Microglia activation triggers astrocyte-mediated modulation of excitatory neurotransmission. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109:E197–E205. doi:10.1073/pnas.1111098109.
- Pascual, O., K.B. Casper, C. Kubera, J. Zhang, R. Revilla-Sanchez, J.Y. Sul, H. Takano, S.J. Moss, K. McCarthy, and P.G. Haydon. 2005. Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks. *Science (80- )*. 310:113–116. doi:10.1126/science.1116916.
- Pearson, R.A., N. Dale, E. Llaudet, and P. Mobbs. 2005. ATP released via gap junction hemichannels from the pigment epithelium regulates neural retinal progenitor proliferation. *Neuron*. 46:731–744. doi:10.1016/j.neuron.2005.04.024.
- Pelegri, P., and A. Surprenant. 2006. Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor. *EMBO J.* 25:5071–82. doi:10.1038/sj.emboj.7601378.
- Pelvig, D.P., H. Pakkenberg, A.K. Stark, and B. Pakkenberg. 2008. Neocortical glial cell numbers in human brains. *Neurobiol. Aging*. 29:1754–1762. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2007.04.013.
- Penuela, S., R. Bhalla, X.-Q. Gong, K.N. Cowan, S.J. Celetti, B.J. Cowan, D. Bai, Q. Shao, and D.W. Laird. 2007. Pannexin 1 and pannexin 3 are glycoproteins that exhibit many distinct characteristics from the connexin family of gap junction proteins. *J. Cell Sci.* 120:3772–3783. doi:10.1242/jcs.009514.
- Perea, G., and A. Araque. 2007. Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science (80- )*. 317:1083–1086. doi:10.1126/science.1144640.
- Perea, G., M. Navarrete, and A. Araque. 2009. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci.* 32:421–431. doi:10.1016/j.tins.2009.05.001.
- Pereda, A.E. 2014. Electrical synapses and their functional interactions with chemical synapses. *Nat Rev Neurosci.* 15:250–263. doi:10.1038/nrn3708.
- Perez de Arce, K., N. Schrod, S.W.R. Metzbower, E. Allgeyer, G.K.W. Kong, A.H. Tang, A.J. Krupp, V. Stein, X. Liu, J. Bewersdorf, T.A. Blanpied, V. Lucic, and T. Biederer. 2015. Topographic Mapping of the Synaptic Cleft into Adhesive Nanodomains. *Neuron*. 88:1165–1172. doi:10.1016/j.neuron.2015.11.011.
- Poo, M. ming, M. Pignatelli, T.J. Ryan, S. Tonegawa, T. Bonhoeffer, K.C. Martin, A. Rudenko, L.H. Tsai, R.W. Tsien, G. Fishell, C. Mullins, J.T. Gonçalves, M. Shtrahman, S.T. Johnston, F.H. Gage, Y. Dan, J. Long, G. Buzsáki, and C. Stevens. 2016. What is memory? The present state of the engram. *BMC Biol.* 14:1–18. doi:10.1186/s12915-016-0261-6.
- Pozo, K., and Y. Goda. 2010. Unraveling mechanisms of homeostatic synaptic plasticity. *Neuron*. 66:337–351. doi:10.1016/j.neuron.2010.04.028.
- Prochnow, N., A. Abdulazim, S. Kurtenbach, V. Wildförster, G. Dvorianchikova, J. Hanske, E. Petrasch-Parwez, V.I. Shestopalov, R. Dermietzel, D. Manahan-Vaughan, and G. Zoidl. 2012. Pannexin1 Stabilizes Synaptic Plasticity and Is Needed for Learning. *PLoS One*. 7. doi:10.1371/journal.pone.0051767.
- Regehr, W.G. 2012. Short-term presynaptic plasticity. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4:a005702. doi:10.1101/cshperspect.a005702.
- Reichenbach, A., A. Derouiche, and F. Kirchhoff. 2010. Morphology and dynamics of perisynaptic glia. *Brain Res. Rev.* 63:11–25. doi:10.1016/j.brainresrev.2010.02.003.
- Retamal, M.A., N. Froger, N. Palacios-Prado, P. Ezan, P.J. Saez, J.C. Saez, and C. Giaume. 2007. Cx43 hemichannels and gap junction channels in astrocytes are regulated oppositely by proinflammatory cytokines released from activated microglia. *J. Neurosci.* 27:13781–13792. doi:10.1523/JNEUROSCI.2042-07.2007.
- Rizzoli, S.O., and W.J. Betz. 2005. Synaptic vesicle pools. *Nat. Rev. Neurosci.* 6:57–69.

doi:10.1038/nrn1583.

