

Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas-  
PEDECIBA

Opción Neurociencias

Lic. Alberto Rafael Ponce

# EL ROL DEL ATP Y LOS RECEPTORES PURINÉRGICOS EN LA PLASTICIDAD SINÁPTICA HOMEOSTÁTICA

Orientadora: Dra. Nathalia Viturera

Co-Orientadora: Dra. Verónica Abudara



-Laboratorio de  
Comunicación  
Sináptica

-Unidad Académica  
de Fisiología

-Facultad de  
Medicina, Udelar



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY



## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mi directora Nathalia, no solo por tu dedicación, tu paciencia y tus consejos en los momentos difíciles de este camino, sino por confiar siempre en mi trabajo. Por motivarme a proponerme nuevos desafíos y a no tirar la toalla.

A mi codirectora Verónica, por tus aportes invaluable, tu mirada crítica y tu disposición a estar siempre para todo. Tus charlas y el apoyo que me brindaste hicieron que cada día fuera mucho más ameno.

Al tribunal, por sus aportes constructivos que sin dudas enriquecieron este trabajo.

A Mari, Vani, Agus, Lu, Marce y Andre. Por las conversaciones y los momentos de diversión que supimos mezclar con largas jornadas de trabajo (que sin duda seguiremos compartiendo dentro y fuera del laboratorio). También a Giuli y Facu, los nuevitos de veintipocos años que nos ayudan a notar que el tiempo pasa.

A los y las amigas que cultivé en La Isla, por los almuerzos y anécdotas compartidas todos estos años. Por el consejo sabio de Bernardo cuando fue necesario.

A los y las amigas de la Unidad Académica de Fisiología (Anto, Flor, Sofi, Lu, Sandra, Pata, Fede, Bruno, por nombrar a algunos, aunque sé que alguno se me escapa). Hoy no solo celebro este logro académico, sino también la suerte de contar con ustedes.

A todos los integrantes de Fisiología, por estar siempre dispuestos a ayudar y a construir conocimiento.

A todos los funcionarios de la URBE, porque en todos estos años hemos construido un vínculo que sin duda hizo mucho más llevadero este trabajo.

A Mariana, de la Unidad de Microscopía de la Facultad de Medicina, por tu tiempo y aportes dedicados a este trabajo. También a la Unidad de Microscopía del IP y del IIBCE.

A colegas de otras Unidades Académicas como Cristián que dedicó tiempo y esfuerzo en ayudarme con experimentos que fueron cruciales para este trabajo. A todos los que, con sus aportes y discusiones colaboraron con esta tesis.

A los y las compañeras de Histología, con quienes compartimos mucho más que el cuarto de cultivo.

A los y las amigas incondicionales de la vida (Los de acá y los que quedaron en Argentina).

A la familia que bancó desde mis 17 años la locura de irme cada vez más lejos de casa.

Y, por último, pero no por eso menos importante a mi compañera Belén (y nuestro perro Simón) por bancar en toda esta etapa.

## El rol del ATP y los receptores purinérgicos en la plasticidad sináptica homeostática

RESUMEN.....	4
INTRODUCCIÓN .....	6
MECANISMOS DE PLASTICIDAD SINÁPTICA HOMEOSTÁTICA.....	8
<i>La función presináptica y su ajuste.</i> .....	8
Ajuste homeostático de las vesículas sinápticas.....	11
Ajuste dependiente de la actividad en la abundancia de Ca <sup>+2</sup> presináptico.....	15
SEÑALIZACIÓN PURINÉRGICA Y PLASTICIDAD.....	17
<i>El rol neuromodulador del ATP</i> .....	17
<i>El Receptor P2X7 en la plasticidad sináptica</i> .....	19
INTERACCIÓN NEURO-GLIAL Y PLASTICIDAD .....	24
HIPÓTESIS.....	27
OBJETIVOS .....	27
OBJETIVO GENERAL .....	27
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	27
MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
ANIMALES .....	28
CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	28
CULTIVOS DISOCIADOS DE HIPOCAMPO .....	28
<i>Obtención de células gliales</i> .....	28
<i>Co-cultivos neurona/glía</i> .....	29
INDUCCIÓN DE PSH.....	30
FARMACOLOGÍA .....	30
INMUNOCITOQUÍMICA .....	31
MARCAJE DE CÉLULAS VIVAS.....	32
<i>Experimentos de marcaje con Sinaptotagmina 1 (Stg1) de las VS</i> .....	32
<i>Experimentos de captación de Bromuro de Etidio (BrEt)</i> .....	33
<i>Imagenología de Ca<sup>+2</sup></i> .....	34
ADQUISICIÓN DE IMÁGENES.....	34
ANÁLISIS DE IMÁGENES .....	35
<i>Inmunofluorescencia asociada al vGlut-1 sináptico</i> .....	35
<i>Inmunofluorescencia asociada al P2X7R</i> .....	36
<i>Inmunofluorescencia asociada a Stg1</i> .....	38
<i>Fluorescencia asociada a BrEt</i> .....	38
<i>Fluorescencia asociada al Ca<sup>+2</sup> neuronal</i> .....	39
<i>Análisis de supervivencia neuronal</i> .....	39
CUANTIFICACIÓN DEL ATP EXTRACELULAR .....	39
ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	40

<b>RESULTADOS.....</b>	<b>41</b>
<b>EL AJUSTE HOMEOSTÁTICO DE LA FUNCIÓN PRESINÁPTICA SE CORRESPONDE CON UN AUMENTO EN LA ABUNDANCIA DE vGLUT-1 SINÁPTICO.....</b>	<b>41</b>
<b>EL ATP GLIAL ES NECESARIO PARA LA INDUCCIÓN/MANTENIMIENTO DE LA PSH.....</b>	<b>44</b>
<b>EL AUMENTO HOMEOSTÁTICO DE LA FUNCIÓN PRESINÁPTICA REQUIERE LA ACTIVACIÓN DE RECEPTORES DEL TIPO P2X7 PRESINÁPTICOS .....</b>	<b>48</b>
<b>LA ACTIVACIÓN DE LOS P2X7R DURANTE LA SUPRESIÓN CRÓNICA DE LA ACTIVIDAD NEURONAL PROMUEVE UN AUMENTO EN LA PERMEABILIDAD DE MEMBRANA NEURONAL .....</b>	<b>57</b>
<b>EL AUMENTO DE LA PERMEABILIDAD DE MEMBRANA DEPENDIENTE DE LOS P2X7R SE TRADUCE EN UN AUMENTO EN LOS NIVELES DE Ca<sup>+2</sup> NEURONAL .....</b>	<b>60</b>
<b>EL AUMENTO EN LOS NIVELES DE Ca<sup>+2</sup> NEURONAL DEPENDIENTE DE LOS P2X7R ESTÁ ACOMPAÑADO DE UN AUMENTO EN EL RECICLAJE VESICULAR .....</b>	<b>64</b>
<b>EL AJUSTE HOMEOSTÁTICO DE LA EFICIENCIA PRESINÁPTICA ESTÁ MEDIADO POR HEMICANALES DE CONEXINA 43 GLIALES Y PANEXINA 1 NEURONALES.....</b>	<b>65</b>
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>70</b>
<b>LA INMUNOFLORESCENCIA DE vGLUT-1 PERMITE DETECTAR CAMBIOS EN LA FUNCIÓN PRESINÁPTICA .</b>	<b>70</b>
<b>EL ATP GLIAL LIBERADO POR Cx43HC ES NECESARIO PARA EL AJUSTE HOMEOSTÁTICO DE LA FUNCIÓN PRESINÁPTICA .....</b>	<b>70</b>
<b>LOS P2X7R PRESINÁPTICOS MODULAN EL AJUSTE HOMEOSTÁTICO DE LA FUNCIÓN SINÁPTICA .....</b>	<b>72</b>
<b>LA PSH PRESINÁPTICA REQUIERE LA INTERACCIÓN ENTRE LOS P2X7R Y LOS PANX1HC.....</b>	<b>74</b>
<b>MODELO DE LA PSH DEPENDIENTE DEL ATP EN EL HIPOCAMPO MURINO .....</b>	<b>75</b>
<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>77</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>78</b>

## **Resumen**

La plasticidad sináptica homeostática (PSH) estabiliza la actividad de una neurona o circuito neuronal, modificando la función sináptica en dirección compensatoria a las alteraciones del circuito con el fin de prevenir un daño irreparable. Estos mecanismos operan tanto a nivel pre como postsináptico.

El rol del ATP como neuromodulador de la transmisión sináptica basal y de la plasticidad sináptica dependiente de la actividad neuronal ha sido ampliamente caracterizado. Los mecanismos de acción de este nucleótido están mediados por receptores purinérgicos ionotrópicos del tipo P2X (P2XR) y metabotrópicos del tipo P2Y (P2YR). Mientras que la activación de los P2XR tiene un impacto neuromodulador positivo, se ha definido el efecto contrario al activar los receptores P2YR.

En este trabajo analizamos el rol del ATP y la señalización purinérgica en el ajuste homeostático de la función presináptica luego de un periodo de inactividad prolongado. Nos centramos especialmente en analizar los cambios que ocurren en la terminal presináptica tras la activación de esta vía de señalización, con el objetivo de entender cómo estos cambios contribuyen al restablecimiento de la homeostasis en el circuito neuronal. Mediante la utilización de aproximaciones farmacológicas y técnicas de detección inmune e imagenología funcional en cultivos disociados neurogliales de hipocampo murino, evidenciamos que el ajuste homeostático de la función presináptica requiere la liberación de ATP de origen glial, mediante una vía de liberación dependiente de hemicanales de Conexina 43 (Cx43HC). A nivel presináptico, este nucleótido activa receptores purinérgicos del tipo P2X7 (P2X7R), modulando la disponibilidad de  $Ca^{+2}$  citosólico y el reciclaje de vesículas sinápticas. Nuestros resultados sugieren, además, que para que este incremento de  $Ca^{+2}$  neuronal dependiente de los P2X7R suceda, es clave el mantenimiento de niveles elevados del ATP extracelular dependientes de la actividad de hemicanales de Panexina 1 (Panx1HC) neuronales.

Así, este trabajo resalta la importancia de la comunicación neurona-glía en el ajuste homeostático de la función presináptica luego de un período de inactividad prolongado y

## **Resumen**

describe por primera vez el rol esencial de la señalización purinérgica en este proceso. Estos resultados fueron publicados en [1, 2]. Además, la importancia de la interacción entre los P2X7R y los Panx1HC en diferentes sistemas fue revisado en [3].

Palabras claves: Plasticidad sináptica homeostática, ATP, P2X7R, Panexina 1, Conexina 4

## **Introducción**

Los seres vivos pueden adaptarse a las condiciones cambiantes del ambiente que los rodean gracias a la capacidad de desarrollar comportamientos coherentes con el cambio experimentado y a su vez, adaptativos [4–6]. A nivel del sistema nervioso central (SNC), esta adaptación está determinada por la capacidad que tiene la actividad neuronal generada por una experiencia de modificar el funcionamiento de los circuitos neuronales y, por tanto, modificar los pensamientos y comportamientos posteriores [7]. El proceso que subyace a esta posibilidad de modificar la estructura y función de un circuito neuronal se define como plasticidad sináptica y refiere específicamente a la modificación dependiente de la actividad de la fuerza o eficacia de la transmisión sináptica [7]. Mientras que algunos de los cambios producidos pueden durar solo una pequeña fracción de segundos, otros llegan a persistir durante horas, semanas e incluso años, existiendo entonces dos grandes formas de plasticidad sináptica definidas como plasticidad a corto y largo plazo [7, 8]. Nuestro estudio se centra en caracterizar los mecanismos de plasticidad que operan a largo plazo. Dentro de esta categoría podemos encontrar dos grandes formas: la plasticidad de Hebb y la plasticidad sináptica homeostática (PSH).

Podemos definir a la plasticidad de Hebb como un tipo de plasticidad en donde el cambio en la fuerza sináptica se desencadena rápidamente, puede durar desde horas hasta meses y es específico de las sinapsis estimuladas. Dentro de estos cambios plásticos se encuentran la potenciación y la depresión a largo plazo (PLP y DLP, respectivamente), consideradas como los sustratos moleculares de los procesos de aprendizaje y consolidación de la memoria [9–12]. Este tipo de plasticidad representa un mecanismo de retroalimentación positivo ya que 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 y, como resultado, se produce una mayor potenciación. De esta manera, las entradas que son potenciadas podrían aumentar al extremo y las que son disminuidas podrían deprimirse, hasta llegar a niveles cercanos a cero, pudiendo perderse la selectividad de la red [13].

## **Introducción**

Es claro entonces que existen mecanismos plásticos necesarios para el aprendizaje y la consolidación de la memoria, que por sí solos podrían llevar a la inestabilidad de un circuito neuronal. Por eso, surge la interrogante de cómo las redes neuronales mantienen cierto grado de constancia/estabilidad en sus propiedades básicas a pesar de experimentar procesos hebbianos. La respuesta que emerge de trabajos recientes es que a medida que la plasticidad hebbiana cambia los patrones de actividad de la red, llevando a la potenciación/depresión prolongada a un circuito neuronal, se emplean formas compensatorias de PSH [14]. Esta puede definirse como el mecanismo responsable de modificar la eficacia de la transmisión sináptica con el fin de mantener la estabilidad de un circuito neuronal [14]. Los cambios neuronales que subyacen a la PSH pueden operar a nivel pre y postsináptico y la dirección en la que estos cambios se producirán es compensatoria a los cambios de actividad del circuito. Así, numerosos investigadores reportaron que la supresión crónica de la actividad sináptica inducida mediante la aplicación de tetrodotoxina (TTX, bloqueante de canales de Na<sup>+</sup> voltaje-dependientes) o antagonistas de los receptores de glutamato, incrementa el área de la zona activa, el número de vesículas sinápticas en contacto con la membrana presináptica, la frecuencia de los eventos exocíticos espontáneos y la probabilidad de liberación del neurotransmisor (Pr) [15, 16]. No obstante, un incremento en la excitabilidad de las conexiones mediante la aplicación de bicuculina (antagonista de los receptores GABA<sub>A</sub>), no desencadena cambios homeostáticos a nivel presináptico [17, 18]. En conjunto estos reportes sugieren que los mecanismos compensatorios desplegados durante un período de inactividad o de excitabilidad prolongada son diferentes.

En relación a los mecanismos que operan a nivel postsináptico, el *synaptic scaling* representa la forma de PSH más estudiada hasta el momento y es evidenciada tanto *in vitro* como *in vivo* [19–21]. Involucra el ajuste compensatorio en la abundancia de receptores postsinápticos del tipo AMPA. Además, se ha descrito un rol fundamental de factores solubles de origen glial y neuronal, tales como el TNF $\alpha$  y el BDNF, respectivamente, en el ajuste postsináptico compensatorio.

## **Introducción**

Es importante resaltar que al momento de comenzar esta tesis no existían estudios que abordaran la importancia de factores solubles en la PSH presináptica.

## **Mecanismos de plasticidad sináptica homeostática**

Como describimos anteriormente, la PSH es un proceso que ayuda a mantener la actividad de un circuito neuronal estable, al realizar ajustes compensatorios en la eficacia de la transmisión sináptica. Esta se puede definir como un parámetro determinado por el número de sitios activos de liberación ( $n$ ), por la  $Pr$  y el tamaño cuantal ( $q$ ) [22, 23]. La  $Pr$  se refiere a una variable presináptica definida como la probabilidad de que una vesícula sináptica (VS) se fusione con la membrana presináptica luego de la llegada de un potencial de acción (PA). El tamaño cuantal se define como el cambio de voltaje registrado a nivel postsináptico como resultado de la liberación de una vesícula sináptica [24].

De esta manera, podemos definir a la fuerza de la transmisión sináptica como:

$$F_{\text{sináptica}} = Pr \cdot n \cdot q$$

Así, la transmisión sináptica es más eficaz si  $Pr$ ,  $n$  o  $q$  aumentan.

Dado que nuestra investigación se enfoca en explorar los cambios que ocurren en la terminal presináptica luego de un período de inactividad crónica, nos centraremos en describir los mecanismos responsables de promover cambios en la  $Pr$  caracterizados hasta el momento.

### **La función presináptica y su ajuste.**

Como comentábamos anteriormente, la  $Pr$  se define como la probabilidad de que una VS se libere de forma sincrónica a la llegada de un PA a la terminal presináptica [15]. El ajuste de este parámetro representa un mecanismo que permite regular la transferencia de información de una sinapsis a los requerimientos específicos de un circuito neural [25]. Entre los mecanismos más relevantes para el control de la  $Pr$  se encuentran el control de la disponibilidad de VS y de  $Ca^{+2}$  presináptico [15, 26–28]. Ambos se detallarán en el apartado que sigue a continuación. Sin embargo, antes de describir cómo se produce la modulación de la  $Pr$ , resumiremos brevemente el proceso de liberación del neurotransmisor que

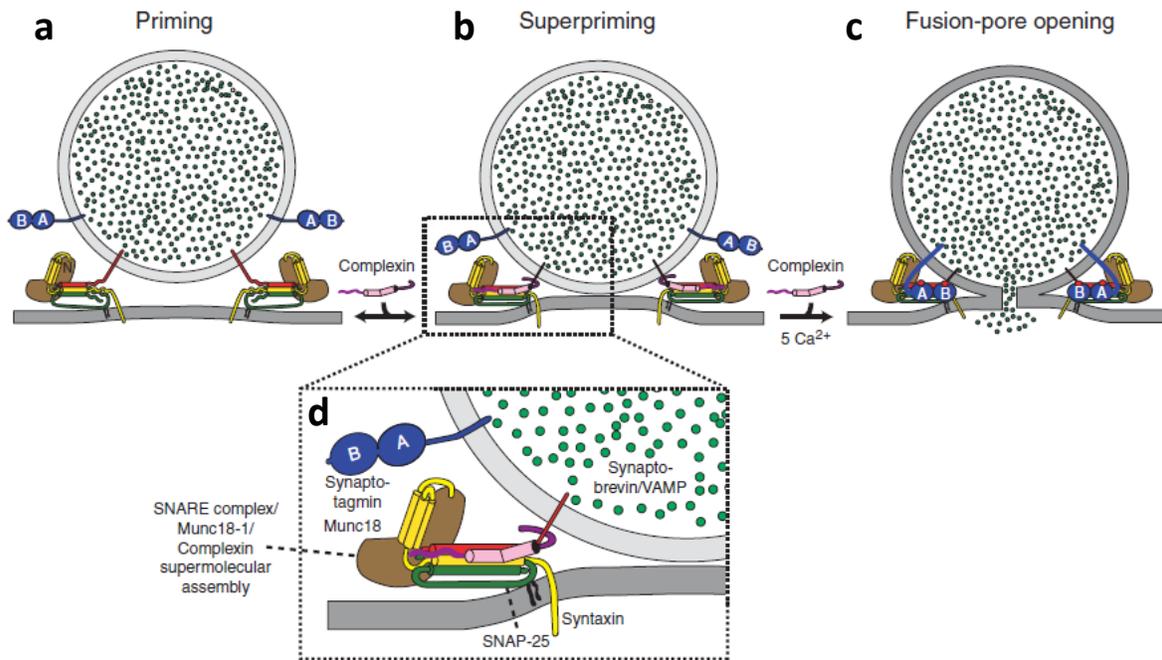
## **Introducción**

comienza con la llegada de un PA y el consecuente aumento de los niveles de  $\text{Ca}^{+2}$  presináptico.

El neurotransmisor, que se almacena en las VS, es liberado a la hendidura sináptica mediante la fusión controlada de la membrana de una VS y la presináptica. Esto se lleva a cabo en una región especializada de la terminal presináptica denominada zona activa (ZA) [29]. El núcleo de la maquinaria de exocitosis desencadenada por  $\text{Ca}^{+2}$  está constituido por seis proteínas diferentes: tres proteínas del complejo SNARE, la proteína SM (Munc18-1), la sinaptotagmina 1 (Stg1), y la última molécula descrita para este complejo, la complexina [30–33].

Las proteínas del complejo SNARE se subdividen en dos categorías. La primera, definida como v-SNARE, está representada por la proteína de membrana vesicular sinaptobrevina. La segunda de estas categorías se conoce como t-SNARE y está representada por dos proteínas de la membrana presináptica: SNAP25 y sintaxina-1 [29, 33, 34]. La sintaxina-1 forma un complejo estable con dominios específicos de la sinaptobrevina y SNAP-25 y la interacción entre estos elementos es dirigida por Munc18-1 (**Fig. 1 a**) [35, 36]. En un proceso previo a la fusión de las membranas vesicular y presináptica, la complexina se une al complejo SNARE en un surco formado por la sinaptobrevina y la sintaxina-1 (**Fig. 1 b, d**) [37]. Un análisis detallado de este surco confirmó que la complexina y la Stg1 compiten por el mismo sitio de unión en el complejo SNARE [38]. Cuando los niveles de  $\text{Ca}^{+2}$  aumentan en la terminal presináptica, la complexina se libera del complejo SNARE, dejando libre el sitio de unión para la Stg1. (**Fig. 1 c**) [29, 33, 35, 39]. Esta proteína, que opera como un sensor de  $\text{Ca}^{+2}$ , se encuentra anclada a la membrana de la VS y cuenta con dos dominios citoplasmáticos definidos como C2A y C2B [30, 33]. El dominio C2A se une a tres iones de  $\text{Ca}^{+2}$ , mientras que el dominio C2B se une a dos y a su vez, ambos dominios se unen a fosfolípidos de la membrana presináptica. De esta manera, se produce la fusión de la membrana vesicular con la presináptica y la formación de un poro para la liberación del neurotransmisor [33].

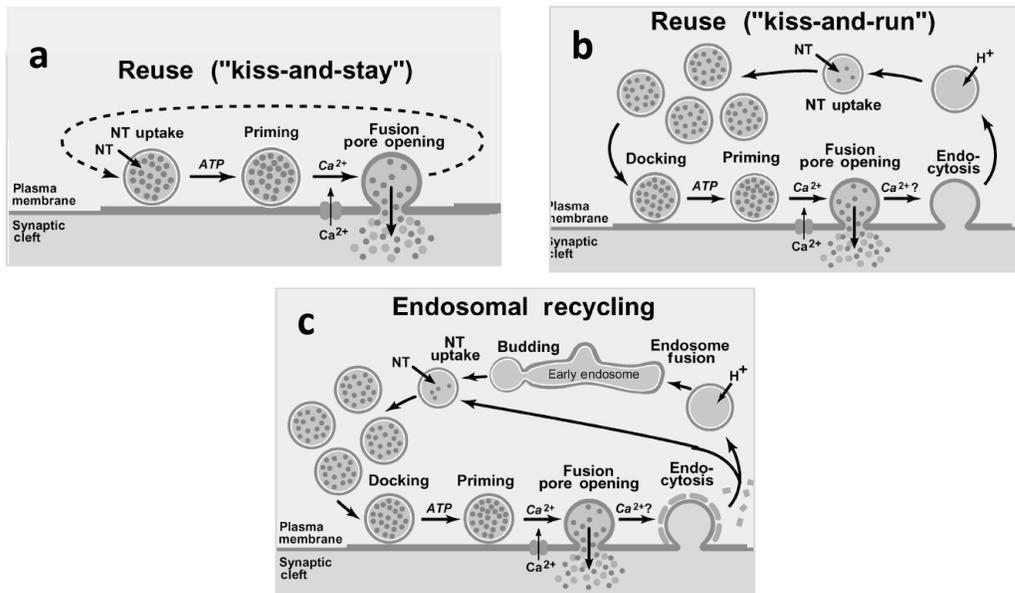
## Introducción



**Fig.1 Modelo de los estadios por lo que pasa una VS durante la exocitosis dependiente de  $Ca^{2+}$ .** El modelo propone que la complexina suprime la fusión de una VS a la terminal presináptica al insertarse en el complejo SNARE. La unión de la complexina al complejo SNARE estabiliza el ensamblaje de v y t-SNARE, e inhibe la transferencia de la fuerza generada por el ensamblaje del complejo SNARE hacia las membranas en fusión. Posteriormente, la Stg1 desencadena la fusión de la VS y los fosfolípidos de membrana de manera dependiente de  $Ca^{2+}$  [37].