Rouach, N., A. Koulakoff, V. Abudara, K. Willecke, and C. Giaume. 2008. Astroglial metabolic networks sustain hippocampal synaptic transmission. *Science* (80- ). 322:1551–1555. doi:10.1126/science.1164022.

Rouach, N., M. Segal, A. Koulakoff, C. Giaume, and E. Avignone. 2003. Carbenoxolone blockade of neuronal network activity in culture is not mediated by an action of gap junctions. *J. Physiol.* 553:729–745. doi:10.1113/jphysiol.2003.053439.

Roux, L., A. Madar, M.M. Lacroix, C. Yi, K. Benchenane, and C. Giaume. 2015. Astroglial Connexin 43 Hemichannels Modulate Olfactory Bulb Slow Oscillations. *J. Neurosci.* 35:15339–15352. doi:10.1523/JNEUROSCI.0861-15.2015.

Rutherford, L.C., S.B. Nelson, and G.G. Turrigiano. 1998. BDNF has opposite effects on the quantal amplitude of pyramidal neuron and interneuron excitatory synapses. *Neuron.* 21:521–530. doi:10.1016/S0896-6273(00)80563-2.

Ryan, T.A., H. Reuter, and S.J. Smith. 1997. Optical detection of a quantal preynaptic membrane turnover. *Nature.* 388:478–482.

Ryan, T.J., D.S. Roy, M. Pignatelli, A. Arons, and S. Tonegawa. 2015. Engram cells retain memory under retrograde amnesia. *Science* (80- ). 348:1007–1013. doi:10.1126/science.aaa5542.

Sáez, J.C., J.E. Contreras, F.F. Bukauskas, M.A. Retamal, and M.V.L. Bennett. 2003. Gap junction hemichannels in astrocytes of the CNS. *Acta Physiol. Scand.* 179:9–22. doi:10.1046/j.1365-201X.2003.01196.x.

Sandilos, J.K., and D.A. Bayliss. 2012. Physiological mechanisms for the modulation of pannexin 1 channel activity. *J. Physiol.* 590:6257–6266. doi:10.1113/jphysiol.2012.240911.

Schindelin, J., I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J.Y. Tinevez, D.J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak, and A. Cardona. 2012. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods.* 9:676–682. doi:10.1038/nmeth.2019.

Shepherd, G.M. 2004. *The Synaptic Organization of the Brain.* 736 pp.

Silbereis, J.C., S. Pochareddy, Y. Zhu, M. Li, and N. Sestan. 2016. The Cellular and Molecular Landscapes of the Developing Human Central Nervous System. *Neuron.* 89:268. doi:10.1016/j.neuron.2015.12.008.

Silverman, W., S. Locovei, and G. Dahl. 2008. Probenecid, a gout remedy, inhibits pannexin 1 channels. *AJP Cell Physiol.* 295:C761–C767. doi:10.1152/ajpcell.00227.2008.

Silverman, W.R., J.P. de Rivero Vaccari, S. Locovei, F. Qiu, S.K. Carlsson, E. Scemes, R.W. Keane, and G. Dahl. 2009. The pannexin 1 channel activates the inflammasome in neurons and astrocytes. *J. Biol. Chem.* 284:18143–18151. doi:10.1074/jbc.M109.004804.

Soares, C., K.F.H. Lee, W. Nassrallah, and J.-C. Beique. 2013. Differential Subcellular Targeting of Glutamate Receptor Subtypes during Homeostatic Synaptic Plasticity. *J. Neurosci.* 33:13547–13559. doi:10.1523/JNEUROSCI.1873-13.2013.

Sontheimer, H., E. Fernandez-Marques, N. Ullrich, C. a Pappas, and S.G. Waxman. 1994. Astrocyte Na<sup>+</sup> channels are required for maintenance of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity. *J. Neurosci.* 14:2464–75.