Luego de la exocitosis, las VS se endocitan y reciclan probablemente a través de tres vías alternativas: (a) Las vesículas se reacidifican por la actividad de bombas de  $H^+$  presentes en la membrana vesicular y vuelven a llenarse con neurotransmisores sin desacoplarse de la membrana presináptica, en un mecanismo definido como “*kiss and stay*” (Fig. 2 a); (b) las vesículas se desacoplan y reciclan localmente, para reacidificarse y llenarse nuevamente con neurotransmisores, en un mecanismo definido como “*kiss and run*” (Fig. 2 b); o (c) las vesículas se endocitan a través de fosas revestidas de clatrina para reacidificarse y recargarse de neurotransmisores, ya sea directamente o después de pasar por un intermediario endosomal, en un mecanismo definido como “*endosomal recycling*” (Fig.2 c) [40].

## Introducción

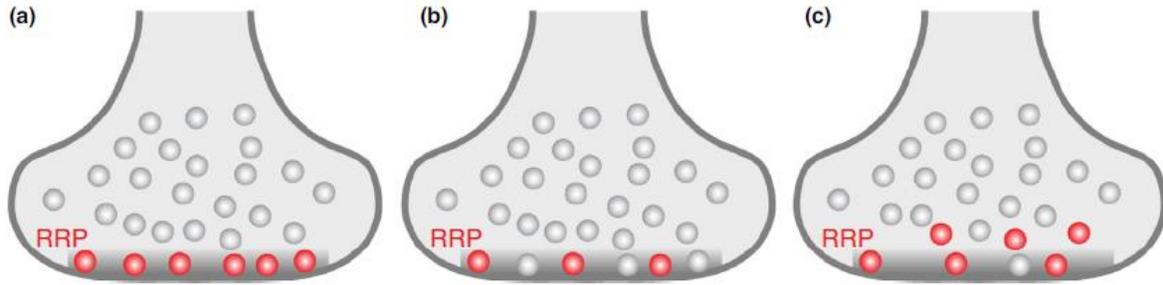


**Fig. 2** Aquí se proponen tres vías de reciclaje de VS: Dos vías rápidas, en las que las vesículas permanecen en la ZA para recargarse (*kiss-and-stay*) (a) o se reciclan localmente sin endocitosis mediada por clatrina (*kiss-and-run*) (b), y una vía más lenta que involucra la endocitosis mediada por clatrina (*Endosomal recycling*) (c). La vía rápida se utiliza preferentemente para reciclar rápidamente las vesículas en el pool de liberación inmediata a frecuencias de estimulación bajas, mientras que la vía lenta dependiente de clatrina entra en acción a frecuencias de estimulación más altas [37].

## Ajuste homeostático de las vesículas sinápticas

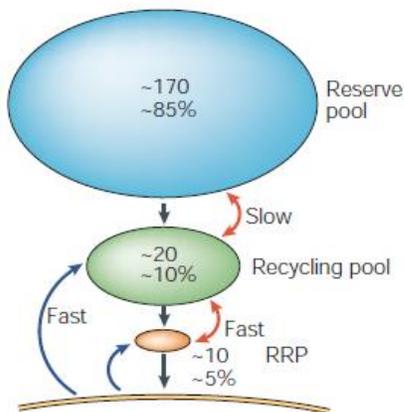
En la terminal presináptica se han caracterizado tres pools de VS diferentes. El primero de estos grupos lo constituye el pool de VS del RRP (Acrónimo del *readily releasable pool*). Este pool ha sido definido como aquel que se encuentra acoplado a la ZA, es decir, en contacto directo con la membrana plasmática presináptica y es el primero en liberarse luego de la llegada de un PA (**Fig. 3 a**) [25, 26, 41–44]. Algunos autores especulan con la posibilidad de que solo un subgrupo de VS acopladas a la terminal represente el RRP (**Fig. 3 b**), e incluso que algunas de las VS del RRP se acoplan a la membrana de la terminal presináptica mientras que existen VS adicionales de este pool que alcanzan la membrana presináptica a través de un rápido reclutamiento a sitios vacíos (**Fig. 3 c**) [44].

## Introducción



**Fig. 3** El RRP consiste en VS acopladas. Las preguntas que surgen son: ¿Todas las vesículas del RRP están acopladas en la ZA o solo un subconjunto de ellas? (a) Un modelo postula que todas las vesículas acopladas son parte del RRP y todas las vesículas del RRP están acopladas. (b) Otra posibilidad es que solo un subconjunto de vesículas acopladas constituya el RRP. (c) Un tercer modelo sugiere que muchas vesículas del RRP están acopladas, pero vesículas adicionales pueden contribuir al RRP mediante un reclutamiento rápido a sitios de liberación vacíos y activados. En (a) – (c), las vesículas del RRP están ilustradas en rojo y la ZA es el área sombreada en gris [41].

Independientemente de estos modelos, las terminales nerviosas presinápticas contienen un RRP y un gran *pool* de reserva compuesto de VS que pueden exocitarse en respuesta a una estimulación intensa o prolongada. Sin embargo, teniendo en cuenta que no todas las VS del *pool* de reserva tienen la misma capacidad de ser liberadas, algunos autores subdividen a este grupo en un *pool* de reserva propiamente dicho y un *pool* de reciclaje. Este último se libera más lentamente que el RRP y precede a la movilización del *pool* de reserva (Fig. 4). [39]



**Fig. 4** Esquema representativo del tamaño de los *pools* de VS y tasa de recambio. En cada esfera se indica el número total de VS pertenecientes a cada *pool* y el porcentaje relativo al total de VS presentes en la terminal presináptica. Las flechas azules indican endocitosis; las flechas rojas indican recambio entre *pools*. El recambio de VS entre el *pool* de reciclaje (*Recycling pool*) y el *pool* de reserva (*Reserve pool*) es lento, mientras que su recambio con el RRP es relativamente rápido [39].

De este conjunto de VS, las del RRP tienen la mayor probabilidad de fusión en la membrana de la terminal presináptica, lo que resalta la importancia de su contribución a la eficiencia de la transmisión sináptica [43, 45]. Por ello, los mecanismos que controlen el transporte de VS

## **Introducción**

a la ZA y los implicados en el anclaje de una VS a la ZA, previo a la fusión de las membranas vesiculares y la presináptica, representan puntos de control en el ajuste de la eficiencia de la transmisión sináptica [46].

Entre los mecanismos responsables de promover la llegada de las VS a la ZA, numerosos autores reportaron que la polimerización dependiente de ATP de filamentos de actina, así como la activación de una calcineurina activada por fosfatasa son responsables de promover un aumento en el reclutamiento de vesículas al RRP [25, 47]. Por el contrario, la fosforilación de las cadenas livianas de los filamentos de miosina, que resulta en la contracción de elementos del citoesqueleto, así como la activación de la Kinasa 5 ciclina-dependiente (CDK5) son responsables de inducir el cambio opuesto [25, 48, 49].

En relación al anclaje de una VS a la ZA previo a la fusión de las membranas vesicular y presináptica, uno de los mecanismos caracterizados hasta el momento involucra la participación de dos proteínas presentes en ZA: Munc13 y  $\alpha$ -RIM (Acrónimo de *Rab3-Interacting Molecule*) [50]. Numerosos autores reportaron que el extremo N-terminal de Munc13 se asocia a la proteína  $\alpha$ -RIM y a Rab3A, una proteína presente en la membrana vesicular unida a GTP y la conformación de este complejo tripartito Munc13/  $\alpha$ -RIM/ Rab3A permite la interacción de la VS con el complejo t-SNARE, regulando así el tráfico vesicular y el tamaño del RRP [46, 50–53].

Existe una extensa cantidad de trabajos que caracterizan los cambios homeostáticos en el número de VS dependientes de la actividad neuronal, tanto en modelos invertebrados como de vertebrados.

En invertebrados, uno de los modelos mejor caracterizados es la unión neuromuscular de *Drosophila* donde la inhibición de la función de los receptores postsinápticos provoca un aumento homeostático de la Pr, restaurando la excitabilidad postsináptica [54]. En este modelo, la homeostasis presináptica puede ser inducida rápidamente, se mantiene durante periodos prolongados de tiempo y depende de la modulación homeostática del tamaño del RRP y de incrementos en los flujos de  $\text{Ca}^{+2}$  presináptico a través de canales de  $\text{Ca}^{+2}$  voltaje dependientes  $\text{CaV}_{2.1}$  [55]. La proteína *RIM-Binding Protein* (RBP) juega un papel central en

## **Introducción**

este ajuste ya que interactúa con la proteína RIM, permitiendo el reemplazo rápido de las vesículas del RRP por VS del *pool* de reciclaje facilitando de esta manera la potenciación sináptica observada en respuesta al bloqueo de receptores postsinápticos. Además, induce un aumento en el reclutamiento de CaV<sub>2.1</sub>, promoviendo así un aumento en los influjos de Ca<sup>+2</sup> presináptico [56].

En vertebrados, el ajuste homeostático en el tamaño del RRP ha sido observado en diferentes regiones del SNC. A nivel del cerebelo, una disminución en los niveles de actividad de un circuito neuronal por el bloqueo farmacológico de receptores de tipo AMPA, así como por la pérdida de la función de estos receptores inducida por modificaciones genéticas, dio lugar al incremento homeostático en el tamaño del RRP [57]. Sin embargo, los mecanismos moleculares que subyacen a este ajuste no han sido caracterizados hasta el momento.

Otra de las regiones donde los cambios plásticos dependientes de la actividad neuronal han sido ampliamente caracterizados es la corteza visual. La misma, puede subdividirse en 5 áreas (V1-V5). De estas 5 áreas, los mecanismos de PSH han sido ampliamente caracterizados en la corteza somatosensorial visual primaria V1, donde diferentes estudios realizados *in vivo* reportaron que, en sinapsis establecidas entre neuronas de la capa 4 con neuronas piramidales de las capas 2/3 de V1, la privación visual promueve un aumento en el número de VS del *pool* de reciclaje y del RRP así como un aumento en la Pr que es acompañado de un cambio en la composición estructural de receptores postsinápticos NMDA (NMDARs) extra y perisinápticos. Este cambio en la composición de los NMDARs confiere a estos receptores propiedades electrofisiológicas que permiten aumentar la amplitud de los potenciales postsinápticos excitadores [58–60]. El aumento homeostático de la Pr generado en respuesta a la privación visual favorece el derrame de glutamato hacia sitios extrasinápticos y persinápticos, donde los NMDARs expresan predominantemente la subunidad NR2B responsable de facilitar la sumación temporal de corrientes postsinápticas, aumentando la excitabilidad del circuito [59].

Finalmente, y teniendo en cuenta que nuestro trabajo se enfoca en el estudio de la PSH en el hipocampo, especificaremos algunos cambios caracterizados en esta región del SNC. El tamaño de la ZA constituye un factor determinante del tamaño del RRP en esta región del

## **Introducción**

SNC y puede ajustarse homeostáticamente en respuesta a cambios en los niveles de actividad del circuito [15, 61]. En este sentido, en respuesta a una disminución sostenida de la actividad neuronal, se observó un incremento de su tamaño [15]. Si bien el tamaño de la ZA varía significativamente entre diferentes sinapsis, la abundancia de proteínas presentes en esta región, así como el número de vesículas del RRP y la Pr se correlacionan de manera directa con este parámetro [62, 63]. Acompañando estos cambios, numerosos autores reportan un aumento en los niveles de expresión de enzimas responsable de la síntesis de glutamato, así como un incremento en la expresión del transportador vesicular de glutamato 1 (vGlut-1), presente en la membrana de las VS y responsable de incorporar glutamato al interior de las mismas [26, 64–67]. El número de copias de vGlut-1 por vesículas se encuentra bajo control estricto y se ajusta de manera homeostática frente a cambios en los niveles de actividad de la red [64, 66, 68]. Resulta interesante destacar que la supresión de la actividad neuronal no solo evoca incrementos de componentes estructurales presentes en la terminal presináptica. Kim, y cols. reportaron que la inactividad crónica promueve una reducción en los niveles presinápticos de CDK5, lo que indica que esta enzima, que es responsable de reducir el reclutamiento de VS del RRP a la ZA, representa un sustrato crítico para el ajuste dependiente de la actividad neuronal en el tamaño de este *pool* vesicular [49]. Es evidente entonces, que existen múltiples mecanismos a través de los cuales una neurona puede ajustar el tamaño del RRP de manera dependiente de la actividad sináptica. Por lo tanto, identificar los factores y las vías moleculares responsables de estos ajustes es crucial para comprender en profundidad los mecanismos subyacentes a la plasticidad sináptica en el SNC.

### **Ajuste dependiente de la actividad en la abundancia de $\text{Ca}^{+2}$ presináptico**

Como comentamos anteriormente, la neurotransmisión se inicia con la llegada de un PA a la terminal presináptica, promoviendo la apertura de canales de  $\text{Ca}^{+2}$  voltaje-dependientes (VGCC), con el consecuente incremento en los niveles intracelulares de este ion [69, 70]. La entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  a la terminal presináptica está mediada por diferentes subtipos de canales VGCC identificados como canales de tipo P/Q, N, R. La contribución relativa de cada uno de

## **Introducción**

estos VGCC al contenido total de  $\text{Ca}^{+2}$  presináptico es de un 50% dependiente de la activación de los VGCC<sub>P/Q</sub>, el 25% por VGCC<sub>N</sub> y el 25% restante por los VGCC<sub>R</sub> [71].

El incremento en los niveles presinápticos de este ion se transduce en la fusión de la membrana de una VS con fosfolípidos de la membrana presináptica y consecuente liberación del neurotransmisor. Stanley y cols. sugieren que los sitios en los que se producen los influjos de  $\text{Ca}^{+2}$  y los sitios en los que el  $\text{Ca}^{+2}$  interactúa con la maquinaria de liberación vesicular deben estar próximos, si no colocalizados [72]. En este sentido, dado que la migración del ion en el citoplasma está limitada por la difusión, la distancia entre estos sitios no puede ser superior a ~100nm [72, 73]. Además, la liberación del neurotransmisor ocurre en un tiempo que no supera los 0,2 ms a la entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  cuando la concentración citoplasmática de este ion llega a valores de ≈20-50 mM, con un máximo de hasta 190 mM que sólo se alcanza cerca del poro del canal iónico [72, 74–76].

Estudios realizados *in vitro* e *in vivo* reportaron que la cantidad de  $\text{Ca}^{+2}$  que ingresa en el botón sináptico en respuesta a cambios crónicos de la actividad neuronal resulta un factor clave de los cambios homeostáticos en la fuerza sináptica [28, 77–79]. Mientras que la supresión de la actividad neuronal es suficiente para generar un aumento en los niveles presinápticos de este ion, el aumento prolongado de la actividad está acompañado por un transitorio de  $\text{Ca}^{+2}$  más pequeño. Estos cambios pueden estar modulados por a) cambios en la conductancia de los VGCC sin que se observen cambios en su abundancia o su probabilidad de apertura frente a la llegada de un PA [78], b) cambios en los niveles de expresión de los VGCC [45, 80], c) cambios en la expresión génica de vías moleculares que operan corriente abajo del  $\text{Ca}^{+2}$  presináptico [77] y/o d) cambios en los mecanismos moleculares responsables del *clearance* presináptico de  $\text{Ca}^{+2}$  [81].

La importancia de mantener la homeostasis del  $\text{Ca}^{+2}$  presináptico por medio de vías dependientes del voltaje resalta la necesidad de mecanismos que puedan regular los niveles de este ion en ausencia de una despolarización neuronal. Teniendo en cuenta el alto grado de especialización celular observado entre los dominios especializados en recibir y transmitir señales de una neurona, junto con su volumen celular que resulta unas 10.000 veces mayor en proporción a la mayoría de las células eucariotas [82] es esperable que

## **Introducción**

procesos como la síntesis de proteínas y lípidos o el tráfico celular sean sostenidos por niveles elevados de ATP. De hecho, se estima que el 20% del ATP corporal total se utiliza para garantizar el funcionamiento del SN, destinando  $\frac{3}{4}$  partes de este total a la señalización neuronal [83, 84]. Teniendo en cuenta que este nucleótido opera sobre vías que son independientes de voltaje (ver el apartado que sigue a continuación) y considerando su rol neuromodulador ampliamente caracterizado, [85, 86] en nuestro trabajo especulamos que, en condiciones de inactividad crónica, el ajuste de  $\text{Ca}^{+2}$  presináptico podría estar modulado por el ATP.

De esta manera, este proyecto tiene como particularidad el vincular entre sí varios paradigmas novedosos inherentes a la comunicación celular y sináptica al vincular el metabolismo celular con los fenómenos involucrados en la comunicación neuronal durante los mecanismos de PSH.

## **Señalización purinérgica y plasticidad**

### **El rol neuromodulador del ATP**

El concepto de la transmisión purinérgica, o transmisión mediada por nucleótidos, comenzó a tomar relevancia a finales de los años 60 y principios de los 70, a partir de una serie de estudios que mostraron como, tras la estimulación eléctrica de nervios periféricos simpático y parasimpático, era posible detectar respuestas postsinápticas incluso en presencia de antagonistas adrenérgicos y colinérgicos, respectivamente. Ello permitió postular la existencia de nervios no-adrenérgicos no-colinérgicos (NANC) [87]. Más adelante se comprobaría que el neurotransmisor liberado por estos nervios NANC era el ATP [88]. La evidencia experimental incluyó: la mimetización de la respuesta postsináptica de los NANC luego de la aplicación exógena de ATP en ausencia de otros estímulos, la medición de los niveles de ATP luego de la aplicación de estímulos eléctricos de los NANC, el marcaje histoquímico de una subpoblación de neuronas con quinacrina, un marcador fluorescente con la capacidad de detectar niveles elevados de ATP unido a péptidos y finalmente, el bloqueo de la respuesta de los NANC luego de la aplicación de  $\alpha,\beta$ -methylene ATP, un

## **Introducción**

análogo del ATP que produce la desensibilización selectiva de los receptores purinérgicos [87].

En el SNC, el ATP puede ser incorporado a una VS y co-liberado desde la terminal presináptica junto con otros neurotransmisores tales como GABA y glutamato. Sin embargo, también se ha caracterizado la presencia de vesículas en terminales presinápticas glutamatérgicas que solo contienen ATP. Por otra parte, el ATP también puede ser liberado a través hemicanales de membrana (como por ejemplo, los formados por panexina-1) o incluso, a través del receptor purinérgico P2X7 (P2X7R) al que nos referiremos más adelante en esta tesis [89].

Los mecanismos de acción del ATP están mediados por dos tipos de receptores purinérgicos: receptores ionotrópicos del tipo P2X (P2XR1-7) y metabotrópicos del tipo P2Y (P2YR1, P2YR2, P2YR4, P2YR6, P2YR11, P2YR12, P2YR13, and P2YR14) [90, 91].

La activación de los P2YR tiene un efecto inhibitorio sobre la neurotransmisión [92]. Además, algunos autores sugieren que el ATP también podría modular el efecto inhibitorio de manera indirecta a través de la activación de receptores del tipo A1 presinápticos, activados por adenosina, un metabolito derivado del catabolismo extracelular del ATP [93]. Por su parte, la activación de los P2XR tiene el efecto opuesto ya que la activación de esta subfamilia de receptores genera influjos de  $Ca^{+2}$ , además de influjos de  $K^{+}$  y  $Na^{+}$ , promoviendo un efecto excitador [90].

El efecto del ATP sobre la plasticidad neuronal dependiente de la actividad ha sido ampliamente caracterizado en los fenómenos de plasticidad Hebbiana [9, 10]. En este sentido, la aplicación local de ATP a neuronas de la región CA1 del hipocampo puede inducir tanto PLP como DLP, dependiendo del grado de entrada de  $Ca^{+2}$  [94]. Se ha sugerido que un aumento relativamente grande en los niveles de  $Ca^{+2}$  induce PLP, mientras que un aumento moderado induce DLP. Esto podría estar determinado por la activación de diferentes sistemas enzimáticos cuya actividad depende de la magnitud del aumento de  $Ca^{+2}$  [95]. Aunque la DLP y PLP suelen ser inducidas por patrones de estimulación eléctrica (por ejemplo, 100 Hz durante 1 s para PLP y 1 Hz, 500 o 900 pulsos para DLP) [94], se ha

## **Introducción**

reportado que la aplicación de ATP en ausencia de estímulos eléctricos puede ser capaz de promover plasticidad de Hebb [96].

Si bien se han caracterizado los mecanismos moleculares que subyacen a la señalización purinérgica en la plasticidad Hebbiana, la importancia de este nucleótido y sus vías purinérgicas en la PSH presináptica no había sido investigada hasta el momento. Teniendo en cuenta que la PSH ha comenzado a ser comprendida recientemente como una forma de modulación de la eficiencia sináptica que actúa en conjunto con la plasticidad de Hebb, profundizar en el conocimiento sobre las vías de señalización purinérgicas que participan en este ajuste homeostático contribuirá a una mejor comprensión de las bases moleculares que subyacen los procesos de aprendizaje y memoria.

## **El Receptor P2X7 en la plasticidad sináptica**

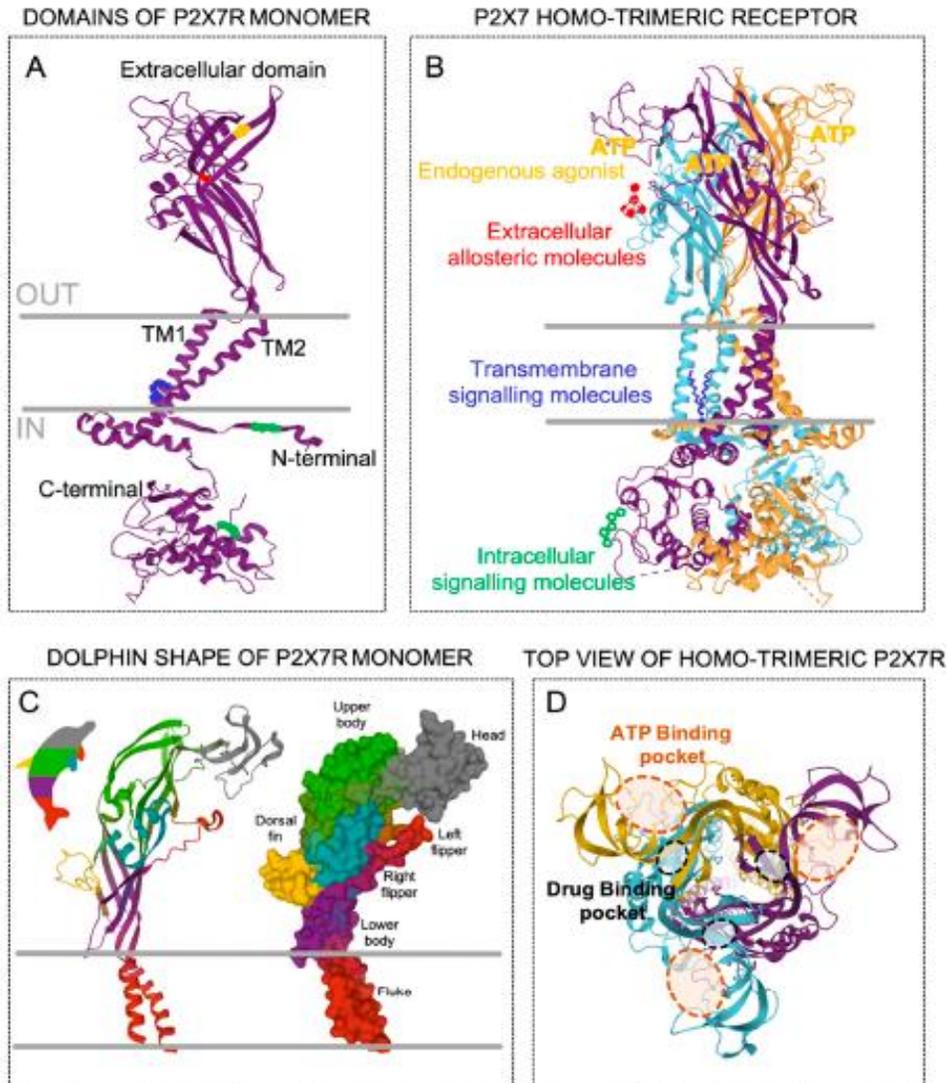
Dentro de los P2XR, reviste un interés especial en el control de la neurotransmisión el subtipo P2X7R dada su elevada permeabilidad al  $\text{Ca}^{+2}$ . Estos receptores se activan a niveles inusualmente elevados de ATP en relación al resto de los P2XR, con concentraciones efectivas medias en el rango de  $\sim 50 \mu\text{M}$  a  $\sim 2.5 \text{mM}$ . También pueden ser activados por el análogo sintético del ATP, el 20(30)-O-(4-benzoylbenzoyl) ATP (BzATP) con concentraciones efectivas medias reportadas aproximadamente diez veces menores que las requeridas para el ATP [97].