Stehberg, J., R. Moraga-Amaro, C. Salazar, a. Becerra, C. Echeverria, J. a. Orellana, G. Bultynck, R. Ponsaerts, L. Leybaert, F. Simon, J.C. Saez, and M. a. Retamal. 2012. Release of gliotransmitters through astroglial connexin 43 hemichannels is necessary for fear memory consolidation in the basolateral amygdala. *FASEB J.* 26:3649–3657. doi:10.1096/fj.11-198416.

Steinmetz, C.C., and G.G. Turrigiano. 2010. Tumor Necrosis Factor- Signaling Maintains the Ability of Cortical Synapses to Express Synaptic Scaling. *J. Neurosci.* 30:14685–14690. doi:10.1523/JNEUROSCI.2210-10.2010.

Stellwagen, D., and R.C. Malenka. 2006. Synaptic scaling mediated by glial TNF- $\alpha$ . *Nature.* 440:1054–1059.

- Suadicani, S.O., R. Iglesias, J. Wang, G. Dahl, D.C. Spray, and E. Scemes. 2012. ATP signaling is deficient in cultured pannexin1-null mouse astrocytes. *Glia*. 60:1106–1116. doi:10.1002/glia.22338.
- Südhof, T.C. 2004. The Synaptic Vesicle Cycle. *Annu. Rev. Physiol.* 27:509–47. doi:10.1146/annurev.physiol.60.1.347.
- Südhof, T.C. 2012. The presynaptic active zone. *Neuron*. 75:11–25. doi:10.1016/j.neuron.2012.06.012.
- Südhof, T.C. 2013. Neurotransmitter release: The last millisecond in the life of a synaptic vesicle. *Neuron*. 80:675–690. doi:10.1016/j.neuron.2013.10.022.
- Tang, Y., J.R. Nyengaard, D.M.G. De Groot, and H.J.G. Gundersen. 2001. Total regional and global number of synapses in the human brain neocortex. *Synapse*. 41:258–273. doi:10.1002/syn.1083.
- Thalhammer, A., and L.A. Cingolani. 2014. Cell adhesion and homeostatic synaptic plasticity. *Neuropharmacology*. 78:23–30. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.03.015.
- Thompson, R.J., M.F. Jackson, M.E. Olah, R.L. Rungta, D.J. Hines, M.A. Beazely, J.F. MacDonald, and B.A. MacVicar. 2008. Activation of pannexin-1 hemichannels augments aberrant bursting in the hippocampus. *Science (80-. )*. 322:1555–1559. doi:10.1126/science.1165209.
- Thompson, R.J., N. Zhou, and B.A. MacVicar. 2006. Ischemia opens neuronal gap junction hemichannels. *Science (80-. )*. 312:924–927. doi:10.1126/science.1126241.
- Tokuoka, H., and Y. Goda. 2008. Activity-dependent coordination of presynaptic release probability and postsynaptic GluR2 abundance at single synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105:14656–14661. doi:10.1073/pnas.0805705105.
- Torres, A., F. Wang, Q. Xu, T. Fujita, R. Dobrowolski, K. Willecke, T. Takano, and M. Nedergaard. 2012. Extracellular Ca<sup>2+</sup> Acts as a Mediator of Communication from Neurons to Glia. *Sci. Signal*. 5:ra8-ra8. doi:10.1126/scisignal.2002160.
- Turrigiano, G. 2011. Too Many Cooks? Intrinsic and Synaptic Homeostatic Mechanisms in Cortical Circuit Refinement. *Annu. Rev. Neurosci.* 34:89–103. doi:10.1146/annurev-neuro-060909-153238.
- Turrigiano, G.G. 2008. The Self-Tuning Neuron: Synaptic Scaling of Excitatory Synapses. *Cell*. 135:422–435. doi:10.1016/j.cell.2008.10.008.
- Turrigiano, G.G., K.R. Leslie, N.S. Desai, L.C. Rutherford, and S.B. Nelson. 1998. Activity-dependent scaling of quantal amplitude in neocortical neurons. *Nature*. 391:892–896. doi:10.1038/36103.
- Turrigiano, G.G., and S.B. Nelson. 2004. Homeostatic plasticity in the developing nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* 5:97–107. doi:10.1038/nrn1327.
- Tyler, W.J., G.C. Petzold, S.K. Pal, and V.N. Murthy. 2007. Experience-Dependent Modification of Primary Sensory Synapses in the Mammalian Olfactory Bulb. *J. Neurosci.* 27:9427–9438. doi:10.1523/JNEUROSCI.0664-07.2007.
- Verkhatsky, A., M. Matteoli, V. Parpura, J.-P. Mothet, and R. Zorec. 2016. Astrocytes as secretory cells of the central nervous system: idiosyncrasies of vesicular secretion. *EMBO J.* e201592705. doi:10.15252/embj.201592705.
- Verkhatsky, A., and M. Nedergaard. 2014. Astroglial cradle in the life of the synapse. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 369. doi:10.1098/rstb.2013.0595.
- Verkhatsky, A., and M. Nedergaard. 2018. Physiology of Astroglia. *Physiol. Rev.* 98:239–389. doi:10.1152/physrev.00042.2016.
- Verkhatsky, A., and C. Steinhäuser. 2000. Ion channels in glial cells. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 32:380–412. doi:10.1016/S0165-0173(99)00093-4.
- Verkhatsky, A., M. Trebak, F. Perocchi, D. Khananshvilii, and I. Sekler. 2018. Crosslink between calcium and sodium signalling. *Exp. Physiol.* 103:157–169. doi:10.1113/EP086534.
- Vitureira, N., and Y. Goda. 2013. The interplay between hebbian and homeostatic synaptic plasticity. *J. Cell Biol.* 203:175–186. doi:10.1083/jcb.201306030.
- Vitureira, N., M. Letellier, and Y. Goda. 2012. Homeostatic synaptic plasticity: From single synapses to neural circuits. *Curr. Opin. Neurobiol.* 22:516–521. doi:10.1016/j.conb.2011.09.006.