La expresión de estos receptores ha sido ampliamente caracterizada en las membranas de células neuronales y gliales de diferentes regiones del SNC [98–102]. Los P2X7R están constituidos por dos subunidades transmembranas (M1-M2), con sus extremos N y C terminales intracelulares, y un gran loop extracelular rico en residuos de cisteína que actúa como sitio de unión para el ATP (**Fig. 5 A**) [103, 104]. Una reconstrucción tridimensional de este receptor recuerda a la forma de un “delfín” en la que la porción extracelular del receptor toman la forma del cuerpo y la aleta mientras que las dos regiones transmembranas se asocian a la forma de la cola (**Fig. 5 C**) [104]. El ensamblaje de tres subunidades de P2X7R forma un receptor homotrimérico (**Fig. 5 B Y 6 A**) y raramente forma heterotrímeros con otros miembros de la familia P2X. En este contexto, se ha demostrado que las subunidades del

## ***Introducción***

P2X7R pueden unirse a otras subunidades de P2X, principalmente a P2X4R y en menor medida a P2X2R y P2X5R [105, 106], lo que podría sugerir que otros receptores P2X contribuyen a las respuestas celulares típicamente atribuidas a P2X7R. Por otra parte, presentan tres sitios de unión al ATP, uno por cada monómero adyacente (**Fig. 5 D**). A diferencia de otros subtipos de P2XR, donde la unión de dos moléculas de ATP es suficiente para activar al receptor, los P2X7R requieren tres moléculas de este nucleótido para su activación [104]. Además, un análisis de la estructura cristalina de los P2X7R muestra sitios de unión de 5 subtipos de antagonistas específicos: A740003, A804598, AZ10606120, GW791343 y JNJ47965567 [107]. Estos sitios están yuxtapuestos a los sitios de unión del ATP lo que sugiere que los fármacos operan como inhibidores no competitivos de la actividad de este receptor [104, 107] (**Fig. 5 D**).

## Introducción

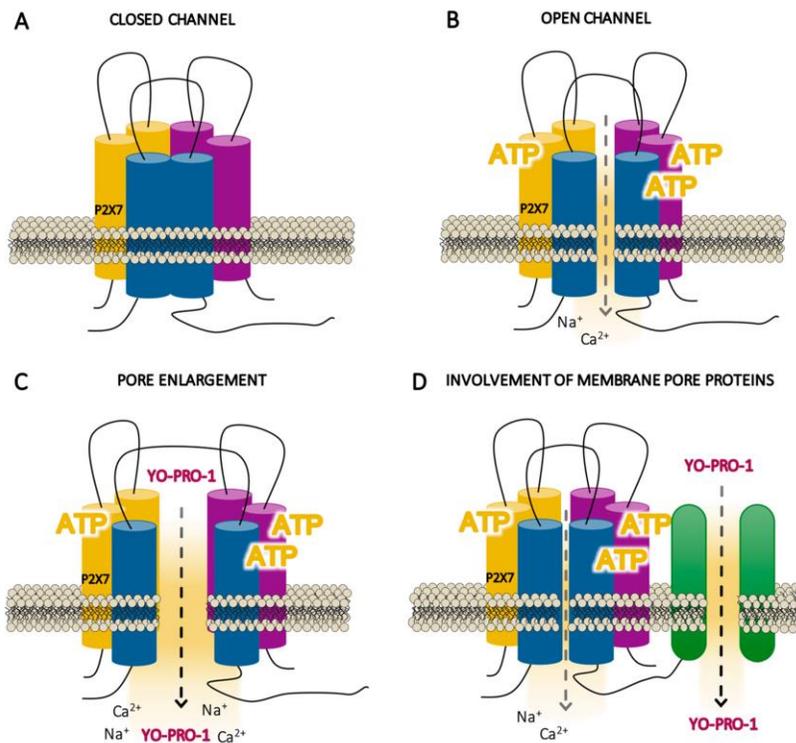


**Fig. 5 Topología del receptor P2X7.** (A) Estructura secundaria de un monómero de P2X7R con los dominios extracelular, transmembrana 1 (TM1), transmembrana 2 (TM2), N y C terminal intracelular. (B) Co-ensamblaje de tres monómeros de P2X7R (Violeta, Celeste y Naranja). Se muestran además regiones donde posiblemente podrían interactuar moléculas con diferentes dominios tales como mensajeros intracelulares en los extremos N y C terminal intracelular (Verde), residuos de membrana en el dominio transmembrana (Azul), el ATP (Amarillo) y otros moduladores alostéricos operando sobre el dominio extracelular (Rojo). (C) Estructura secundaria (Izq.) y reconstrucción tridimensional (Der.) del monómero recordando a una forma de delfín. (D) Vista superior del P2X7R resaltando los sitios de unión del ATP (Líneas punteadas naranjas) y tres sitios adicionales para la unión de antagonistas (Líneas punteadas negras) [104].

Numerosos trabajos demuestran que los P2X7R están localizados en las terminales nerviosas glutamatérgicas y que su activación desempeña un papel importante en la liberación de glutamato evocado por ATP por mecanismos dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  [108]. También se ha descrito que el propio P2X7R constituye una vía de liberación independiente

## Introducción

del  $\text{Ca}^{2+}$  para el glutamato, GABA e incluso, para el propio ATP, aunque los mecanismos que subyacen a esta liberación son materia de debate [98, 100, 108, 109]. Una posibilidad es que la activación sostenida del receptor llevaría a un reordenamiento de elementos del citoesqueleto induciendo la formación de un poro permeable a moléculas de un tamaño mayor a 900Da [110]. Se han propuesto dos hipótesis diferentes para explicar de qué manera se forma este poro. Una sugiere que la formación del poro se produce como resultado de un incremento gradual en la permeabilidad del receptor, lo que llevaría a la dilatación del canal iónico del P2X7R (**Fig. 6 B, C**). La segunda hipótesis sugiere que el poro asociado al P2X7R es una estructura separada del receptor (**Fig. 6 D**) y que podría estar representado por un canal de panexina-1 (Panx1HC), posiblemente activado por segundos mensajeros y no por la acción directa del ATP sobre el receptor [3, 104, 105]. Independientemente del modelo, el estado de poro dilatado está regulado por procesos y mecanismos celulares que involucran cambios en el extremo C-terminal del receptor [111].



**Fig. 6 Ilustraciones esquemáticas de los estados hipotéticos de la activación del receptor P2X7 (P2X7R).** (A) Estado de reposo del P2X7R donde el agonista (trifosfato de adenosina, ATP) no está presente o existe en concentraciones insuficientes, de modo que la conformación del receptor no abre su propio canal iónico (canal cerrado). (B) Activación inicial del receptor en milisegundos por las tres moléculas de ATP, induciendo la apertura selectiva del canal para pequeños cationes (canales abiertos). (C) Este estado inicial es seguido por una fase de activación prolongada que da lugar al

agrandamiento del propio receptor (agrandamiento del poro), permitiendo el flujo de iones grandes no selectivos como Yo-Pro-1. (D) Esta fase prolongada de activación puede involucrar otras proteínas de membrana [104].

## **Introducción**

Existe una considerable cantidad de evidencia que sugiere que los P2X7R desempeñan un papel crucial en los mecanismos de plasticidad sináptica. Estudios realizados *in vitro* en el núcleo paraventricular de roedores confirmaron que la activación de los P2X7R localizados en la terminal postsináptica contribuye en la modulación de la eficiencia postsináptica mediante mecanismos que facilitan una potenciación de la actividad neuronal [112].

Además, numerosos autores reportaron la participación del P2X7R en la formación de diferentes tipos de memorias en roedores, confirmando que ratones deficientes en P2X7R (P2X7KO) experimentaron una deficiencia en la memoria aversiva cuando fueron sometidos al paradigma comportamental de *Fear Conditioning Test*. En este trabajo, la administración del antagonista del P2X7R en la región CA1 del hipocampo de ratas, en diferentes momentos, dificultó la adquisición, consolidación y recuperación de la memoria a largo plazo [113]. Por otra parte, el bloqueo farmacológico de estos receptores o su delección genética previenen los déficits cognitivos característicos de patologías como la enfermedad de Alzheimer y favorece la restauración de mecanismos de plasticidad hebbiana [114–117].

Si bien se ha caracterizado la participación de los P2X7R en mecanismos de plasticidad hebbianos, el rol de los P2X7R en la PSH no había sido caracterizado hasta el momento de iniciar este trabajo. Así, con este proyecto esperamos identificar y caracterizar nuevos mecanismos que participan en el ajuste compensatorio de la función presináptica en condiciones de inactividad crónica, favoreciendo una mejor comprensión de la regulación homeostática llevada a cabo en esta terminal.

## **Interacción neuro-glial y plasticidad**

Las células gliales, entre las que se encuentran los astrocitos, la microglía, los oligodendrocitos y las células precursoras de oligodendrocitos, representan aproximadamente la mitad de las células nerviosas del SNC en mamíferos [118]. Mientras que los oligodendrocitos son ampliamente reconocidos por sus funciones especializadas en la mielinización, en las últimas dos décadas ha surgido el concepto de sinapsis tripartita que destaca la participación de los astrocitos y la microglía como componentes esenciales de la sinapsis y resalta su capacidad para regular la actividad neuronal [118–121].

En relación a la microglía, se ha caracterizado que puede formar parte de contactos sinápticos poco estables con las neuronas, con un tiempo promedio de permanencia en las sinapsis de solo 5 minutos, aunque en condiciones patológicas este tiempo puede extenderse hasta 1hs luego de lo cual tiene lugar la poda de la terminal presináptica [122]. La frecuencia con la que se forman estos contactos depende de los niveles de actividad del circuito. Así, una disminución en los niveles de actividad neuronal está acompañada de una disminución en la cantidad de contactos entre estos tipos celulares [122].

Por su parte, el papel de los astrocitos ha sido materia de debate. Mientras que inicialmente eran considerados elementos pasivos de soporte para las neuronas, estudios posteriores han resaltado su función como células responsables de modular la excitabilidad neuronal [123]. A nivel del hipocampo, se ha caracterizado que la comunicación entre astrocitos y neuronas modula tanto la transmisión sináptica basal como mecanismos plásticos de Hebb. Esta modulación ocurre través de un repertorio de receptores y transportadores expresados en la superficie de los astrocitos, por medio de los cuales detectan la actividad de las neuronas vecinas y responden liberando gliotransmisores entre los que se encuentran la D-serina [124], glutamato [125] y el ATP [126].

La D-serina astrocitaria actúa como agonista de los receptores postsinápticos de tipo NMDA y es liberada cuando la demanda en los niveles de actividad neuronal es alta, tal como sucede en la PLP [124, 127].

## ***Introducción***

La inducción de PLP dependiente de glutamato astrocitario ha sido ampliamente caracterizada en sinapsis CA3-CA1 del hipocampo. Esta, requiere la activación de receptores muscarínicos colinérgicos (mAChR) y receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR). Así, la estimulación de las vías colinérgicas en cortes de hipocampo provoca elevaciones de  $Ca^{2+}$  en los astrocitos, despolarizaciones postsinápticas en neuronas piramidales CA1 y PLP en sinapsis individuales CA3-CA1 [128].

Por su parte, el rol del ATP en la modulación de la plasticidad sináptica es materia de debate. Algunos autores proponen que la activación de los P2YR presinápticos en el área CA1 del hipocampo inhibe la neurotransmisión e induce la DLP. Uno de los mecanismos involucrados en esta modulación implica la activación de una cascada de señalización intracelular dependiente de los P2YR que finaliza con el bloqueo de canales de  $Ca^{+2}$  dependientes de voltaje de la terminal presináptica [92]. Además, el ATP también podría modular el efecto inhibitorio de manera indirecta a través de la activación de receptores del tipo A1 presinápticos, activados por adenosina, un metabolito derivado del catabolismo extracelular del ATP [129]. Se ha descrito que este metabolito podría tener un efecto dual sobre la plasticidad sináptica ya que algunos autores proponen que facilita la DLP mientras que otros sostienen que la adenosina derivada del ATP astrocitario deprime las vías neuronales adyacentes a las están siendo estimuladas durante la inducción de la PLP [126]. Además, se ha descrito que el bloqueo de los P2XR postsinápticos facilita la PLP en determinadas condiciones experimentales [130]. Sin embargo, también se ha observado que la PLP es inducida en células piramidales (capa CA1) del hipocampo mediante la aplicación exógena de ATP y la consecuente activación de los P2XR postsinápticos mientras que el efecto opuesto se observa frente a la aplicación de antagonistas específicos de estos receptores [131]. Es por esto, que el papel de los P2XR en la PLP aún no está completamente esclarecido.

En este contexto, en el que diversos factores solubles de origen glial participan en el control de la plasticidad sináptica de Hebb, consideramos relevante investigar el papel del ATP en la PSH. Esto se debe a que, por un lado, el organismo destina una gran cantidad de este nucleótido al funcionamiento del SNC [83, 84]. Este consumo elevado de ATP, destinado en

## ***Introducción***

su mayor parte a la señalización celular a nivel del SNC, sugieren que además de su función energética, media la comunicación celular y podría potencialmente participar en la modulación de la PSH.

## **Hipótesis**

Proponemos que la señalización purinérgica cumple un rol esencial en el ajuste homeostático de la función presináptica luego de un período de inactividad crónica. En particular, postulamos que durante el bloqueo prolongado de la actividad sináptica se produce un incremento en la concentración de ATP extracelular, favoreciendo la activación de receptores P2X7 presinápticos y, como consecuencia, la función presináptica se incrementa.

## **Objetivos**

### **Objetivo General**

Nos proponemos caracterizar la importancia del ATP y sus vías de señalización en el ajuste homeostático de la función presináptica dependiente de actividad.

### **Objetivos específicos**

**-Objetivo específico 1:** Analizar el rol del ATP en el ajuste homeostático de la fuerza presináptica.

**-Objetivo específico 2:** Analizar las vías purinérgicas implicadas en la PSH presináptica

**-Objetivo específico 3:** Caracterizar los mecanismos moleculares dependientes del ATP que influyen en el remodelamiento de la terminal presináptica luego de un período de inactividad prolongado.

## **Materiales y métodos**

### **Animales**

Se utilizaron ratas neonatas (día de nacidas o día posterior al nacimiento definidos como P0-P1, respectivamente) de la cepa Sprague Dawley (sp: *Rattus norvegicus*) criadas en la Unidad de Reactivos y Biomodelos de Experimentación (URBE) de la Facultad de Medicina, UdelaR.

### **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): 070153-000681-18, titulado “Procedimiento para obtener co-cultivos neurona-glía a partir de hipocampo murino”.

### **Cultivos disociados de hipocampo**

#### **Obtención de células gliales**

Los cultivos disociados se realizaron a partir de ratas neonatas de la cepa Sprague Dawley a P0-P1 [132]. Se extrajo el cerebro, se lo colocó en medio de disección compuesto por HBSS (*Hanks' Balanced Salt Solution*, Gibco) + HEPES (10mM, Sigma). Luego de realizar un corte sagital, se disecaron ambos hemi-hipocampos, se fragmentaron en 4-6 piezas cada uno y se incubaron en 3 ml de una solución enzimática conteniendo 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

## **Materiales y métodos**

tejido en medio BME suplementado y se centrifugó (1000rpm, 5min). El pellet celular se resuspendió en 2 ml de medio BME suplementado como fue mencionado anteriormente. Se incubaron las células obtenidas en botellas de 25cm<sup>2</sup> conteniendo medio BME suplementado durante 7-14 días hasta la formación de una monocapa.

Una vez formada la monocapa glial en las botellas de cultivo, se realizaron 2 lavados con PBS (buffer fosfato salino) y se tripsinizó (Trypsin-EDTA 0.05%, Gibco) durante 2 minutos a 37°C para lograr el decolamiento de las células. Se completó la disgregación de forma mecánica y se colectaron las células por centrifugación (1000 rpm, 5min) en tubos de 15 ml. El número total de células fue cuantificado en una cámara de Neubauer. Se sembraron  $4 \times 10^3$  células sobre cubreobjetos de 12mm, colocados en placas de 24 pocillos en medio BME suplementado.

Los cubreobjetos fueron previamente tratados con ácido nítrico *overnight*, seguido de 20 lavados con agua desionizada y 15 lavados con etanol 95-99%. Posteriormente fueron colocados en placas de 24 pocillos y se trataron con una solución de colágeno de cola de rata (23%), poli-D-lisina (20µg/ml, Sigma) y ácido acético (3mM) en agua y finalmente, fueron utilizados para cultivo.

Los cultivos 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> durante 5-7 días hasta obtener un 70% de confluencia aproximadamente. Todos los medios de cultivo y la solución enzimática fueron filtrados previamente a su uso.

## **Co-cultivos neurona/glía**

Para obtener cultivos disociados de hipocampo compuestos por células neuronales y gliales (co-cultivos neurona/glía) se siguieron los siguientes pasos: siguiendo el procedimiento detallado previamente, se obtuvo el pellet celular a partir de hipocampos de animales neonatos. El mismo fue resuspendido en 2ml de 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). Previo al cultivo, las células fueron incubadas durante 2 min con *trypan blue*, una tinción que se utiliza

## **Materiales y métodos**

para el marcaje de células muertas, permitiendo descartarlas del conteo de células a sembrar. De esta manera, el número total de células vivas se cuantificó en una cámara de Neubauer y se sembraron  $3,0 \times 10^4$  células por pocillo sobre la monocapa de células gliales. Los co-cultivos se mantuvieron en medio NB suplementado. A las 24hs de sembradas las neuronas, se trató el co-cultivo con el antimetabólico citosina arabinosa (Ara-C,  $4\mu\text{M}$ ) para evitar el crecimiento excesivo de células gliales, permaneciendo 14 días in vitro (DIV) en la estufa a  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ . Los cocultivos fueron utilizados para experimentos a 15-16 DIV

## **Inducción de PSH**

La PSH se indujo provocando la inactividad crónica del circuito mediante la aplicación de TTX ( $1\mu\text{M}$ ) en cultivos de 14-15 DIV durante 24-36hs. Este es un protocolo ampliamente descrito [17, 133, 134]. En todos los experimentos se utilizaron cultivos de la misma edad, no tratados, como control de la actividad sináptica basal.

## **Farmacología**

Para el estudio del papel del ATP extracelular en la PSH se trataron co-cultivos neurona/glía de 14-15 DIV con los agentes detallados a continuación. Se utilizó MgATP (Magnesium ATP,  $500\mu\text{M}$ ) o  $\text{ATPNa}_2$  (Sal de DisodioATP,  $500\mu\text{M}$ ) en ausencia de TTX y Apirasa (enzima que degrada el ATP, Apy, 5 U/ml). Este último tratamiento fue realizado 15min antes y durante el tratamiento con TTX ( $1\mu\text{M}$ , 24-36hs).

Para determinar las vías implicadas en la PSH se trataron co-cultivos neurona/glía, de 14-15 DIV, con los siguientes agentes farmacológicos: RB2 (Reactive Blue 2,  $50\mu\text{M}$ ) y PPADS (pyridoxal phosphate-6-azophenyl-2-4-disulphonic,  $30\mu\text{M}$ ) como antagonista de los P2YR y los P2XR, respectivamente [98, 135]. Se utilizaron antagonistas específicos de los P2X7R: oATP (Oxidized ATP,  $200\mu\text{M}$ ) y A-804589 ( $100\text{ nM}$ ) [100, 136, 137]. Todos los tratamientos fueron realizados 15 minutos antes y durante el agregado de TTX ( $1\mu\text{M}$ , 24-36hs).

También se utilizó el agonista selectivo de los P2X7R no hidrolizable por las ATPasas, BzATP (Benzoil ATP,  $10\mu\text{M}$ ) [137]. Los tratamientos con este reactivo fueron hechos en ausencia de TTX (ver detalle de agentes farmacológicos en **Tabla 1**).

## Materiales y métodos

Tabla 1: Farmacología

Agente Farmacológico	Concentración	Descripción
Tetrodotoxina (TTX)	1 $\mu$ M	Bloqueante de los canales de Na <sup>+</sup> dependientes de voltaje
ATP Na <sub>2</sub>	500 $\mu$ M	Agonista de los P2R
Adenosin-5-trifosfato sal de Magnesio (MgATP)	500 $\mu$ M	Agonista de los P2R
Apirasa (Apy)	5U/ml	Enzima que degrada el ATP
Reactive Blue 2 (RB2)	50 $\mu$ M	Antagonista de los P2YR
pyridoxal phosphate-6-azophenyl-2-4-disulphonic (PPADS)	30 $\mu$ M	Antagonista de los P2XR
Benzoil ATP (BzATP)	10 $\mu$ M	Agonista no hidrolizable de los P2X7R
Oxidized ATP (oATP)	200 $\mu$ M	Antagonista de los P2X7R
A804598	100nM	Antagonista de los P2X7R
GAP26	150 $\mu$ M	Bloqueante de Cx43HC
Probenecid (PBD)	500 $\mu$ M	Bloqueante de Panx1HC

## Inmunocitoquímica

Cultivos de 15-16 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% conteniendo 5% FBS y se incubaron durante 2 horas a TA. Luego de 3 lavados de 5 minutos

## Materiales y métodos

con PBS-Tritón 0,1%, las células se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados a diferentes fluorocromos en solución de PBS-Tritón 0,1% conteniendo 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 primarios y secundarios empleados, y las diluciones se detallan en la **Tabla 2**.

**Tabla 2. Lista de anticuerpos primarios y secundarios**

Anticuerpo		Especie	Dilución	Casa Comercial (Nro. de Catálogo)
Primario	<b>α vGlut1</b>	Rabbit	1:7000	Synaptic Systems (135303)
	<b>α Homer1</b>	Mouse	1:500	Synaptic Systems (160011)
	<b>α Map-2</b>	Chicken	1:3000	Abcam (ab5392)
	<b>α Synaptotagmin-1</b>	Rabbit	1:100	Synaptic Systems (105102)
	<b>α P2X7R</b>	Rabbit	1:300	Alomone (APR-004)
	<b>α GFAP-Cy3</b>	Mouse	1:1000	Sigma-Aldrich (C9205)
Secundario	<b>Alexa Fluor 488</b>	Rabbit	1:500	Invitrogen (A11070)
	<b>Alexa Fluor 647</b>	Chicken	1:300	Abcam (ab150175)
	<b>Alexa Fluor 568</b>	Mouse	1:500	Invitrogen (A11037)

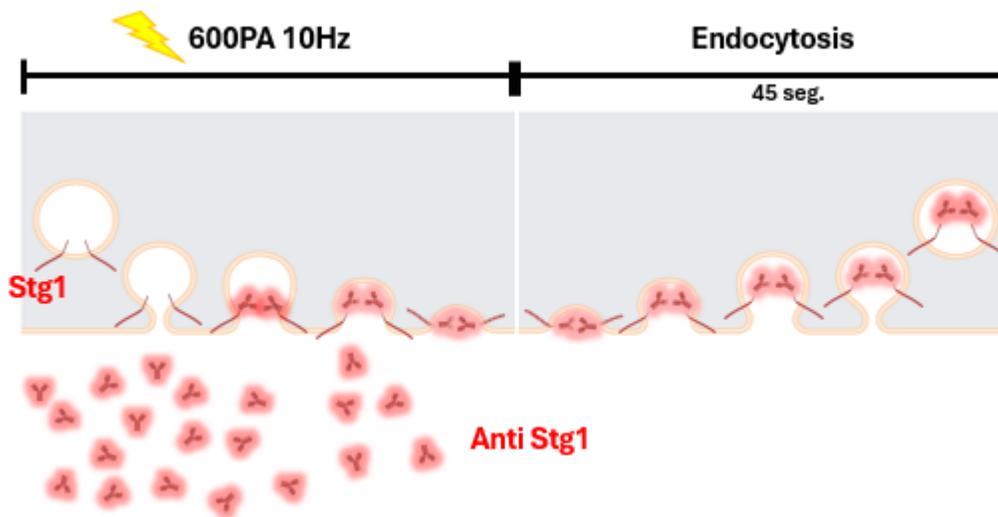
## Marcaje de células vivas

### Experimentos de marcaje con Sinaptotagmina 1 (Stg1) de las VS

Para llevar adelante el marcaje *in vivo* con el anticuerpo contra el dominio luminal de Stg1 (1:100, Synaptic System), los co-cultivos a 15-16 DIV fueron expuestos a un estímulo de campo eléctrico de 600 PA a 10Hz en presencia del anticuerpo a TA. Este estímulo fue suficiente para promover la exocitosis de las VS del pool de reciclaje [138].

## Materiales y métodos

Durante la estimulación, los cocultivos fueron mantenidos en solución extracelular basal (EBS) de pH 7,4 y osmolaridad de 290mOsm/Kg de H<sub>2</sub>O y conteniendo (en mM): 137 NaCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 D-glucosa, 5 HEPES, 0.001 glicina. Luego los cocultivos fueron dejados en reposo durante 45 con el fin de que se produzca la endocitosis compensatoria y con ella, la internalización del anticuerpo. Después de dos lavados con EBS, las células fueron fijadas en PFA 4% y montadas como se describió anteriormente, para su adquisición por microscopía confocal. A continuación, se muestra un esquema representativo de la maniobra experimental (Fig. 7).



**Fig. 7** Esquema representativo de la maniobra experimental para el marcaje del dominio luminal de la sinaptotagmina 1 (stg1). La aplicación de un estímulo eléctrico de campo promueve la exocitosis vesicular que expone el dominio luminal de la stg1 al espacio extracelular. El estímulo eléctrico se aplica en una cámara de estimulación, de fabricación casera, donde los cocultivos son mantenidos en una solución que contiene el anticuerpo específico para este dominio. Luego de 45 segundos post-estímulo, la endocitosis compensatoria permite la internalización del anticuerpo.

### Experimentos de captación de Bromuro de Etidio (BrEt)

Los cocultivos disociados de hipocampo se expusieron a una solución de BrEt (2,5  $\mu$ M, Sigma-Aldrich, Nro. de catálogo: 1239-45-8) a 15-16 DIV durante 15 min a 37°C. Durante estos minutos, fueron incubados en estufa de cultivo con 5 % CO<sub>2</sub> y 95% O<sub>2</sub>. Tras dos lavados con medio NB, las células fueron fijadas en PFA 4% y montadas como se describió anteriormente, para su adquisición por microscopía confocal.

## **Imagenología de Ca<sup>+2</sup>**

Para el marcaje del Ca<sup>+2</sup> citosólico, se utilizó el marcador fluorescente FLUO4/AM (Invitrogen; Cat: F14201) [139]. Para la preparación de marcador, cada vial de FLUO4/AM fue reconstituido en 50µl DMSO. Esto fue suficiente para preparar una solución stock de 1 µg/µl.

Los co-cultivos fueron incubados a 15-16 DIV en solución EBS conteniendo 0.01% de ácido plurónico y 1x10<sup>-3</sup>µg/µl de Fluo-4/AM. La incubación de los co-cultivos con el marcador de Ca<sup>+2</sup> se realizó en presencia de agonistas/antagonistas específicos durante 30 minutos a 37°C en estufa de cultivo con 5%CO<sub>2</sub> y 95%O<sub>2</sub>. Después de dos lavados con solución EBS, los co-cultivos fueron colocados en una cámara de fabricación casera para la adquisición de imágenes por microscopía de epifluorescencia.

## **Adquisición de imágenes**

Para la adquisición de las imágenes se utilizaron los microscopios detallados a continuación:

Microscopio confocal Zeiss, modelo AxioObserver Z1, LSM 800 (Plataforma de Microscopía Confocal del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable y del IP). Se utilizaron los láseres 488, 561 y 640 nm y el objetivo 63X, NA:1.4, inmersión en aceite. El software de adquisición fue ZEN 2.1. La resolución espacial de cada imagen fue de 1024x1024 píxeles.

Microscopio confocal espectral Leica, modelo TCS SP5 II (Plataforma de microscopía de la Facultad de Medicina, Udelar), equipado con una lámpara LED modelo pE300. Se utilizó el láser argón multilínea 488 nm y el objetivo 63X, NA:1.4, inmersión en aceite. El software de adquisición fue el LAS-AF lite. La resolución espacial de cada imagen fue de 1024x1024 píxeles.

Microscopio de fluorescencia NIKON, modelo Ti-2-e (Plataforma de Microscopía de la Facultad de Medicina, Udelar), equipado con una lámpara LED modelo pE300. Se utilizó un objetivo 20X, NA 0.5, inmersión en agua. El software de adquisición fue NIS Elements AR 5.30.05. La resolución espacial de cada imagen fue de 2048x2880 píxeles.

Microscopio de epifluorescencia Nikon, modelo Eclipse E600 (Facultad de Medicina, Udelar), equipado con cámara Kiralux de 8.9 MP modelo CS895CU, sensor de tipo CMOS y

## **Materiales y métodos**

una lámpara LED modelo pE300. Se utilizó un filtro de fluorescencia B-2A y el objetivo 40X, NA: 0.8, inmersión en agua. El software de adquisición fue ThorCam. La resolución espacial de cada imagen fue de 4096x2160 píxeles.

En todos los casos, la configuración de adquisición (Potencia del láser, potencia de la lámpara, tiempo de exposición, ganancia digital) se mantuvo constante para cada experimento independiente y fue configurada al inicio de la adquisición de las imágenes.

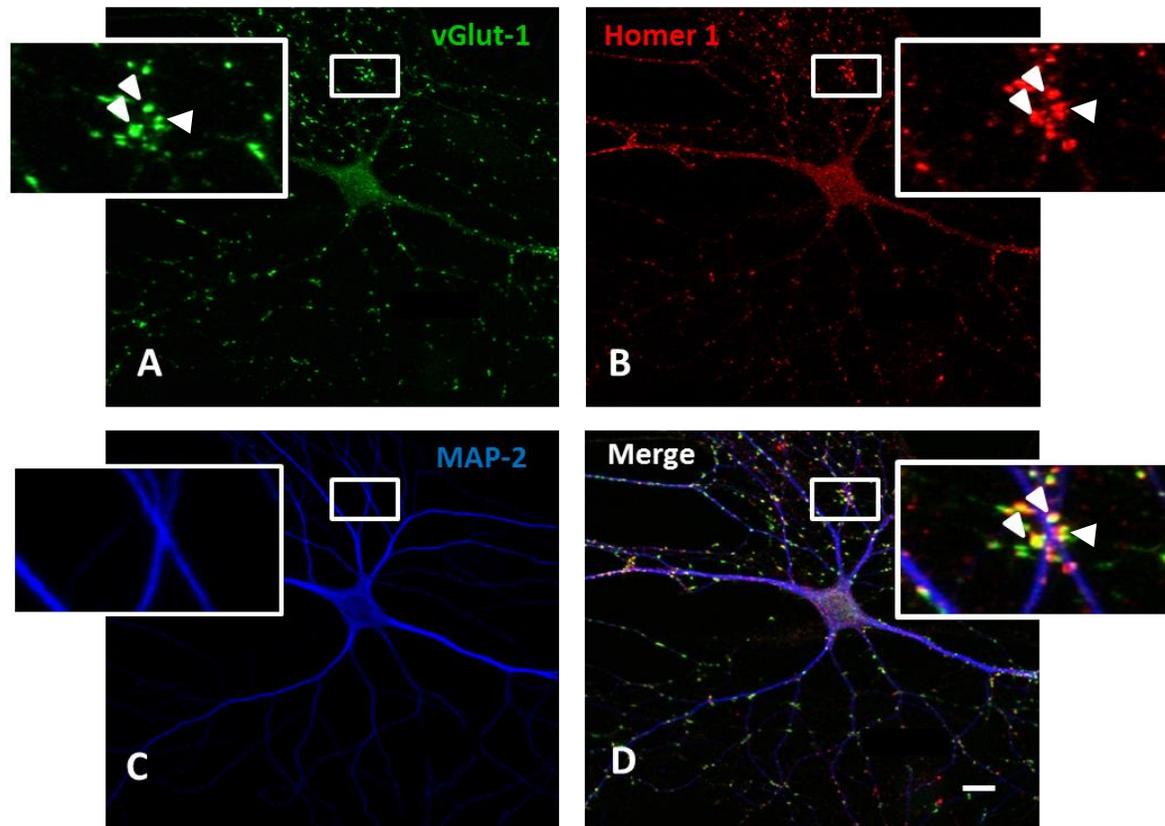
## **Análisis de imágenes**

Para el análisis de las imágenes obtenidas se utilizó el software Fiji (FijisJustImageJ) [140]

## **Inmunofluorescencia asociada al vGlut-1 sináptico**

Para la adquisición de imágenes se utilizó el microscopio confocal Zeiss descrito. Para cuantificar la fluorescencia asociada al marcador presináptico vGlut-1 se adquirieron *stacks* de imágenes confocales consecutivas a intervalos de 1  $\mu\text{m}$  y se realizaron proyecciones Z de intensidad máxima para su análisis. Se adquirieron entre 6-9 *stacks* por imagen.

Se identificaron sinapsis individuales como aquellas que presentaban colocación parcial o completa del marcador presináptico (vGlut-1) y postsináptico (Homer1) y en contacto con las dendritas de una misma neurona identificadas con el marcador MAP-2 (Fig. 8 A-C). Se cuantificó la intensidad de fluorescencia media de vGlut-1 de cada uno de los contactos sinápticos. Para ello, se seleccionaron manualmente entre 30-150 sinapsis por neurona con la herramienta *oval selection* 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. Se realizaron entre 3-4 experimentos independientes por condición experimental. Para cuantificar la densidad de contactos sinápticos por neurona, se cuantificó el número total de sinapsis individuales sobre cada dendrita a partir de una distancia de 30  $\mu\text{m}$  desde el soma celular y se promedió por neurona. Se analizó un mínimo de 7 neuronas por condición en 3 experimentos independientes.



**Fig. 8** Imágenes representativas de una neurona de co-cultivos de hipocampo de rata neonata. Se observa un triple marcaje contra vGlut-1 (A, verde), Homer1 (B, rojo), MAP-2 (C, azul) y la combinación de los diferentes canales (*merge* o combinado) (D). En la parte superior de cada imagen se observa una magnificación de la región seleccionada con un recuadro en la imagen. Las flechas en el recuadro muestran contactos sinápticos localizados sobre dendritas donde existe colocalización parcial o total del marcador vGlut-1 (presináptico) y Homer1 (postsináptico). Escala: 10 $\mu$ m

### **Inmunofluorescencia asociada al P2X7R**

Para la adquisición de las imágenes se utilizó el microscopio Zeiss. Para el análisis de la fluorescencia asociada a los P2X7R se adquirieron *stacks* de imágenes confocales consecutivas a intervalos de 1  $\mu$ m y se realizaron proyecciones en Z de intensidad máxima para su análisis. Se adquirieron entre 6-9 *stacks* por imagen.

Se cuantificó la fluorescencia de las regiones en las que el marcador P2X7R co-localiza de forma parcial o completa con el marcador presináptico sinapsina-1 (Syn-1). Para detectar estas regiones, se utilizó el plugin de FIJI Trainable Weka Segmentation (TWS), una herramienta de aprendizaje automático que aprovecha un número limitado de anotaciones

## ***Materiales y métodos***

manuales con el fin de entrenar a un clasificador y segmentar los datos restantes automáticamente [141]. El TWS se ejecutó con los siguientes sets de filtros: mínimo, máximo, media, mediana, varianza, entropía y tensor de estructura. Para construir el clasificador se tomó un subgrupo de imágenes representativas de las diferentes condiciones experimentales a evaluar. Con este subgrupo de imágenes se realizó un *stack*, utilizado para entrenar un clasificador capaz de segmentar la imagen en dos clases de píxeles: la primera, correspondiente a las regiones en las que se observa inmunomarcaje contra los P2X7R y la segunda, a todas las estructuras que no se corresponden con la anterior y que consideramos como *background*. Una vez construido el clasificador, el mismo fue utilizado para llevar a cabo el análisis completo de todas las condiciones experimentales. Al aplicar el clasificador sobre cada imagen se obtuvo una imagen segmentada. Dicha imagen se convirtió a 8 bits y se binarizó en los valores de 0 y 255. Sobre esta imagen se realizó, posteriormente, un análisis de partículas para detectar aquellas regiones cuyo valor fuera de 255, con un tamaño superior a 5 píxeles. Se obtuvo una tabla de ROIs correspondientes a los P2X7R. A partir de esta tabla, se cuantificó el número de puntos inmunomarcados en condiciones control y en presencia de TTX (1µM, 24h-36). La densidad de P2X7R presináptico se cuantificó contando el número de puntos dentro de los primeros 30 µm desde el soma y se promedió por neurona. También se cuantificó la densidad integrada y el área asociada a las regiones P2X7R+ en un mínimo de 6 neuronas por condición. Se realizaron 3 experimentos independientes y se promedió por cada condición experimental.

Para evaluar la localización celular de los P2X7R (neuronal y/o glial), se analizó la colocalización del marcador de P2X7R con el marcador glial GFAP-Cy3 y con el marcador neuronal MAP-2 en condiciones control.

Además, se evaluó la localización neuronal (pre y/o postsináptica) de los P2X7R mediante el análisis de la colocalización del marcador de P2X7R con el marcador presináptico syn-1 y el marcador postsináptico Homer-1 por neurona, identificada con el marcador MAP-2. Para la obtención de las imágenes de microscopía confocal se realizaron aleatoriamente *zoom in* en regiones donde existía una colocalización total o parcial de P2X7R con el marcador pre o postsináptico, por neurona. En estas regiones, se adquirieron *stacks* de imágenes, como se

## **Materiales y métodos**

describió al inicio de este apartado. Se realizó una deconvolución de estas imágenes, necesaria para la restauración del contraste y se seleccionaron manualmente las ROIs P2X7R+. El estudio de la colocalización se llevó a cabo mediante el uso del *plugin JacoP* del *software* de análisis de imágenes Fiji y se seleccionó el análisis de los coeficientes de Mander (M1 y M2) [142]. Estos determinan el grado de superposición entre píxeles correspondientes a P2X7R con el marcador pre y postsináptico y varían entre 0 y 1, donde un valor de 0 indicó ausencia de colocalización y un valor de 1, colocalización completa. M1 nos permitió cuantificar el grado de superposición de los P2X7R con Syn-1 o Homer-1 definiéndose a estos coeficientes como M1 pre y postsinápticos, respectivamente. El coeficiente M2 permitió establecer la relación opuesta.

### **Inmunofluorescencia asociada a Stg1**

Para la adquisición de imágenes, se utilizó el microscopio confocal Zeiss. Para el análisis de la fluorescencia asociada a Stg1 se adquirieron *stacks* de imágenes confocales consecutivas a intervalos de 1  $\mu\text{m}$  y se realizaron proyecciones de Z de intensidad máxima para su análisis. Se adquirieron entre 6-9 *stacks* por imagen.

Se identificaron sinapsis individuales como aquellas en las que el marcador de Stg1 estaba en contacto con las dendritas de una misma neurona, identificada con el marcador MAP-2. Se seleccionaron manualmente entre 150-180 regiones Stg1+ por neurona con la herramienta *oval selection* y se promedió por neurona. Se analizó un mínimo de 8 neuronas por condición y se sustrajo la señal del fondo en cada imagen en 3 experimentos independientes promediando la intensidad de fluorescencia de regiones sin marcaje.

### **Fluorescencia asociada a BrEt**

Para la adquisición de las imágenes, se utilizó el microscopio confocal Leica. Para el análisis de la fluorescencia asociada a la captación de BrEt se adquirieron *stacks* de imágenes confocales consecutivas a intervalos de 1  $\mu\text{m}$  y se realizaron proyecciones de Z de intensidad máxima para su análisis. Se adquirieron entre 6-9 *stacks* por imagen.

Se delimitaron los somas neuronales utilizando la herramienta *FreeHand Selection* del *software* Fiji. Se cuantificó la densidad integrada asociada a estas regiones en un total de 3

## **Materiales y métodos**

experimentos independientes y se sustrajo la señal del fondo en cada imagen promediando la intensidad de fluorescencia de regiones sin marcaje.

### **Fluorescencia asociada al $\text{Ca}^{+2}$ neuronal**

Para la adquisición de imágenes, se utilizó el microscopio de epifluorescencia Nikon, modelo Eclipse E 600. Para cuantificar la señal asociada al FLUO-4/AM se adquirió una imagen por campo. Todas las imágenes se tomaron siguiendo el mismo patrón, escaneando manualmente todo el cubreobjeto siguiendo los ejes X e Y. Se seleccionaron manualmente los somas neuronales con la herramienta “*frehand line*” de *Fiji*. De esta manera se delimitaron los ROIs y se promedió la densidad integrada de la fluorescencia de estas regiones.

### **Análisis de supervivencia neuronal**

Para la adquisición de imágenes se utilizó el microscopio de fluorescencia Nikon, modelo Ti-2-e. Se adquirió una imagen por campo ( $1 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ ) y se usaron 10 campos en total por cubreobjetos. Todas las imágenes se tomaron siguiendo el mismo patrón, haciendo una cruz y colocando su centro en el centro del cubreobjetos. Se promedió el número de neuronas positivas para MAP-2 contadas en todos los campos adquiridos y la distribución se muestra en los gráficos. Se realizaron dos experimentos independientes y se analizaron dos cubreobjetos por experimento para cada condición.

### **Cuantificación del ATP extracelular**

Para evaluar cambios en los niveles de ATP extracelular, se realizó un ensayo bioluminiscente para la determinación cuantitativa de ATP con luciferasa y su sustrato D-luciferina (InvitrogenTM; cat. A22066). Se siguió el protocolo de la empresa para la preparación de una solución estándar de luciferina-luciferasa.

Así, se tomaron tres muestras de medio de cultivo de cada condición experimental a 15-16 DIV y se agregaron a una placa de 96 pocillos de estructura superior blanca y fondo transparente plano que contenía la solución estándar de luciferina-luciferasa. Cada muestra

## **Materiales y métodos**

se agregó a un pocillo individual. Los valores de luminiscencia fueron obtenidos usando un luminómetro Lumsistar Galaxy de BMG Tech y promediados.

La luminiscencia media de dos pocillos conteniendo solución *standard* y medio de cultivo fue utilizada para determinar el valor máximo esperado en ausencia de ATP. La media de estos dos pocillos fue utilizada como *background* de la señal. Finalmente se sustrajo este valor a la media de fluorescencia de las diferentes condiciones experimentales en 4 experimentos independientes.

## **Análisis estadístico**

Todos los datos experimentales se analizaron utilizando GraphPad Prism8 (*California Corporation*). Se analizó la distribución normal (pruebas de Kolmogorov-Smirnov o Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianza (prueba de Bartlett). Si los datos cumplían con esos requisitos, se analizaban mediante el uso de test paramétricos (prueba *t de Student*) y ANOVA seguido de Tukey's test y se expresaban como media  $\pm$  SEM. En caso de que los datos no cumplieran con esos requisitos, se aplicaba la prueba no paramétrica de Mann-Whitney U. En este caso, los datos se muestran como la mediana (IQR). Para los diferentes experimentos, comparamos el grupo control con los datos de cada grupo experimental. La prueba estadística utilizada para cada experimento se indica junto al resultado correspondiente en el texto y/o en los pies de figuras. Se consideró significancia estadística para  $p < 0.05$ . En las figuras, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ , ns; estadísticamente no significativo.

## **Resultados**

### **El ajuste homeostático de la función presináptica se corresponde con un aumento en la abundancia de vGlut-1 sináptico**

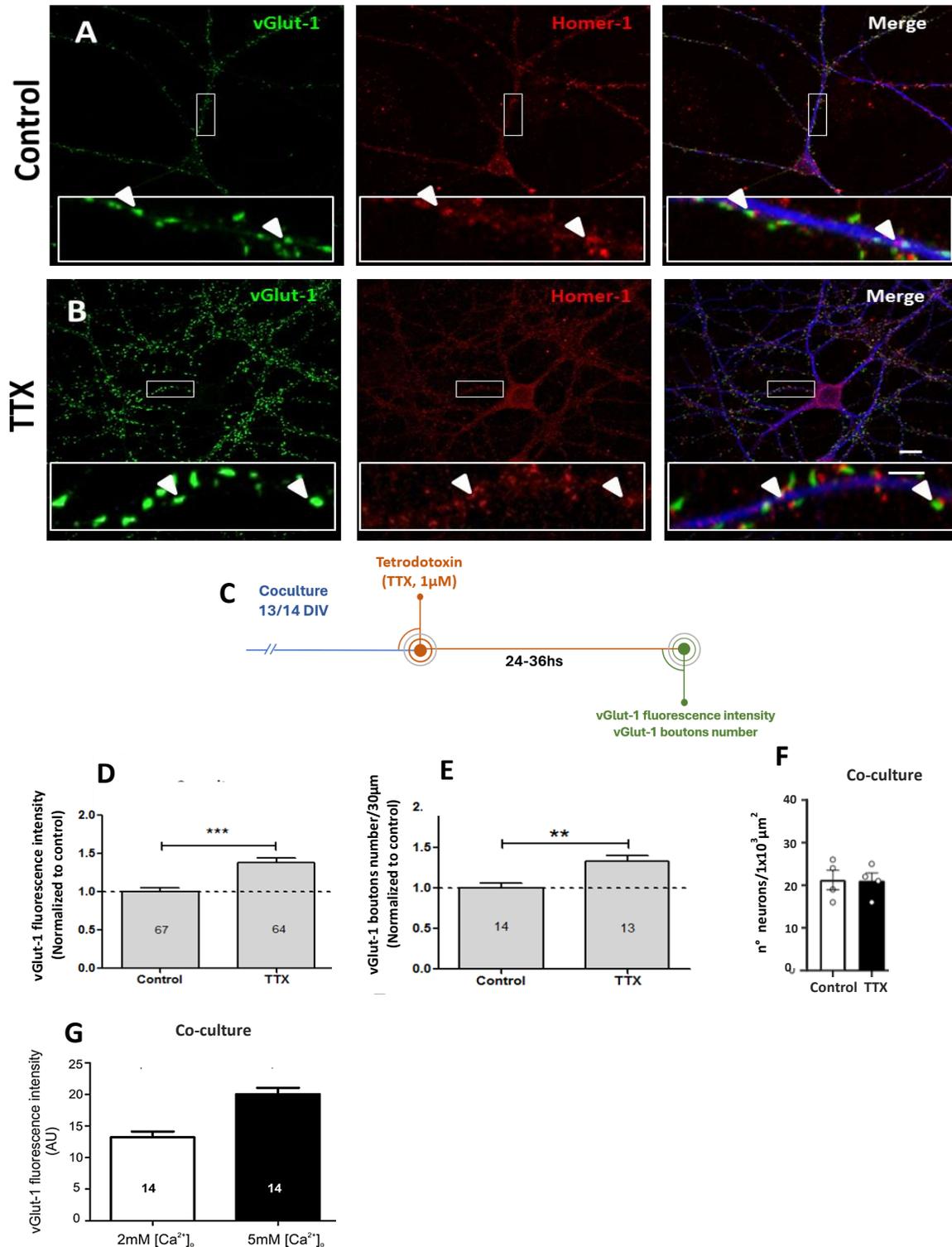
Para determinar si el análisis por inmunofluorescencia de vGlut-1 es lo suficientemente sensible para estimar cambios en la función presináptica, se evaluó la abundancia de este marcador en condiciones control y frente a dos condiciones experimentales que incrementan la Pr: a) el bloqueo crónico de la actividad sináptica y b) incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular

Así, se cuantificó la intensidad de la fluorescencia media asociada a vGlut-1 en sinapsis individuales en co-cultivos de neuronas/glia tratados con TTX ( $1\mu\text{M}$ ; 24-36h) a 14-15 DIV (**Fig. 9 B, C**). Este tratamiento es un paradigma experimental ampliamente utilizado para promover el bloqueo de la actividad neuronal e inducir mecanismos de PSH [143]. Por otro lado, co-cultivos no tratados se emplearon como control de la función sináptica basal (**Fig. 9 A**). Las neuronas tratadas con TTX mostraron un incremento significativo en la abundancia de vGlut-1 sináptico, en comparación con los co-cultivos control (Control  $1.00 \pm 0.04$ ; TTX  $1.38 \pm 0.05$ ;  $***p < 0.001$ ) (**Fig. 9 D**). Además, se evaluó la cantidad de contactos sinápticos vGlut-1 positivos por neurona, observándose que, en condiciones de inactividad crónica los co-cultivos presentaron un incremento en el número de sinapsis excitadoras (Control  $1.00 \pm 0.06$ ; TTX  $1.33 \pm 0.08$ ;  $*P < 0.05$ ) (**Fig. 9 E**). Teniendo en cuenta que la densidad de contactos sinápticos podría verse afectada por diferencias en el número de neuronas presentes en las diferentes condiciones experimentales, analizamos el impacto de la supresión crónica de la actividad del circuito en la supervivencia neuronal. Así, evidenciamos que el tratamiento con TTX no afectó la supervivencia neuronal (número de neuronas/campo: Control:  $33.59 \pm 3.87$ , TTX  $34.00 \pm 2.20$ ) (**Fig. 9 F**).