- Vitureira, N., M. Letellier, I.J. White, and Y. Goda. 2011. Differential control of presynaptic efficacy by postsynaptic N-cadherin and  $\beta$ -catenin. *Nat. Neurosci.* 15:81–89. doi:10.1038/nn.2995.
- Vogt, A., S.G. Hormuzdi, and H. Monyer. 2005. Pannexin1 and Pannexin2 expression in the developing and mature rat brain. *Mol. Brain Res.* 141:113–120. doi:10.1016/j.molbrainres.2005.08.002.
- De Vuyst, E., N. Wang, E. Decrock, M. De Bock, M. Vinken, M. Van Moorhem, C. Lai, M. Culot, V. Rogiers, R. Cecchelli, C.C. Naus, W.H. Evans, and L. Leybaert. 2009. Ca<sup>2+</sup> regulation of connexin 43 hemichannels in C6 glioma and glial cells. *Cell Calcium.* 46:176–187. doi:10.1016/j.ceca.2009.07.002.
- Walrave, L., M. Vinken, G. Albertini, D. De Bundel, L. Leybaert, and I.J. Smolders. 2016. Inhibition of Connexin43 Hemichannels Impairs Spatial Short-Term Memory without Affecting Spatial Working Memory. *Front. Cell. Neurosci.* 10:1–10. doi:10.3389/fncel.2016.00288.
- Wang, N., M. De Bock, G. Antoons, A.K. Gadicherla, M. Bol, E. Decrock, W.H. Evans, K.R. Sipido, F.F. Bukauskas, and L. Leybaert. 2012. Connexin mimetic peptides inhibit Cx43 hemichannel opening triggered by voltage and intracellular Ca<sup>2+</sup> elevation. *Basic Res. Cardiol.* 107:17. doi:10.1007/s00395-012-0304-2.
- Wang, N., E. De Vuyst, R. Ponsaerts, K. Boengler, N. Palacios-Prado, J. Wauman, C.P. Lai, M. De Bock, E. Decrock, M. Bol, M. Vinken, V. Rogiers, J. Tavernier, W.H. Evans, C.C. Naus, F.F. Bukauskas, K.R. Sipido, G. Heusch, R. Schulz, G. Bultynck, and L. Leybaert. 2013. Selective inhibition of Cx43 hemichannels by Gap19 and its impact on myocardial ischemia/reperfusion injury. *Basic Res. Cardiol.* 108. doi:10.1007/s00395-012-0309-x.
- Wefelmeyer, W., C.J. Puhl, and J. Burrone. 2016. Homeostatic Plasticity of Subcellular Neuronal Structures: From Inputs to Outputs. *Trends Neurosci.* 39:656–667. doi:10.1016/j.tins.2016.08.004.
- Wei, L., H. Sheng, L. Chen, B. Hao, X. Shi, and Y. Chen. 2016. Effect of pannexin-1 on the release of glutamate and cytokines in astrocytes. *J. Clin. Neurosci.* 23:135–141. doi:10.1016/j.jocn.2015.05.043.
- Whyte-Fagundes, P., S. Kurtenbach, C. Zoidl, V.I. Shestopalov, P.L. Carlen, and G. Zoidl. 2018. A Potential Compensatory Role of Panx3 in the VNO of a Panx1 Knock Out Mouse Model. *Front. Mol. Neurosci.* 11:1–16. doi:10.3389/fnmol.2018.00135.
- Wierenga, C. 2006. Temporal regulation of the expression locus of homeostatic plasticity. *J. ....* 2127–2133. doi:10.1152/jn.00107.2006.