Por otra parte, teniendo en cuenta la correlación directa que existe entre la concentración de  $\text{Ca}^{+2}$  extracelular y la Pr [25, 144], analizamos la fluorescencia asociada a vGlut-1 en co-cultivos control e incubados en solución extracelular conteniendo 2 o 5mM de  $\text{Ca}^{+2}$ . Los

resultados obtenidos muestran un aumento significativo de la fluorescencia asociada al vGlut-1 sináptico en co-cultivos expuestos a una solución 5mM de  $\text{Ca}^{+2}$  respecto a los co-cultivos expuestos a una solución 2mM  $\text{Ca}^{+2}$ . (Control 2mM  $\text{Ca}^{+2}$ :  $13.22 \pm 0.91$ , Control 5mM  $\text{Ca}^{+2}$ :  $22.38 \pm 2.11$ ;  $P < 0.001$ . **Fig. 9 G**). Además, en ambas condiciones, los co-cultivos tratados con TTX muestran un incremento significativo en la fluorescencia asociada a este marcador respecto a su condición control.

En conjunto, estos resultados sugieren que la inmunofluorescencia asociada a vGlut-1 es una herramienta lo suficientemente sensible para estimar cambios en la función presináptica luego de un período de inactividad prolongado.



**Fig. 9** Frente al bloqueo crónico de la actividad sináptica y al aumento del calcio extracelular se produce un aumento de la función presináptica. Imágenes de microscopía confocal representativas de co-cultivos neurona/glia de hipocampo control (sin tratamiento) (A) y tratados con TTX (1 $\mu$ M, 24-36h) (B). Se realizó un triple marcaje contra vGlut-1 (verde), Homer1 (rojo) y MAP-2 (azul). En cada imagen se observa una

magnificación de la región seleccionada con un recuadro. Escala 10 $\mu$ m. Magnificación: 5 $\mu$ m. Las flechas muestran contactos sinápticos donde existe colocalización parcial o total del marcador vGlut-1 y Homer1. **C)** Estrategia experimental utilizada para el análisis de vGlut-1. Gráficos de barras que muestran el resumen de la intensidad de fluorescencia asociada a vGlut-1 sináptico **(D)**. Gráficos de barras que muestran la densidad de sinapsis cuantificadas por neurona **(E)**. Gráficos de barras que muestran el número promedio de neuronas en 1x10<sup>3</sup>  $\mu$ m<sup>2</sup> **(F)** Gráficos de barras que muestran el resumen de la intensidad de fluorescencia asociada a vGlut-1 sináptico a 2 o 5 mM [Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub> **(G)**. El número total de neuronas analizadas para cada condición se presenta dentro del gráfico de barras. Los datos se normalizaron en relación a cultivos control y se expresan como media  $\pm$  SEM. \*\*\*p<0.001, \*\*p<0.01. Two-tailed Student's t-test. [1, 2].

## El ATP es necesario para la inducción/mantenimiento de la PSH

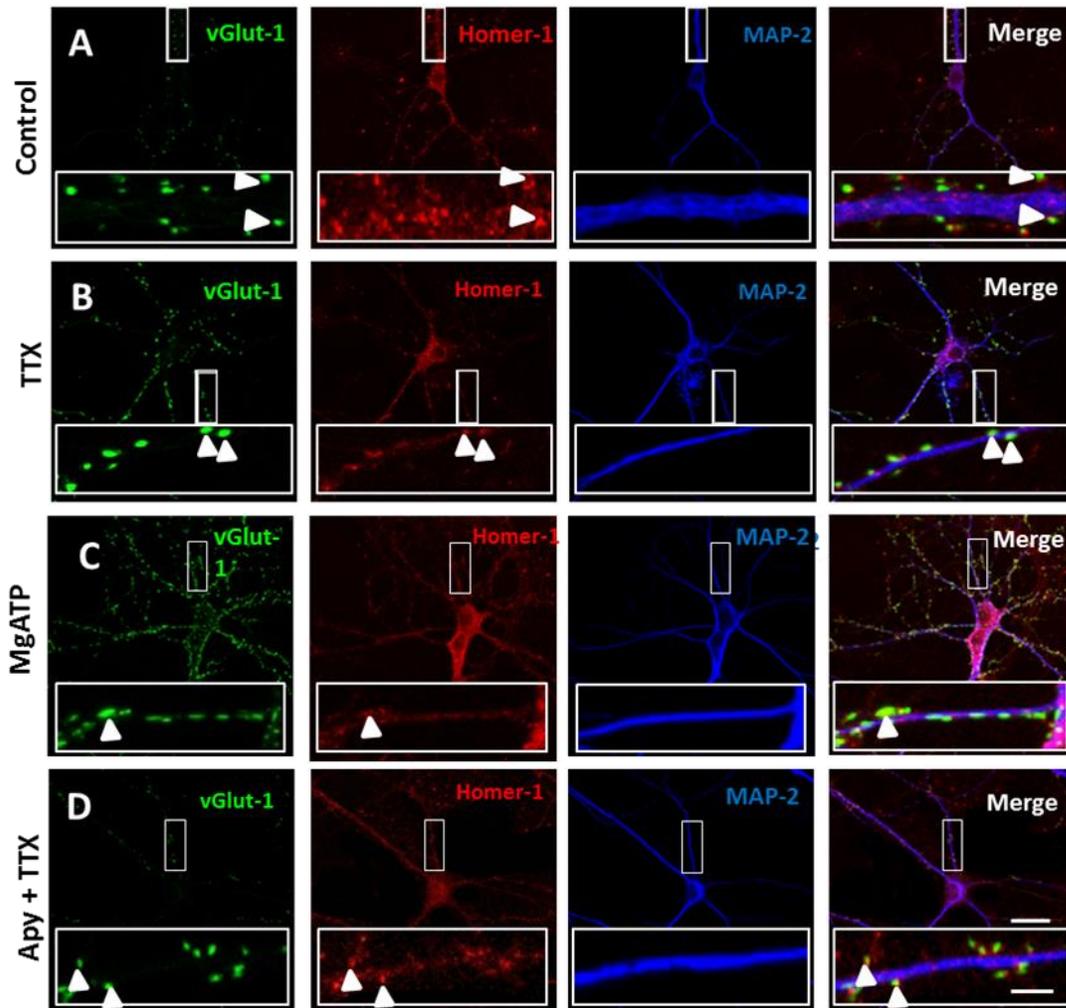
Numerosos autores han caracterizado el rol fundamental del ATP como neuromodulador de la transmisión sináptica basal y de la plasticidad sináptica [111, 145, 146]. Para analizar si el ATP es responsable de modular la inducción y/o el mantenimiento de la PSH, se modificaron los niveles de ATP extracelular mediante el agregado de ATP exógeno (MgATP: agonista de receptores P2: 500 $\mu$ M, 24-36hs; **Fig. 10 C, F**) en cultivos control (**Fig. 10 A**). Por otra parte, se redujeron los niveles del ATP extracelular mediante el agregado de apirasa, una enzima que degrada el ATP (Apy; 5U/ $\mu$ L; 24-36hs;) 15 minutos antes y durante el tratamiento con TTX (**Fig. 10 D, E**). Los resultados obtenidos fueron comparados a condiciones control y frente a la inducción de PSH (TTX; 1 $\mu$ M; 24-36 hs; **Fig. 10 B**). Los cambios en la función presináptica se estimaron mediante el análisis de la abundancia y densidad de vGlut-1 sináptico por inmunocitoquímica, dos parámetros que, como vimos en el apartado anterior, se incrementan frente a la inactividad crónica.

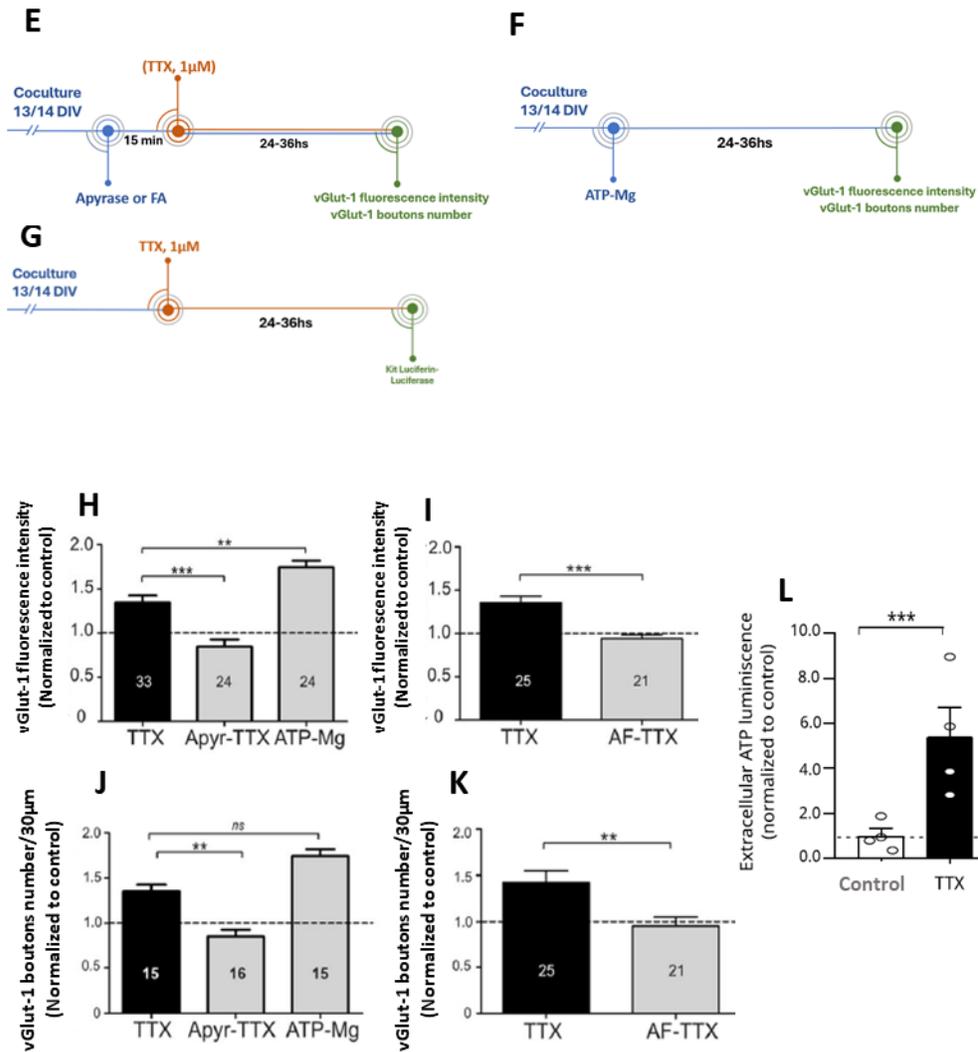
Observamos que los co-cultivos tratados con MgATP incrementan significativamente la abundancia de vGlut-1 sináptico respecto a los co-cultivos control (Control 1.00 $\pm$ 0.05; MgATP 1.74 $\pm$ 0.07; \*\*\*p<0.001; **Fig. 10 H**). Además, se observó un aumento en la densidad de contactos sinápticos en los co-cultivos tratados con MgATP respecto a los co-cultivos control (Control 0.94  $\pm$  0.12; MgATP 2.04  $\pm$  0.13; \*\*\*p<0.001; **Fig. 10 J**). Por el contrario, la hidrólisis del ATP extracelular mediante el tratamiento con Apirasa previno el incremento homeostático de la abundancia y densidad de vGlut-1 característicos de la PSH (Apy-TTX 0.78  $\pm$  0.08; TTX 1.20  $\pm$  0.07; control 1.00  $\pm$  0.06; P < 0.01; **Fig. 10 H, J**). En conjunto, estos resultados resaltan el papel fundamental del ATP en la inducción/mantenimiento de la PSH.

Sin embargo, la confirmación de la importancia de este nucleótido en el ajuste homeostático de la función presináptica se logró mediante modificaciones farmacológicas de los niveles de ATP extracelular. Por ello, resultó central para nuestro trabajo analizar si los niveles de ATP extracelular endógeno cambiaban en respuesta al bloqueo crónico de la actividad neuronal. Para investigar esta posibilidad, se llevó adelante un ensayo bioluminiscente para la determinación cuantitativa de ATP, basado en el requerimiento de ATP por parte de la enzima D-Luciferasa para la emisión de luz. Así, se cuantificaron los niveles de ATP extracelular en muestras de medio obtenidas a partir de co-cultivos control y tratados con TTX (1  $\mu$ M; 24-36hs, **Fig. 10 G**). Se evidenció que la luminiscencia asociada a los niveles extracelulares de ATP en cocultivos tratados con TTX aumentó significativamente respecto a lo observado en los co-cultivos control (UT  $1.09 \pm 0.38$ , TTX  $4.70 \pm 1.05$ ,  $t = 3.11$ ,  $P < 0.001$  (**Fig. 10 L**). Este resultado sugiere que durante la inducción/mantenimiento de la PSH, aumenta la disponibilidad de ATP en el medio extracelular.

Luego de confirmar la relevancia de este nucleótido en la inducción/mantenimiento de la PSH, y teniendo en cuenta que estos resultados fueron obtenidos en un modelo *in vitro* de co-cultivo neuro-glial, nos propusimos determinar el origen celular de este nucleótido. Con el antecedente de resultados publicados en la Tesis de Maestría de las MSc. Marina Tizzoni y Andrea Cairus que confirman que tanto las células gliales como factores solubles liberados por estas células juegan un papel central en el ajuste homeostático de la eficacia presináptica [1, 90], analizamos si el ATP que participa en la inducción/mantenimiento de la PSH es liberado por las células gliales. Para esto, se analizó la densidad y fluorescencia asociada a vGlut-1 en co-cultivos de hipocampo tratados con ácido fluorocítrico (AF; 1  $\mu$ M, 24-36hs.), un inhibidor selectivo del ciclo de Krebs glial [147, 148], 15 minutos antes y durante el tratamiento con TTX (1  $\mu$ M, 24-36hs, **Fig. 10 E**). Mientras que el tratamiento con TTX aumentó la intensidad y densidad de la fluorescencia sináptica asociada a vGlut-1 en relación a los co-cultivos control, el tratamiento con FA durante la inactividad crónica neuronal previno dicho aumento (intensidad de fluorescencia de vGlut-1: control  $1.01 \pm 0.05$ ; TTX  $1.36 \pm 0.07$ ; AF-TTX,  $0.94 \pm 0.04$ ;  $P < 0.001$ ; densidad de vGlut-1: control  $0.98 \pm 0.09$ ; TTX  $1.42 \pm 0.13$ ; AF-TTX  $0.95 \pm 0.10$ ;  $P < 0.01$ , **Fig. 10 I, K**). Estos resultados sugieren que la

inhibición metabólica glial previene el ajuste homeostático de la fuerza presináptica dependiente de la actividad. Una posibilidad, es que, en estas condiciones, las células gliales produzcan menores cantidades del ATP necesario para dicho ajuste.





**Fig. 10** Frente al bloqueo crónico de la actividad neuronal, se produce un incremento en la disponibilidad de ATP extracelular. Imágenes de microscopía confocal representativas de co-cultivos neurona/glia de hipocampo control (sin tratamiento) (A) y tratados con TTX (1μM, 24hs-36hs) (B), MgATP (500μM) (C) y Apirasa (Apy, 5U/μL) (D). Este último tratamiento se realizó 15 min antes y durante el tratamiento con TTX. Se realizó un triple marcaje contra vGlut-1 (verde), Homer1 (rojo) y MAP-2 (azul). En cada imagen se observa una magnificación de la región seleccionada con un recuadro. Escala: 10μm. Magnificación: 5μm. Las flechas muestran contactos sinápticos donde existe colocalización parcial o total del marcador vGlut-1 y Homer1. Estrategia experimental utilizada para el análisis de vGlut-1 (E, F) y los niveles de ATP en muestras de medio de cultivos (G). Gráficos de barras que muestran el resumen de la intensidad de fluorescencia asociada a vGlut-1 sináptico y la densidad sinapsis (H, J respectivamente) en co-cultivos control, tratados con TTX, Apirasa/TTX

y MgATP. Gráficos de barras que muestran la fluorescencia asociada a vGlut-1 y densidad de sinapsis cuantificadas por neurona (**I, K respectivamente**) en co-cultivos control, tratados con TTX y AF/TTX. Gráfica de barras que muestran la media de luminiscencia determinadas por el ensayo bioluminiscente para la determinación cuantitativa de ATP con Luciferasa y su sustrato D-luciferina (**L**). Los datos se normalizaron en relación a cultivos control y se expresan como media  $\pm$  SEM. \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , ns: estadísticamente no significativo. Two-tailed Student's t-test; One way ANOVA seguido de Tukey's test [1, 2].

### **El aumento homeostático de la función presináptica requiere la activación de receptores del tipo P2X7 presinápticos**

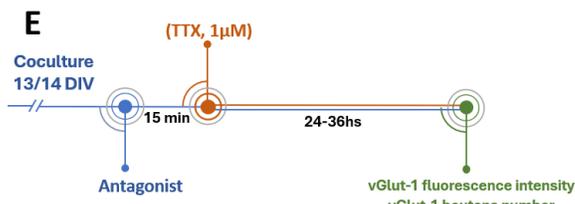
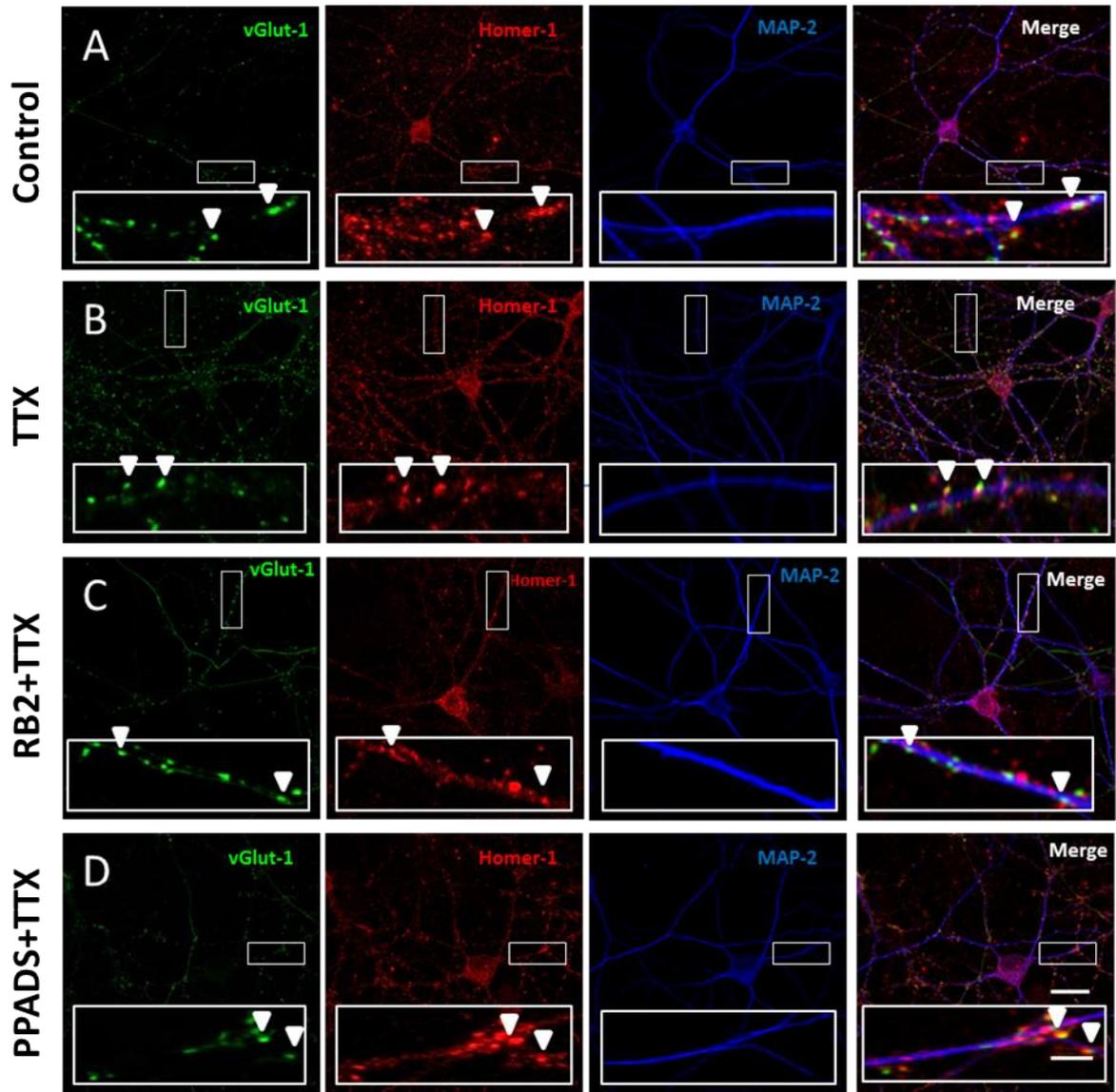
Numerosos autores sugieren que el ATP tiene efectos neuromoduladores bifásicos: un efecto inhibitorio a través de la activación de los receptores purinérgicos metabotrópicos del tipo P2Y (P2YR) y un efecto facilitador a través de la activación de los receptores purinérgicos ionotrópicos del tipo P2X (P2XR) [87, 90, 149].

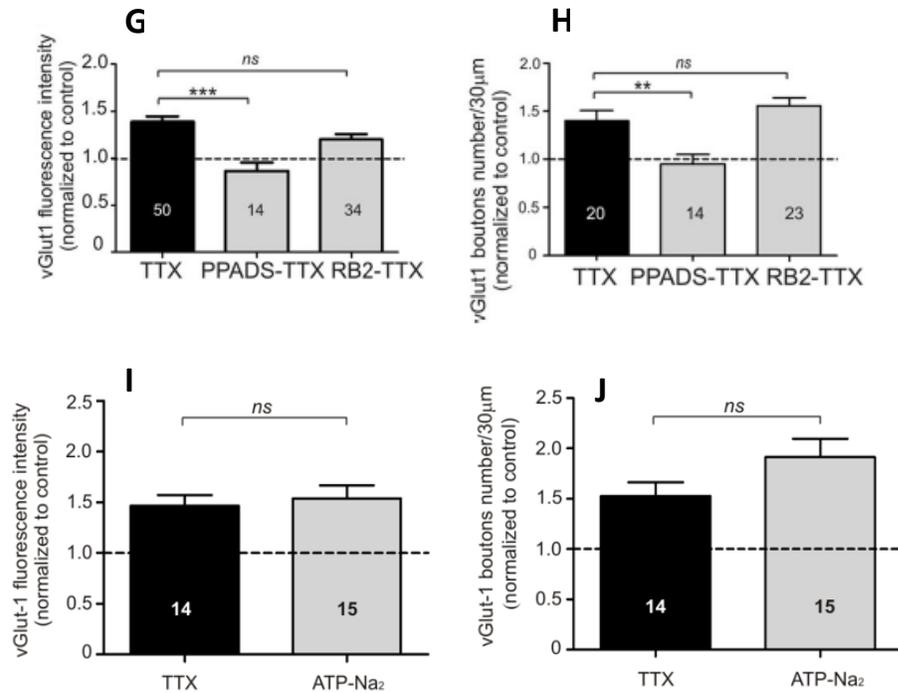
Basados en nuestros resultados que indican que el ATP juega un rol clave en la modulación de la PSH, analizamos las posibles vías de señalización purinérgica implicadas. Así, se analizó la abundancia y densidad de vGlut-1 sináptico en co-cultivos tratados con RB2 (Reactive Blue 2; 50 $\mu$ M; 24-36hs; **Fig. 11 C, E**) que actúa como antagonista de P2YR y con PPADS (pyridoxal phosphate-6-azophenyl-2-4-disulphonic; 30  $\mu$ M; 24-36hs; **Fig. 11 D, E**), un antagonista de los P2XR. Ambos tratamientos fueron realizados 15 min antes y durante el tratamiento con TTX (1 $\mu$ M; 24-36hs). Se utilizaron, además, co-cultivos tratados con TTX (1 $\mu$ M; 24-36 hs; **Fig. 11 B**) y sin tratar (**Fig. 11 A**).

Así, se observó un incremento estadísticamente significativo en la abundancia y densidad de vGlut-1 sináptico en los co-cultivos tratados con RB2-TTX respecto a los co-cultivos control. Por otra parte, en los co-cultivos tratados con PPADS-TTX se previno el incremento en la abundancia y densidad de vGlut1 (intensidad de vGlut-1 sináptico: Control  $1.01 \pm 0.05$ ; TTX

1.39 ± 0.06; RB2-TTX 1.20 ± 0.06; PPADS-TTX 0.87 ± 0.06; P < 0.01; Densidad de vGlut-1 sináptico: Control 1.04 ± 0.06; TTX 1.40 ± 0.10; RB2-TTX 1.56 ± 0.08; PPADS-TTX 0.95 ± 0.10; P < 0.01) (**Fig. 11 G, H**). En conjunto, estos resultados sugieren que el ATP modula el aumento homeostático de la función presináptica actuando a través de los P2XR, mientras que los P2YR son dispensables en este proceso.

Teniendo en cuenta que estudios recientes muestran que el Mg<sup>2+</sup> bloquea los P2XR [90, 150], fue necesario re-evaluar el rol del ATP en la PSH ya que parte de ese resultado fue confirmado al aumentar los niveles extracelulares de este nucleótido mediante la administración de MgATP. Para confirmar el papel del ATP en la regulación de la fuerza sináptica dependiente los P2XR, aplicamos ATP disódico (ATP-Na<sub>2</sub>; 500 μM, 24-36hs). Al igual que lo observado con el MgATP, el ATP-Na<sub>2</sub> provocó un aumento en la abundancia sináptica (de 1,01 ± 0,08 control a 1,54 ± 0,13 ATP-Na<sub>2</sub>; P <0,001;) y la densidad de vGlut-1 (de 0,99 ± 0,09 control a 1,91 ± 0,18 ATP-Na<sub>2</sub>; P <0,001) en relación con los cultivos no tratados, imitando el efecto del tratamiento crónico con TTX (**Fig. 11 F, I, J**)





**Fig. 11 El aumento homeostático de la función presináptica requiere la activación de receptores purinérgicos ionotrópicos del tipo P2X.** Imágenes de microscopía confocal representativas de co-cultivos neurona/glia de hipocampo control (sin tratamiento) (A) y tratados con TTX (1 µM, 24hs-36hs) (B); RB2 (50 mM, 24-36hs) (C) y PPADS (30 mM) (D). Se realizó un triple marcaje contra vGlut-1 (verde), Homer1 (rojo) y MAP-2 (azul). En cada imagen se observa una magnificación de la región seleccionada con un recuadro. Escala 20µm. Magnificación: 5µm. Las flechas muestran contactos sinápticos donde existe colocalización parcial o total del marcador vGlut-1 y Homer1. Estrategia experimental utilizada para el análisis de vGlut-1 (E, F). Gráficos de barras que muestran el resumen de la intensidad de fluorescencia asociada a vGlut-1 sináptico (G, H) y la densidad de sinapsis cuantificadas por neurona (I, J). En I, J se analizaron estos parámetros en cocultivos tratados con la sal de disodio-ATP (500 µM, 24-36hs, ATP-Na<sub>2</sub>) El número total de neuronas analizadas para cada condición en 3-4 experimentos independientes se presenta dentro del gráfico de barras. Los datos se normalizaron en relación a cultivos control y se expresan como media ± SEM. \*\*\*p<0.001. P<\*\*\*0.01. ns: No significativo. Two-tailed Student's t-test; One way ANOVA seguido de Tukey's test [1].

Numerosos autores reportaron que, dentro de los P2XR, el receptor P2X7 (P2X7R) participa en la modulación de la transmisión sináptica [98, 103, 151]. Considerando que el ajuste de la eficiencia presináptica requiere un aumento en los niveles extracelulares de ATP y que los receptores P2X7R tienen baja afinidad por este nucleótido, nos propusimos determinar si

este subtipo de receptor mediaba el ajuste de la fuerza presináptica dependiente de la actividad.

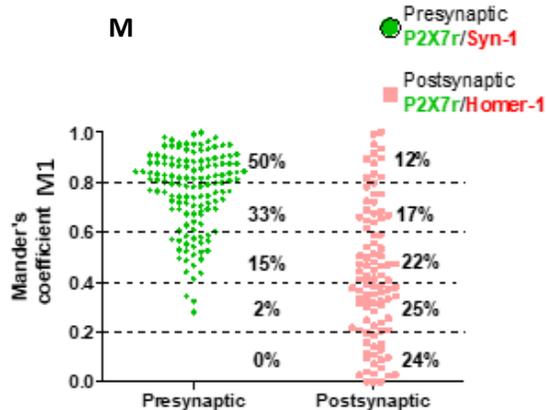
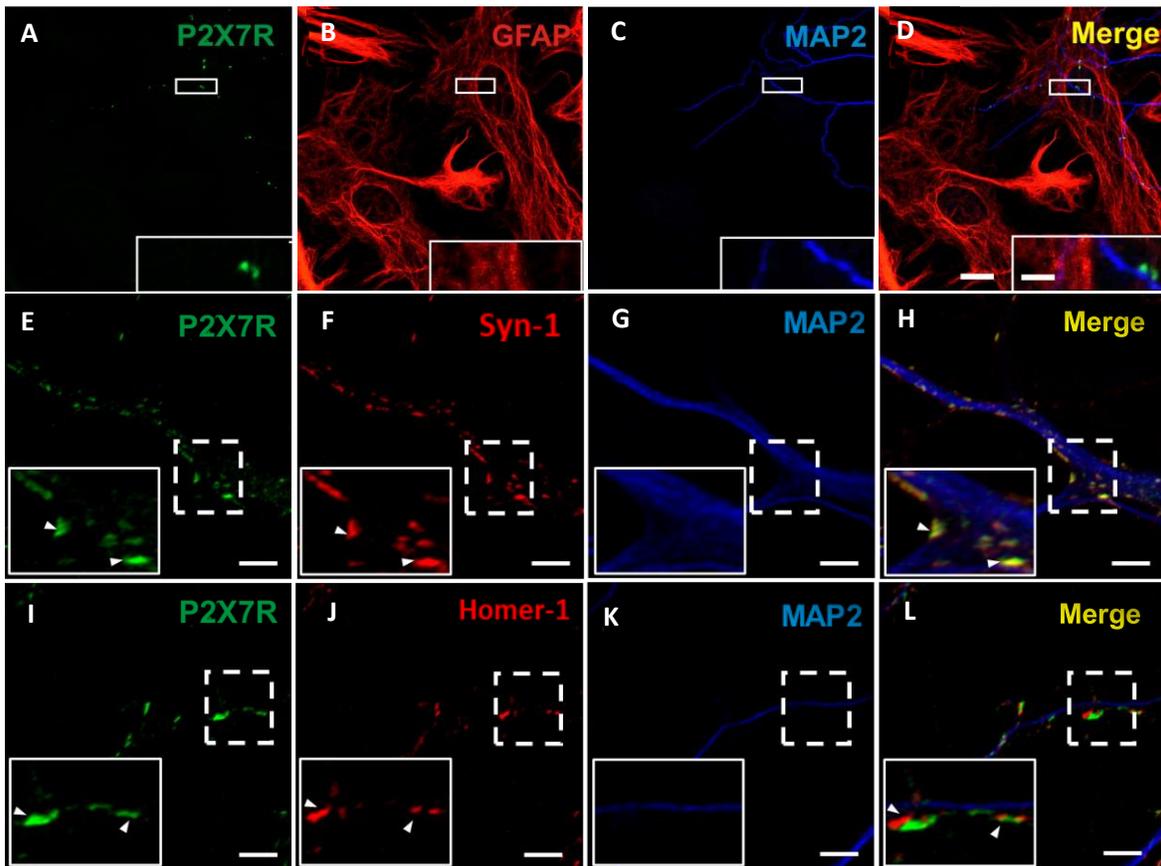
En primer lugar, analizamos la expresión de estos receptores en nuestros co-cultivos por inmunocitoquímica contra los P2X7R (**Fig. 12 A**), el marcador específico astrocitario GFAP (**Fig. 12 B**) y el marcador neuronal MAP-2 (**Fig. 12 C**). Sorprendentemente, observamos que los P2X7R colocalizan exclusivamente con células MAP-2 positivas, no observándose regiones de colocalización entre P2X7R/GFAP. Estos resultados sugieren que, en nuestro modelo experimental, los P2X7R se expresan preferentemente en neuronas (**Fig. 12 D**).

Luego de confirmar la presencia de estos receptores a nivel neuronal, analizamos su expresión en las terminales pre y/o postsinápticas. Para ello, realizamos inmunocitoquímica contra los P2X7R (**Fig. 12 E, I**) y analizamos la colocalización de estos receptores con marcadores presinápticos (Sinapsina-1, Syn-1; **Fig. 12 F**) y postsinápticos (Homer-1; **Fig. 12 J**) en neuronas individuales (MAP-2-positivas; **Fig. 12 G, K**). Mediante una apreciación cualitativa de las imágenes obtenidas observamos que una gran proporción de contactos inmunorreactivos para P2X7R colocalizan con Syn-1. Sin embargo, esta colocalización no es tan evidente con los marcadores postsinápticos (**Fig. 12 H, L**). Este resultado sugiere que los P2X7R se localizan preferentemente en la terminal presináptica.

Para profundizar en el análisis de la localización de los P2X7R cuantificamos la colocalización de P2X7R con marcadores pre y postsináptico mediante el análisis del coeficiente de Mander (Para más detalle, ver el apartado de “Inmunofluorescencia asociada a los P2X7R” en Materiales y Métodos). Dado que nuestro interés está focalizado en determinar la localización de la población de los P2X7R en las terminales pre y postsinápticas, centramos nuestro estudio en la interpretación de M1 y excluimos de este análisis a M2.

El estudio cuantitativo coincidió con la apreciación cualitativa, mostrando que de 135 regiones inmunorreactivas para P2X7R que colocalizan con Syn-1, el 83% muestran un alto grado de colocalización ( $M1=0.6-1$ ). Además, no se detectaron P2X7R que no colocalicen con el marcador presináptico. Por otra parte, a nivel postsináptico, detectamos que un 71%

de los P2X7R presentan un bajo grado de colocalización con homer-1 ( $M1=0-0.6$ ). Estos resultados sugieren que los P2X7R están preferentemente expresados en la terminal presináptica, mientras que una pequeña población podría estarlo a nivel postsináptico (**Fig. 12 M**).

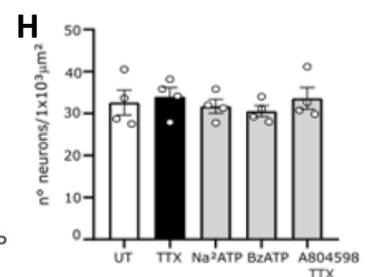
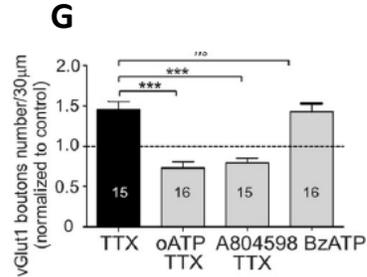
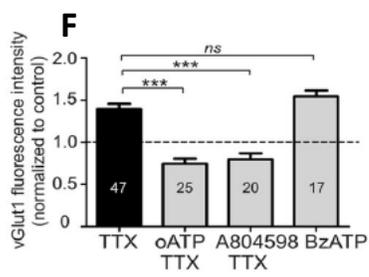
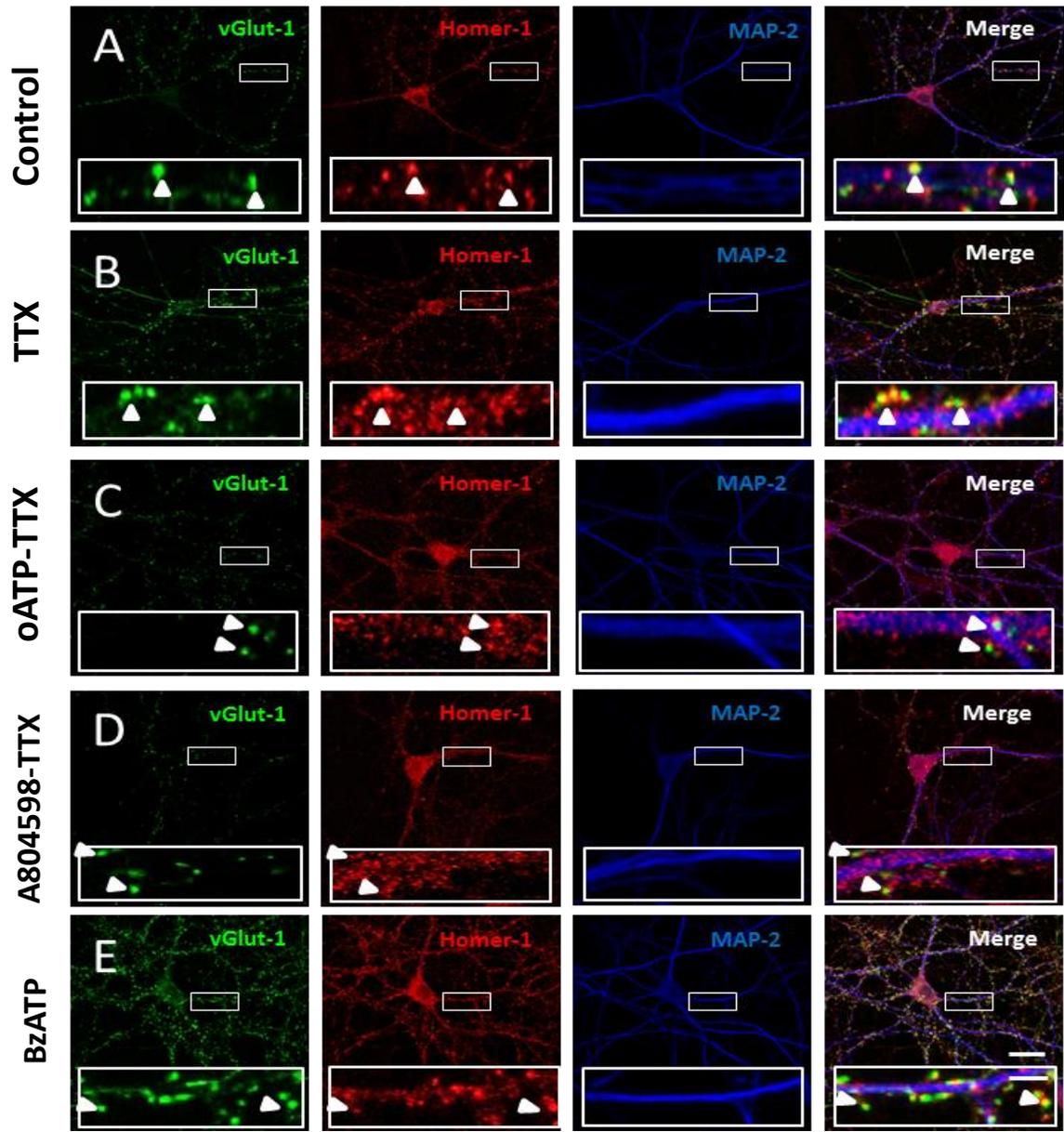


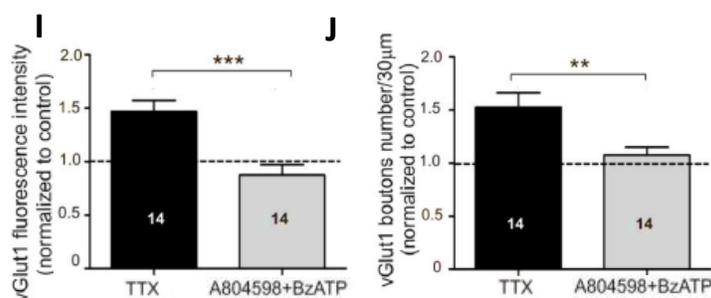
**Fig. 12** El análisis cuantitativo de la colocalización a nivel de sinapsis individuales confirma que los P2X7R se localizan preferentemente en la terminal presináptica. Imágenes de microscopía confocal representativas de co-cultivos neurona/glia de hipocampo control (sin tratamiento) en las que se realizó un triple marcaje contra P2X7R (verde) (A), GFAP (marcador astrocitario, rojo) (B), y MAP-2 (marcador neuronal, azul) (C) [1]. Para analizar la presencia de los P2X7R en la terminal presináptica se realizó un triple marcaje para P2X7R (verde) (E), sinapsina-1 (Syn-1; rojo) (F) y MAP-2 (azul) (G), y. Para analizar la presencia de los P2X7R en la terminal postsináptica se realizó un triple marcaje para P2X7R (verde) (I), homer-1 (rojo) (J) y MAP-2 (azul) (K). Las

flechas en el recuadro muestran regiones sinápticas localizadas sobre dendritas donde existe colocalización parcial o total del marcador de P2X7R con el marcador de Syn-1 (presináptico) y Homer1 (postsináptico). Escala: 4µm. Gráfica de dispersión que muestra la distribución del coeficiente de Mander M1 para un total de 135 Regiones de interés (ROIs) P2X7R+ que colocalizan con Syn-1 (Puntos verdes) y de 95 ROIs P2X7R+ que colocalizan con Homer-1 (puntos rosos) (**M**). Se detallan los porcentajes de Rois P2X7R + con un M1 de 0-0,2; 0,21-0,4; 0,41-0,6; 0,61-0,8 y 0,81-1.

Una vez confirmada la presencia de estos receptores en la terminal presináptica, analizamos si los P2X7R modulan el ajuste homeostático de la fuerza sináptica en respuesta a la supresión crónica de la actividad neuronal. Para ello, se analizó la abundancia y densidad de vGlut-1 sináptico en co-cultivos neurogliales tratados con Oxidized ATP (oATP; 200 µM, antagonista específico e irreversible del P2X7R; 24-36hs **Fig. 13 C. Fig. 11 E**) o con A804598 (100 nM, antagonista del P2X7R; 24-36hs; **Fig. 13 D. Fig. 11 E**) [100, 136]. Ambos tratamientos se realizaron 15 minutos antes y durante el tratamiento crónico con TTX (1 µM; 24-36 hs). Se utilizaron co-cultivos sin tratamiento y tratados con TTX como control (**Fig. 13 A, B**). Nuevamente, no encontramos diferencias estadísticas en la supervivencia neuronal en los co-cultivos tratados con los diferentes fármacos en comparación con los cultivos no tratados (número de neuronas/campo: Control:  $33.59 \pm 3.87$ , TTX  $34.00 \pm 2.20$ , BzATP  $30.33 \pm 0.45$ , A-804598/TTX  $32.35 \pm 3.25$ ; **Fig. 13 H**) lo que confirma que la densidad de contactos sinápticos no se verá afectada por cambios en el número de neuronas presentes en los co-cultivos. En estas condiciones, observamos que el bloqueo de los P2X7R previno el aumento homeostático compensatorio de la intensidad de la fluorescencia asociada a vGlut-1 (Control  $0.99 \pm 0.07$ ; oATP-TTX  $0.75 \pm 0.06$ ; A804598-TTX  $0.80 \pm 0.07$ ; TTX  $1.40 \pm 0.06$ ; **Fig. 13 F**) y la densidad sináptica (Control  $1.01 \pm 0.07$ ; oATP-TTX  $0.73 \pm 0.08$ ; A804598-TTX  $0.79 \pm 0.05$ ; TTX  $1.45 \pm 0.10$ ; **Fig. 13 G**). Por otra parte, co-cultivos neurogliales control fueron tratados con BzATP (10 µM; agonista específico de los P2X7R; 24-36hs; **Fig. 13 E. Fig. 11 F**). En respuesta a este tratamiento, se observa un aumento en la intensidad de fluorescencia media (BzATP  $1.54 \pm 0.07$ ;  $P < 0.001$ ; **Fig. 13 F**) y en la densidad de vGlut-1 sináptico (BzATP  $1.43 \pm 0.10$ ;  $P < 0.001$ ; **Fig. 13 G**), mimetizando el efecto del bloqueo crónico de la actividad neuronal. Para confirmar este resultado, evaluamos la especificidad del antagonista A804598 y del agonista específico BzATP. Para ello, co-cultivos neurogliales se pretrataron con el antagonista de P2X7R A804598 (100 nM, 12hs), y luego se añadió BzATP (10 µM, 24

hs). Como se esperaba, el incremento de la intensidad de fluorescencia asociada a vGlut-1 y la densidad sináptica se previnieron bajo estas condiciones, no observándose diferencias en estos parámetros respecto a lo observado en co-cultivos control (intensidad de fluorescencia de vGlut-1: control  $1.00 \pm 0.10$ ; TTX  $1.47 \pm 0.10$ ; A804598 + BzATP  $0.88 \pm 0.10$ ;  $P < 0.001$ ; densidad sináptica: control  $1.00 \pm 0.08$ ; TTX  $1.53 \pm 0.14$ ; A804598 + BzATP  $1.07 \pm 0.07$ ;  $P < 0.01$ ) (**Fig. 13 I, J**). Estos resultados confirman el efecto inhibitorio del antagonista del P2X7R. En conjunto, estos resultados ponen en evidencia la relevancia central de los P2X7R presinápticos en el ajuste homeostático de la eficacia sináptica en respuesta a la supresión crónica de la actividad.





**Fig. 13 El bloqueo farmacológico de los P2XR previene el ajuste compensatorio de la función presináptica.** Imágenes de microscopía confocal representativas de: co-cultivos neurona/glia de hipocampo control (sin tratamiento) (A) y tratados con TTX (1µM, 24hs-

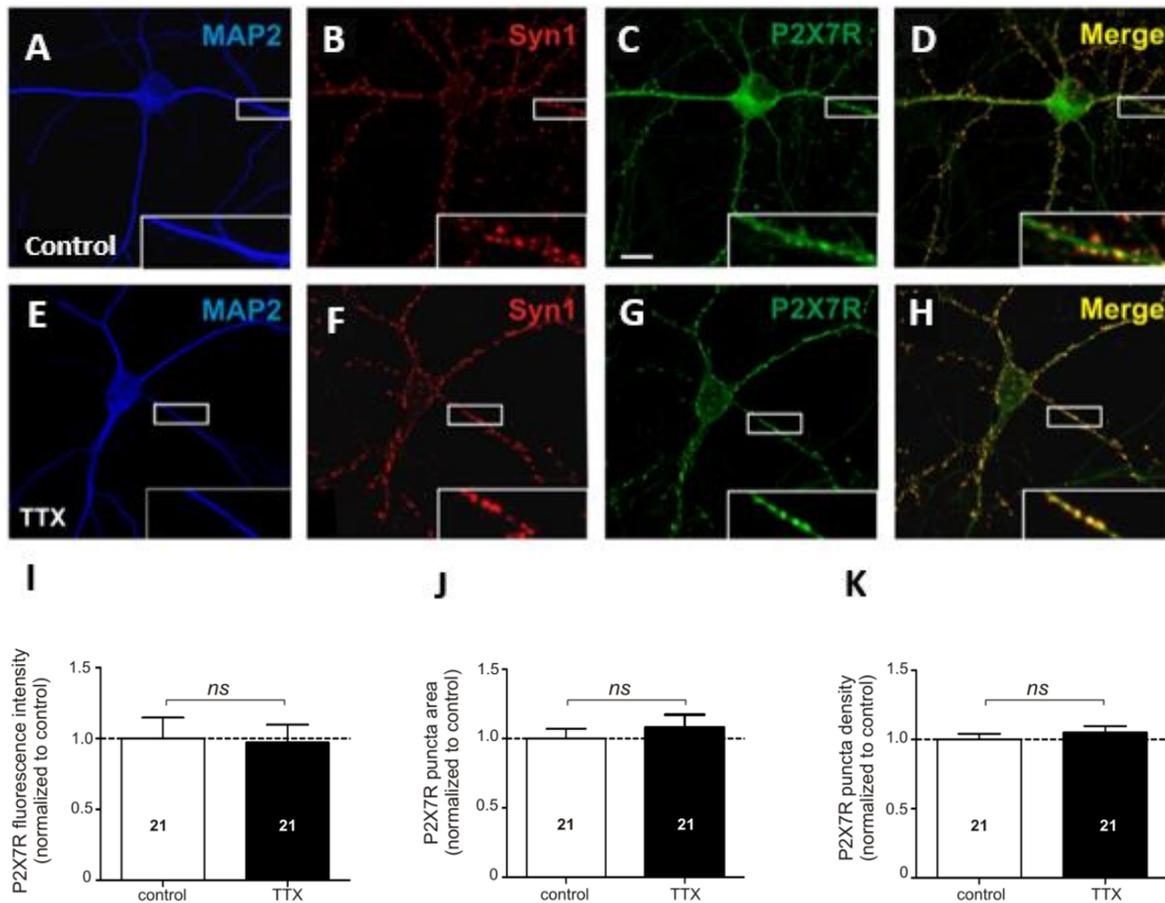
36hs) (B); oATP (200 µM, 24-36hs) (C) y A804598 (100 nM, 24-36hs) (D). Ambos tratamientos se realizaron 15 min antes y durante el tratamiento con TTX, y BzATP (10µM) en ausencia de TTX (E). Se realizó un triple marcaje contra vGlut-1 (verde), Homer1 (rojo) y MAP-2 (azul). En cada imagen se observa una magnificación de la región seleccionada con un recuadro. Escala 20µm. Magnificación: 5µm. Las flechas muestran contactos sinápticos donde existe colocalización parcial o total del marcador vGlut-1 y Homer1. Gráficos de barras que muestran el resumen de la intensidad de fluorescencia asociada a vGlut-1 sináptico (F, I). Gráficos de barras que muestran la densidad de sinapsis cuantificadas por neurona (G, J). El número total de neuronas analizadas para cada se presenta dentro del gráfico de barras. Los datos se normalizaron en relación a cultivos control y se expresan como media ± SEM. \*\*\*p<0.001. ns: no estadísticamente significativo. Gráficos de barras que muestran el número promedio de neuronas en 1x10<sup>3</sup> µm<sup>2</sup> de co-cultivos neurona/glia de hipocampo control (sin tratamiento) y tratados con TTX (1µM, 24hs-36hs), ATP-Na<sub>2</sub> (500µM, 24-36hs) y BzATP (10µM, 24-36hs) en ausencia de TTX y A804598 (100 nM) 15 min antes y durante el tratamiento con TTX (H) Two-tailed Student's t-test; One way ANOVA seguido de Tukey's test [1, 2].