- Wilson, N.R. 2005. Presynaptic Regulation of Quantal Size by the Vesicular Glutamate Transporter VGLUT1. *J. Neurosci.* 25:6221–6234. doi:10.1523/JNEUROSCI.3003-04.2005.
- Wilson, N.R., J. Kang, E. V Hueske, T. Leung, H. Varoqui, J.G. Murnick, J.D. Erickson, and G. Liu. 2005. Presynaptic regulation of quantal size by the vesicular glutamate transporter VGLUT1. *J. Neurosci.* 25:6221–6234. doi:10.1523/JNEUROSCI.3003-04.2005.
- Wojcik, S.M., J.S. Rhee, E. Herzog, A. Sigler, R. Jahn, S. Takamori, N. Brose, and C. Rosenmund. 2004. An essential role for vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1) in postnatal development and control of quantal size. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101:7158–7163. doi:10.1073/pnas.0401764101.
- Wu, Y., L. Dissing-Olesen, B.A. MacVicar, and B. Stevens. 2015. Microglia: Dynamic Mediators of Synapse Development and Plasticity. *Trends Immunol.* 36:605–613. doi:10.1016/j.it.2015.08.008.
- Yamamoto, T., A. Ochalski, E.L. Hertzberg, and J.I. Nagy. 1990. LM and EM immunolocalization of the gap junctional protein connexin 43 in rat brain. *Brain Res.* 508:313–319. doi:10.1016/0006-8993(90)90415-8.
- Yang, G., F. Pan, and W.B. Gan. 2009. Stably maintained dendritic spines are associated with lifelong memories. *Nature.* 462:920–924. doi:10.1038/nature08577.
- Ye, Z.-C., M.S. Wyeth, S. Baltan-Tekkok, and B.R. Ransom. 2003. Functional hemichannels in astrocytes: a novel mechanism of glutamate release. *J. Neurosci.* 23:3588–3596. doi:10.1523/JNEUROSCI.2393-03.2003 [pii].
- Zhang, J.M., H.K. Wang, C.Q. Ye, W. Ge, Y. Chen, Z.L. Jiang, C.P. Wu, M.M. Poo, and S. Duan. 2003. ATP Released by Astrocytes Mediates Glutamatergic Activity-Dependent Heterosynaptic Suppression. *Neuron.* 40:971–982. doi:10.1016/S0896-6273(03)00717-7.
- Zhao, C., E. Dreosti, and L. Lagnado. 2011. Homeostatic Synaptic Plasticity through Changes in Presynaptic Calcium Influx. *J. Neurosci.* 31:7492–7496. doi:10.1523/JNEUROSCI.6636-10.2011.

Zoidl, G., E. Petrasch-Parwez, A. Ray, C. Meier, S. Bunse, H.W. Habbes, G. Dahl, and R. Dermietzel. 2007. Localization of the pannexin1 protein at postsynaptic sites in the cerebral cortex and hippocampus. *Neuroscience*. 146:9–16. doi:10.1016/j.neuroscience.2007.01.061.

Zucker, R.S., and W.G. Regehr. 2002. Short-Term Synaptic Plasticity. *Annu. Rev. Physiol.* 64:355–405. doi:10.1146/annurev.physiol.64.092501.114547.