## La activación de los P2X7R durante la supresión crónica de la actividad neuronal promueve un aumento en la permeabilidad de membrana neuronal

Los resultados obtenidos hasta el momento sugieren que la PSH estaría modulada por los P2XR, particularmente los P2X7R. A continuación, nos propusimos determinar si, frente a condiciones de bloqueo crónico, el aumento compensatorio de la función presináptica mediado por estas vías implica cambios en la abundancia del receptor y/o en la actividad de este receptor.

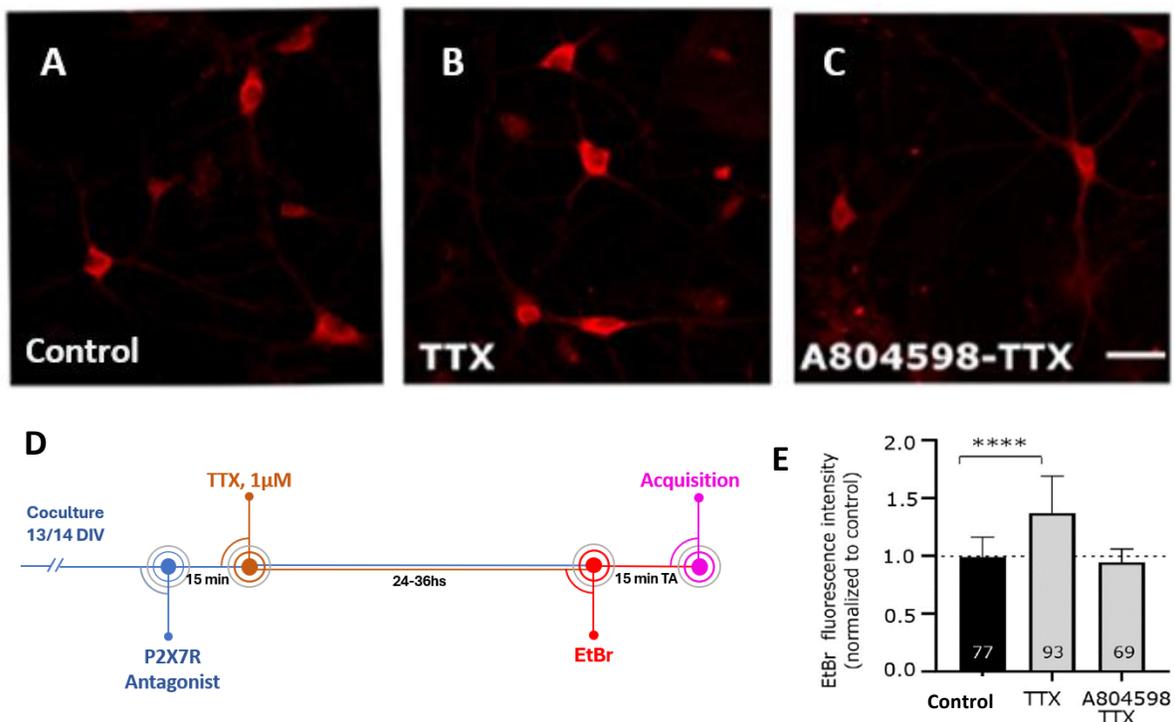
Para analizar cambios en la abundancia de estos receptores se realizó inmunocitoquímica contra el P2X7R (Fig. 14 C, G), Syn1 (marcador presináptico; Fig. 14 B, F) y MAP-2 (marcador neuronal; Fig. 14 A, E) y se cuantificó la intensidad de fluorescencia, el área y la densidad asociada al P2X7R presináptico, definido por la co-localización parcial o completa con Syn-1 en condiciones control y frente al tratamiento con TTX (1µM, 24hs-36hs). No se observaron

diferencias significativas en ninguna de estas tres variables en condiciones de inactividad crónica respecto a los co-cultivos control (intensidad de fluorescencia: control  $1.00 \pm 0.15$ ; TTX  $0.97 \pm 0.13$ ; área: control  $1.00 \pm 0.04$ ; TTX  $1.10 \pm 0.05$ ; densidad: control  $1.00 \pm 0.07$ ; TTX  $1.08 \pm 0.09$ ;) (**Fig. 14 I-K**). En conjunto, estos resultados sugieren que el mecanismo por el que los P2X7R modulan la PSH es independiente de cambios en la abundancia y/o distribución



**Fig. 14 El tratamiento crónico con TTX no afecta la distribución ni la abundancia de P2X7R presináptico.** Imágenes representativas de neuronas hipocámpales en co-cultivos de neurona-glia control (**A-D**) y tratadas con TTX ( $1\mu\text{M}$ , 24-36hs) (**E-H**) triplemente marcadas para MAP2 (azul), Sinapsina1 (Syn1; rojo) y P2X7R (verde). Escala:  $10\mu\text{m}$ . Resumen de la intensidad de fluorescencia integrada de P2X7R en sinapsis (**I**), área de regiones P2X7R+ (**J**) o densidad de P2X7R (**K**) en células positivas para MAP2. Los puntos presinápticos de P2X7R fueron identificadas mediante doble marcado con Syn1. Escala  $10\mu\text{m}$ ; Magnificación:  $3\mu\text{m}$ . Las barras muestran la media  $\pm$  SEM para cada condición en relación con las neuronas de control no tratadas en el mismo experimento; el número de neuronas usadas se muestra en las barras; ns: Estadísticamente no significativo; Two-tailed Student's t-test [1].

Luego, analizamos si el ajuste de la eficacia presináptica tras un periodo de inactividad crónica podría estar determinado por un aumento en la actividad de estos receptores. Para evaluar esta posibilidad, llevamos adelante experimentos de captación del agente intercalante bromuro de etidio (BrEt), capaz de permear los P2X7R [152]. Para llevar adelante este objetivo, los co-cultivos fueron expuestos al bloqueante específico de los P2X7R A804598 (100  $\mu$ M; 24-36hs; **Fig. 15 C, D**), 15min antes y durante el tratamiento con TTX. La captación de este marcador en estas condiciones se comparó con la observada en cocultivos control y tratados con TTX (1  $\mu$ M; 24-36 hs) (**Fig. 15 A, B**). Los resultados obtenidos muestran que, luego del bloqueo crónico de la actividad neuronal, la captación de BrEt aumentó significativamente respecto a la observada en condiciones control y dicho aumento se previno al bloquear los P2X7R (control 0.99 (0.33) a TTX 1.37 (0.51), A-804598/TTX 0.94 (0.21),  $U = 1352$ ,  $P < 0.0001$ ) (**Fig. 15 E**). Este resultado sugiere que la neurona presináptica experimenta un aumento en la permeabilidad de membrana mediada por los P2X7R luego de un período de inactividad prolongado.



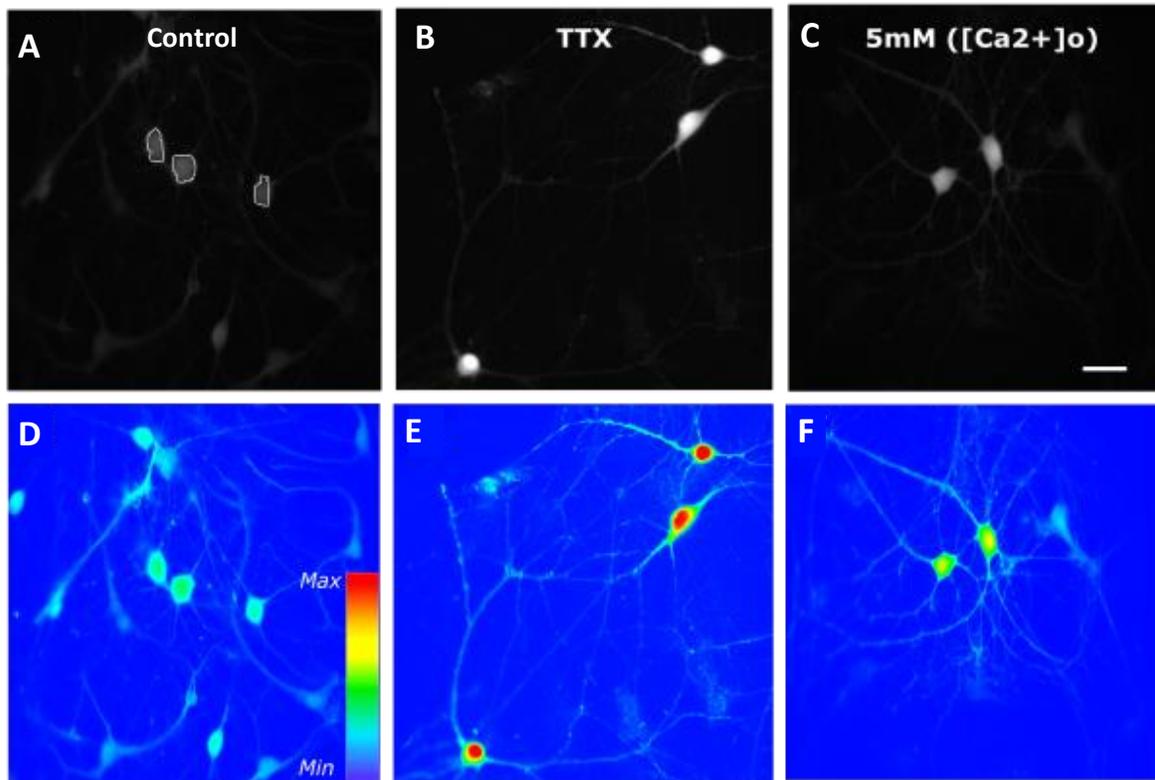
**Fig. 15 El bloqueo crónico de la actividad neuronal promueve un aumento en la permeabilidad de membrana dependiente de los P2X7Rs.** Imágenes representativas de co-cultivos de control (**A**) y tratados con TTX (1  $\mu$ M, 24-36hs) (**B**) o A804598 (100  $\mu$ M; 24-36hs) añadido 15 minutos antes y durante el tratamiento con TTX (**C**), y luego expuestos a EtBr. Escala 30 $\mu$ m. Se definieron los somas neuronales y se analizó la intensidad

de fluorescencia asociada a EtBr. Estrategia experimental utilizada para el análisis de EtBr (**D**). Gráficos de barras que muestran la mediana (iqr) para cada condición en relación con las neuronas de control no tratadas en el mismo experimento (**E**). El número de neuronas analizadas en cada experimento se muestra dentro de cada barra. \*\*\*\*  $P < 0,0001$ ; prueba de Mann-Whitney U [2].

### **El aumento de la permeabilidad de membrana dependiente de los P2X7R se traduce en un aumento en los niveles de $\text{Ca}^{+2}$ neuronal**

Los resultados caracterizados hasta el momento sugieren que el ATP glial promueve la activación de los P2X7R presinápticos, incrementando la permeabilidad de membrana neuronal y la fuerza sináptica. Teniendo en cuenta la elevada permeabilidad al  $\text{Ca}^{+2}$  de los P2X7R y la relación directa que existe entre la fuerza sináptica y los niveles de  $\text{Ca}^{+2}$  neuronal [25, 90, 144], evaluamos la posibilidad de que la activación de los P2X7R facilite un aumento en el  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular frente a la supresión crónica de la actividad neuronal. Así, cuantificamos cambios en los niveles citosólicos de este ion mediante el análisis de la fluorescencia asociada al marcador intensiométrico de  $\text{Ca}^{+2}$  Fluo-4/AM.

En primer lugar, como forma de validar esta herramienta imagenológica, analizamos si los cambios de la fluorescencia asociada al Fluo-4/AM están determinados por los niveles de  $\text{Ca}^{+2}$  citosólico y no, por ejemplo, por diferencias en la capacidad de internalización del Fluo-4/AM. Para ello, co-cultivos sin tratar (**Fig. 16 A, D**) y tratados con TTX ( $1\mu\text{M}$ ; 24-36 hs; **Fig. 16 B, E**) fueron incubados con Fluo-4/AM contenido en EBS a 2mM y 5mM de  $\text{Ca}^{+2}$  (**Fig. 16 C, F**). Se identificaron los somas como se muestra en la **Fig. 16 A**. Los resultados obtenidos muestran un aumento significativo de la fluorescencia asociada al Fluo-4/AM en co-cultivos expuestos a una solución 5mM de  $\text{Ca}^{+2}$  respecto a los co-cultivos expuestos a una solución 2mM  $\text{Ca}^{+2}$ . Además, en ambas condiciones, los co-cultivos tratados con TTX muestran un incremento significativo en la fluorescencia asociada al Fluo-4/AM respecto a su condición control ( $\text{Control}_{2\text{mM}} = 1.00 \pm 0.02$ ;  $\text{TTX}_{2\text{mM}} = 1.50 \pm 0.05$ ;  $t = 10.36$ ,  $\text{TTX}_{5\text{mM}} = 1.43 \pm 0.03$ ;  $t = 11.85$ ,  $P < 0.0001$  **Fig. 16 G**). Así, estos resultados sugieren que el aumento en los niveles de  $\text{Ca}^{+2}$  citosólico es el que determina un aumento en la fluorescencia media asociada al Fluo-4/AM, validando esta herramienta en nuestro modelo experimental.

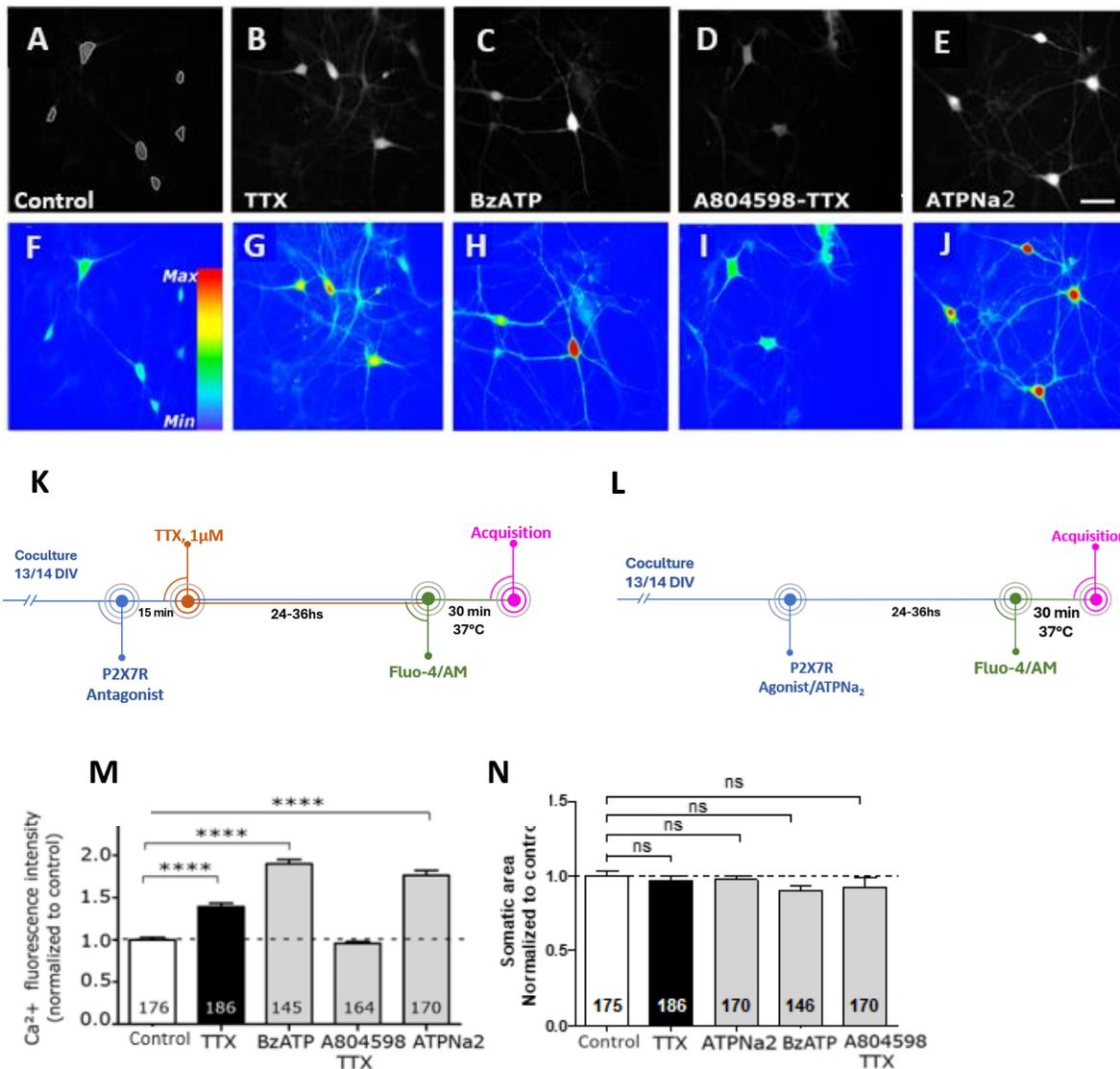


**Fig. 16** La abundancia del  $\text{Ca}^{2+}$  somático es sensible a cambios en la actividad sináptica y a los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelulares ( $[\text{Ca}^{2+}]_o$ ). Imágenes de microscopía de epifluorescencia representativas de co-cultivos neurona/glia de hipocampo y pseudocolor en condiciones control (sin tratamiento) (**A, D**), tratados con TTX ( $1\mu\text{M}$ , 24hs-36hs) (**B, E**) o expuestas a un medio extracelular con 5 mM  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  (**C, F**). Escala:  $30\mu\text{m}$ . Los somas neuronales fueron definidos como se muestra en (**A**) y la densidad integrada de  $\text{Ca}^{2+}$  fluorescencia asociada al Fluo-4/AM fue analizada. Gráficos de barras que muestran la media  $\pm$  SEM (**G**); El nro. de neuronas analizadas en cada condición experimental se muestra en cada barra. \*\*\*\*  $P < 0.0001$ ; Two-tailed Student's t test [2].

Luego, para evaluar si la disponibilidad de  $\text{Ca}^{2+}$  neuronal está determinada por el ATP y la activación de los P2X7R, los co-cultivos fueron expuestos a un incremento en los niveles extracelulares de ATP mediante un tratamiento con  $\text{ATPNa}_2$  ( $500\mu\text{M}$ , 24/36hs; **Fig. 17 E, J, L**), y la activación/bloqueo de los P2X7R mediante tratamientos crónicos con BzATP ( $10\mu\text{M}$ ; 24/36hs; **Fig. 17 C, H, L**) y A804598 ( $100\mu\text{M}$ ; 24-36hs; **Fig. 17 D, I, K**), respectivamente. Este último tratamiento se realizó 15min antes y durante el tratamiento con TTX. Los resultados

obtenidos en estas condiciones fueron comparados con los observados en co-cultivos control (**Fig. 17 A, F**) y durante la inducción de PSH (**Fig. 17 B, G**). Teniendo en cuenta que para cumplir con este objetivo se analizó la fluorescencia media de regiones correspondientes a los somas neuronales, y que los mismos podrían presentar diferencias de tamaño, resolvimos analizar el tamaño de los mismos en las diferentes condiciones experimentales. Interesantemente, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (área del soma neuronal: Control:  $1.0 \pm 0.03$ ; TTX:  $0.97 \pm 0.03$ ; ATPNa2:  $0.97 \pm 0.026$ ; BzATP:  $0.90 \pm 0.03$ , A-804598/TTX:  $0.93 \pm 0.06$ ) (**Fig. 17 N**). De esta forma, sin cambios en esta variable, los cambios en la densidad integrada cuantificada en las diferentes condiciones experimentales están determinados por cambios en la fluorescencia media asociada al Fluo-4/AM.

Así, observamos que el tratamiento con TTX aumenta significativamente la fluorescencia asociada al Fluo-4/AM respecto al control (Control:  $1.00 \pm 0.03$ ; TTX  $1.39 \pm 0.04$ ,  $t = 7.81$ ,  $P < 0.0001$ ; **Fig. 17 M**). De forma similar, un aumento en los niveles extracelulares de ATP (ATP Na2:  $1.76 \pm 0.06$ ,  $t = 11.68$ ,  $P < 0.0001$ ; **Fig. 17 M**), así como la activación de los P2X7R (BzATP  $1.90 \pm 0.05$ ,  $t = 15.34$ ,  $P < 0.0001$ ; **Fig. 17 M**) promueven un incremento en la fluorescencia media asociada al Fluo-4/AM. Por otra parte, el bloqueo de los P2X7R previno el aumento compensatorio en la fluorescencia media asociada al Fluo-4/AM (A-804598/TTX  $0.96 \pm 0.02$ ,  $t = 15.34$ ,  $P < 0.0001$ ; **Fig. 17 M**). En conjunto, estos resultados sugieren que un incremento en los niveles de ATP extracelular, así como la activación de los P2X7R modulan el aumento en los niveles de  $Ca^{+2}$  neuronal durante la inducción/mantenimiento de la PSH y, por lo tanto, el incremento en la función presináptica.



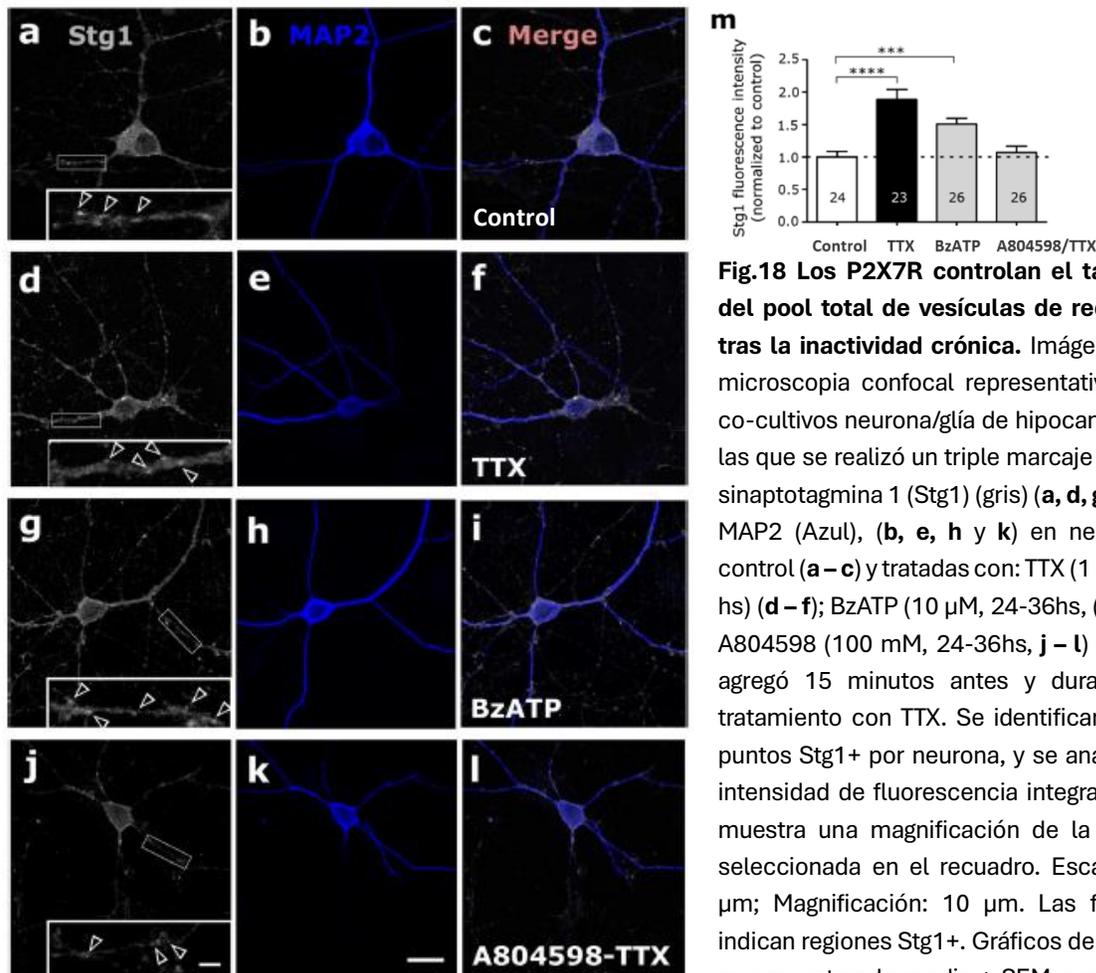
**Fig. 17 El aumento del Ca<sup>2+</sup> citosólico dependiente de la inactividad está mediado por P2X7R.** Imágenes representativas de niveles neuronales de Ca<sup>2+</sup> (A-E) e imágenes en pseudocolor (F-J) en co-cultivos de neuronología control no tratados (A, F) y tratados con TTX (1 μM, 36h) (B, G); BzATP (10 μM, 36hs) (C, H), A804598 (100 μM, 36hs) (D, I) que se añadió 15 min antes y durante el tratamiento con TTX y por último, ATPNa<sub>2</sub> (500 μM, 36hs) (E, J). Escala 30 μm. Estrategia experimental utilizada para el análisis de Fluo-4/AM (K y L). Los somas neuronales se definieron como se muestra en (A) y se analizó la intensidad de fluorescencia integrada y el área de los somas para cada condición experimental (M y N, respectivamente). Las gráficas de barras muestran la media ± SEM para cada condición en relación con las neuronas de control no tratadas en el mismo experimento. El número total de neuronas utilizadas se muestra en el interior de las barras. ns: estadísticamente no significativo, \*\*\*\* P < 0,001; Two-tailed Student's t test [2].

## El aumento en los niveles de $\text{Ca}^{+2}$ neuronal dependiente de los P2X7R está acompañado de un aumento en el reciclaje vesicular

Teniendo en cuenta que la activación de los P2X7R promueve un aumento en los niveles de  $\text{Ca}^{+2}$  citosólico neuronal, evaluamos si este cambio está acompañado de cambios en el reciclaje de las VS. Para ello se realizó el marcaje *in vivo* de Stg1, una proteína presente en la membrana de las VS, en condiciones control y durante la inducción de PSH (ver apartado “Experimentos de marcaje con Sinaptotagmina 1 de las VS” en Métodos) [153].

Para estimar cambios en el tamaño del pool de vesículas de reciclaje, se realizó inmunocitoquímica contra Stg1 y MAP-2 (**Fig. 18 a, b; d, e; g, h; j, k**). Así, se observó que la fluorescencia media asociada a la Stg1 aumentó significativamente en co-cultivos tratados con TTX (1  $\mu\text{M}$ , 24.36h) respecto a co-cultivos control (Control=  $1.00 \pm 0.09$ , TTX  $1.89 \pm 0.16$ ;  $t = 5.00$ ,  $P < 0.0001$ ; **Fig. 18 m**). Este resultado sugiere que el tamaño del pool de VS se incrementa luego de un período de inactividad prolongado y confirma, además, que esta técnica es lo suficientemente sensible para detectar estos cambios.

Luego, para analizar el posible papel de los P2X7R en el remodelamiento de la terminal presináptica durante la PSH, se realizó este mismo ensayo, pero en este caso los co-cultivos fueron expuestos a la activación/bloqueo de los P2X7R con BzATP (10  $\mu\text{M}$ ; 24-36HS; **Fig. 18 g-i**) en ausencia de TTX y A804598 (100 $\mu\text{M}$ ; 24-36hs; **Fig. 18 j-l**) en presencia de TTX. Los resultados obtenidos muestran que frente a la activación de los P2X7R se produce un incremento en la fluorescencia media asociada a Stg1 respecto a la observada en co-cultivos control. Dicho aumento se vio impedido durante la PSH frente al bloqueo de los P2X7R (A-804598/TTX  $1.07 \pm 0.10$ ; BzATP  $1.51 \pm 0.09$ ,  $t = 4.07$ ,  $P < 0.001$ ; **Fig. 18 m**). Este resultado sugiere que el aumento homeostático del tamaño del pool de VS en condiciones de inactividad crónica está mediado por la activación de los P2X7R.



**Fig.18 Los P2X7R controlan el tamaño del pool total de vesículas de reciclaje tras la inactividad crónica.** Imágenes de microscopía confocal representativas de co-cultivos neurona/glia de hipocampo en las que se realizó un triple marcaje contra sinaptotagmina 1 (Stg1) (gris) (a, d, g, y j), y MAP2 (Azul), (b, e, h y k) en neuronas control (a – c) y tratadas con: TTX (1  $\mu$ M, 36 hs) (d – f); BzATP (10  $\mu$ M, 24-36hs, (g – i) o A804598 (100 mM, 24-36hs, j – l) que se agregó 15 minutos antes y durante el tratamiento con TTX. Se identificaron los puntos Stg1+ por neurona, y se analizó la intensidad de fluorescencia integrada. Se muestra una magnificación de la región seleccionada en el recuadro. Escala, 30  $\mu$ m; Magnificación: 10  $\mu$ m. Las flechas indican regiones Stg1+. Gráficos de barras que muestran la media  $\pm$  SEM para cada

condición en relación con los co-cultivos no tratados en el mismo experimento (m); el número total de neuronas utilizadas se muestra en el interior de las barras; \*\*\*P < 0,001; \*\*\*\*P < 0,0001, Two-tailed Student's t test [2].

### El ajuste homeostático de la eficiencia presináptica está mediado por hemicanales de conexina 43 gliales y panexina 1 neuronales

Resultados publicados por nuestro laboratorio confirmaron que los hemicanales de conexina 43 (Cx43HC) expresados en células gliales y los hemicanales de panexina-1 (Panx1HC) neuronales juegan un rol clave en la inducción/mantenimiento de la PSH. En este sentido, el bloqueo farmacológico de Cx43HC y Panx1HCs impidió el aumento homeostático de la abundancia de vGlut-1 y de la densidad de contactos sinápticos esperado durante el bloqueo crónico de la actividad neuronal [1]. Teniendo en cuenta numerosos reportes que hacen referencia a que los Cx43HC y los Panx1HCs operan como vía de liberación de moléculas neuro-activas entre las que se encuentra el ATP [137, 138], especulamos que el aumento

extracelular de este nucleótido frente al silenciamiento de la actividad neuronal podría estar mediado por estas vías de liberación. Para evaluar esta posibilidad, analizamos la disponibilidad de ATP extracelular en co-cultivos tratados con probenecid (PBD 500 $\mu$ M; 36hs; bloqueante de Panx1HCs) y GAP-26 (150  $\mu$ M; 36hs; bloqueante de Cx43HC)[154], 15 min antes y durante el tratamiento con TTX (1 $\mu$ M; 36hs). Los resultados obtenidos muestran que, en respuesta al bloqueo crónico de la actividad neuronal, se produce un incremento en la abundancia de ATP extracelular respecto a lo observado en co-cultivos control (Control  $1.09 \pm 0.38$ , TTX  $4.70 \pm 1.05$ ,  $t = 3.11$ ,  $P < 0.001$ ; **Fig. 19 L**). Dicho aumento fue impedido frente al bloqueo de Cx43HC (Control  $1.09 \pm 0.38$ , TTX  $4.70 \pm 1.05$ ,  $t = 3.11$ ,  $P < 0.001$ , GAP26/TTX:  $1.42 \pm 0.42$ ; **Fig. 19 L**) y Panx1HCs (Control  $1.09 \pm 0.38$ ; TTX  $4.70 \pm 1.05$ ,  $t = 3.11$ ;  $P = 0.0001$ ; PBD/TTX  $1.04 \pm 0.24$ ; **Fig. 20 J**). Este resultado sugiere que los Cx43HC astrocitarios y las Panx1HCs neuronales y/o gliales modulan el aumento de los niveles de ATP extracelular durante la inducción/mantenimiento de la PSH.

Para determinar si el ATP liberado por los Cx43HC gliales es responsable de promover el aumento homeostático de la función presináptica, se analizaron los niveles de  $Ca^{+2}$  citosólico neuronal en co-cultivos tratados con GAP26 ( $2,5 \times 10^{-4}$  mg/ $\mu$ l; 24hs; **Fig. 19 C, G, I**) 15 min antes y durante el tratamiento con TTX. Co-cultivos tratados con TTX (1 $\mu$ M; 24hs; **Fig. 19 B, F**) y control (**Fig. 19 A, E**) fueron utilizados como control. Sorprendentemente, el bloqueo de estas vías de liberación de ATP previno el aumento compensatorio en la intensidad de fluorescencia asociada a  $Ca^{+2}$  citoplasmático neuronal observado en respuesta a la supresión de la actividad. Este resultado, destaca el papel crucial de los Cx43HCs en la remodelación neuronal durante la homeostasis sináptica (valores respectivos: Control  $1.00 \pm 0.01$ ; TTX  $1.26 \pm 0.02$ ,  $t = 11.88$ ,  $P < 0.0001$ ; GAP26/TTX  $0.92 \pm 0.13$ ) (**Fig. 19 K**) y resalta la importancia de la comunicación neuroglial. Por otra parte, el agregado del agonista de P2X7R, BzATP (10  $\mu$ M, 24hs) a los co-cultivos pretratados con GAP26/TTX no rescató el aumento de  $Ca^{+2}$  citoplasmático neuronal dependiente de la inactividad (rescate GAP26/TTX/BzATP  $0.99 \pm 0.02$ ; **Fig. 19 J, K**).

Colectivamente, estos datos respaldan el papel esencial de Cx43HC gliales en el aumento de la concentración extracelular de ATP y sugiere que estos hemicanales actúan corriente

arriba de los P2X7R en el ajuste homeostático de la función presináptica. Además, estos resultados indican que los Cx43HC podrían estar liberando otro gliotransmisor, además del ATP, también necesario para el ajuste homeostático de la función presináptica. Este resultado es consistente con nuestro trabajo previo que indica que el ATP derivado de la glía es necesario pero no suficiente para aumentar la fuerza presináptica en respuesta a la inactividad neuronal [1].

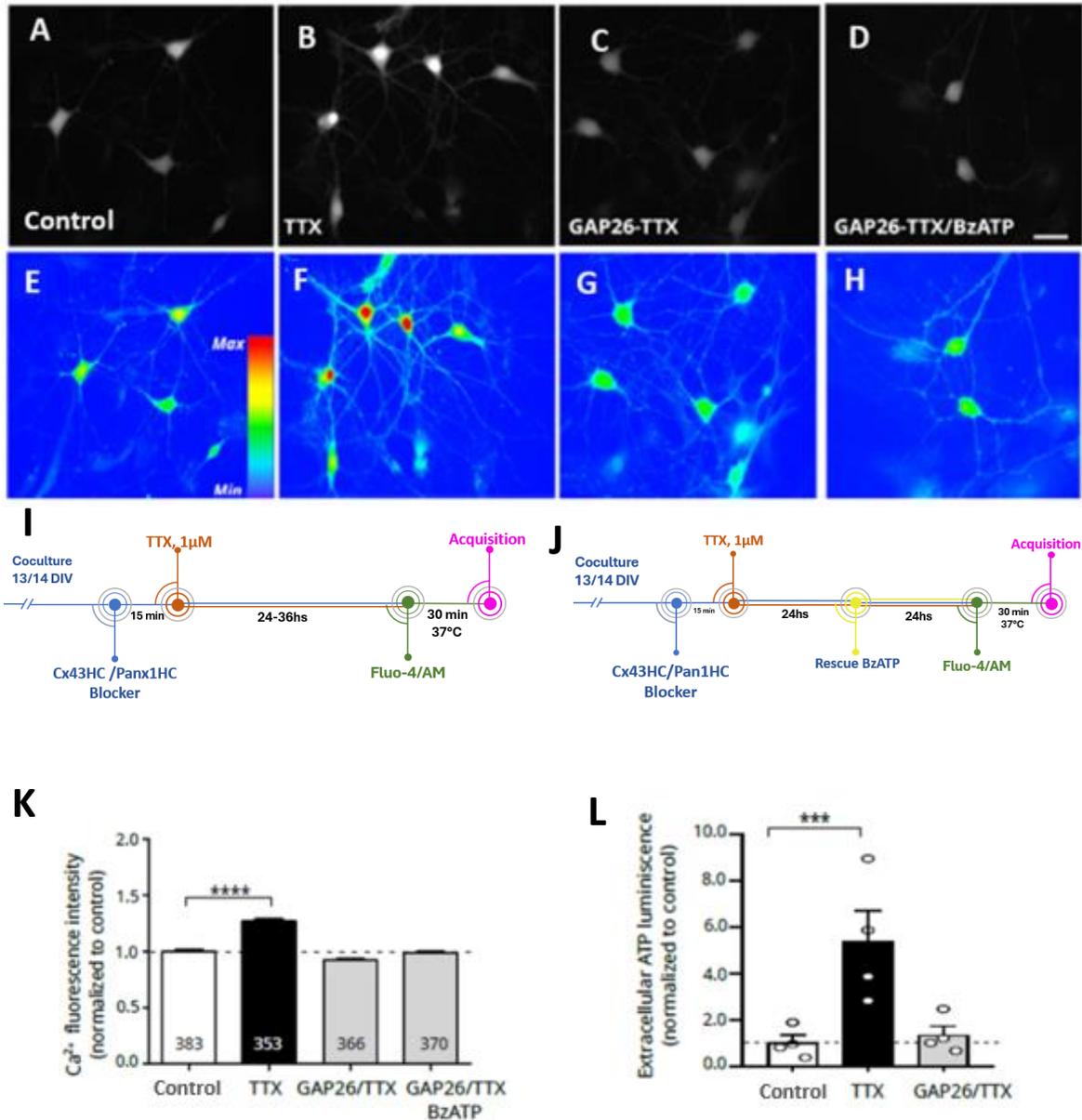
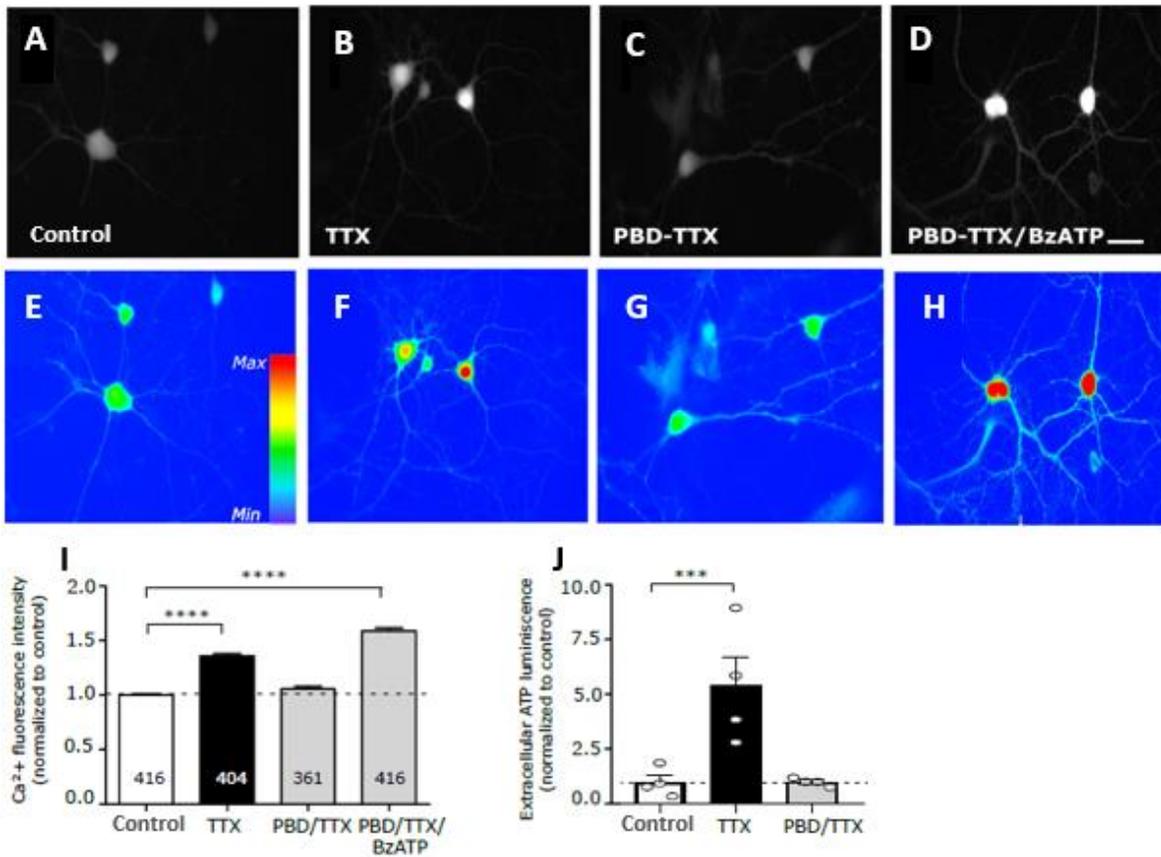


Fig. 19. La inactividad crónica desencadena la liberación de ATP y el ajuste homeostático de la función presináptica dependiente de Cx43HC. Imágenes representativas de niveles neuronales de Ca<sup>2+</sup> (A-D) e

imágenes en pseudocolor (**E-H**) de somas neuronales sin tratar (**A, E**) y tratados con TTX (1  $\mu$ M, 24hs) (**B, F**); Gap26 (150  $\mu$ M; 24hs), agregado 15 minutos antes y durante el tratamiento con TTX (**C, G**) o Gap26 (150  $\mu$ M), agregado 15 minutos antes y durante el tratamiento con TTX, y BzATP (10  $\mu$ M, 24hs) agregado a continuación (**rescate**) (**D, H, J**). Barras de escala, 30  $\mu$ m. Estrategia experimental utilizada para el análisis de la fluorescencia asociada a Fluo-4/AM (**I**). Se definieron los somas neuronales y se cuantificó la Intensidad de densidad integrada de la fluorescencia asociada a  $Ca^{+2}$  neuronal (**J**). Los niveles de ATP extracelular se cuantificaron utilizando el ensayo de bioluminiscencia de luciferina-luciferasa en muestras de medio recolectados de co-cultivos de control y tratados con TTX (1  $\mu$ M, 36hs) o Gap26 (150  $\mu$ M; 36hs), agregado 15 minutos antes y durante el tratamiento con TTX (**K**). Para ambas cuantificaciones, los gráficos de barras muestran la media  $\pm$  SEM para cada condición en relación con las neuronas control no tratadas en el mismo experimento; el número de neuronas (para cuantificación de  $Ca^{+2}$ ) se muestra en el interior de las barras. Para la medición de ATP extracelular se realizaron cuatro experimentos independientes y la distribución se muestra en el gráfico. \*\*\*  $P < 0,001$ ; \*\*\*\* $P < 0,0001$ . Two-tailed Student's t test [2].

En relación a Panx1HC, numerosos autores sugieren que el poro asociado al receptor ionotrópico de tipo P2X7R es una estructura separada del propio receptor y está representada por esta proteína [3, 110, 155]. Según este modelo, la activación del P2X7R sería necesaria para la apertura del poro de Panx1HC y el ATP liberado a través de esta vía reforzaría la activación de los P2X7R, operando como un *loop* de retroalimentación positiva [156]. Teniendo en cuenta nuestros resultados que confirman que los P2X7R presinápticos y los Panx1HC neuronales son necesarios en la modulación de la fuerza presináptica en la PSH [1] especulamos con la posibilidad de que la inactividad crónica también promueva la liberación de ATP a través de los Panx1HC, potenciando la activación de P2X7R y la entrada de  $Ca^{+2}$  a la célula presináptica mediante un bucle de retroalimentación positiva. Exploramos esta alternativa analizando en primer lugar la relevancia de Panx1HC en la entrada de  $Ca^{+2}$  a la neurona cuantificando la intensidad de fluorescencia asociada al  $Ca^{+2}$  citoplasmático en neuronas disociadas de hipocampo tratadas con PBD (500  $\mu$ M; 36hs; **Fig. 20 C, G, Fig. 19 I**), 15 minutos antes y durante el tratamiento con TTX (TTX; 1 $\mu$ M; 36hs). Este parámetro se comparó con el observado en cocultivos sin tratar (**Fig. 20 A, E**) y tratados con TTX (1  $\mu$ M; 36hs; **Fig. 20 B, F**). Encontramos que el bloqueo de la actividad de Panx1HC previene el aumento compensatorio en la intensidad de fluorescencia asociada a  $Ca^{+2}$  citosólico (Control  $1.00 \pm 0.01$ ; TTX  $1.36 \pm 0.02$ ;  $t = 14.50$ ,  $P < 0.0001$ ; PBD/TTX  $1.06 \pm 0.03$ ; **Fig. 20 I**). Para investigar la interacción entre Panx1HC/P2X7R, agregamos BzATP (10 $\mu$ M, 24hs) a cocultivos pretratados con PBD/TTX (24hs), observando que estas condiciones rescatan el

aumento de  $\text{Ca}^{+2}$  citoplasmático dependiente de la inactividad (rescate PBD/TTX/BzATP  $1.59 \pm 0.03$ ;  $t = 20.01$ ,  $P < 0.0001$ ; **Fig. 19 J, 20 I**). Estos resultados sugieren que los P2X7R cooperan con los Panx1HC para promover el aumento compensatorio en la cantidad de  $\text{Ca}^{+2}$  citosólico luego de un período de inactividad prolongado, favoreciendo la potenciación de la fuerza presináptica.



**Fig. 20 Los Panx1HCs modulan el aumento homeostático de la eficacia presináptica tras el silenciamiento crónico de la actividad neuronal.** Imágenes representativas de los niveles neuronales de  $\text{Ca}^{+2}$  (**A-D**) e imágenes en pseudocolor (**E-H**) en somas neuronales control sin tratar (**A, E**) y tratados con TTX ( $1\mu\text{M}$ , 36hs) (**B, F**); PBD ( $500\mu\text{M}$ , 36hs), agregado 15 min antes y durante el tratamiento con TTX ( $1\mu\text{M}$ , 36hs) (**C, G**) o PBD ( $500\mu\text{M}$ ), agregado 15 min antes y durante el tratamiento con TTX ( $1\mu\text{M}$ , 24 hs), y BzATP se agregó a continuación ( $10\mu\text{M}$ , 24hs) (rescate) (**D, H**). Se definieron los somas neuronales y se analizó densidad integrada de la fluorescencia asociada al  $\text{Ca}^{+2}$  (**I**). Gráfica de barras que muestra los niveles de ATP extracelular en muestras de medio recolectados de co-cultivos control y tratados con TTX ( $1\mu\text{M}$ , 36 hs) o PBD ( $500\mu\text{M}$ ; 36hs), agregados 15 minutos antes y durante el tratamiento con TTX (**J**). Para todas las cuantificaciones, los gráficos de barras muestran la media  $\pm$  SEM para cada condición en relación con el control no tratado en el mismo experimento; El número de neuronas (para la cuantificación de  $\text{Ca}^{+2}$ ) utilizadas se muestra en las barras. Para la medición de ATP extracelular se realizaron cuatro experimentos independientes y la distribución se muestra en el gráfico \*\*\*  $P < 0,001$ , \*\*\*\* $P < 0,0001$ . Barra de escala,  $30\mu\text{m}$ . Two-tailed Student's t test [2].

## **Discusión**

Mediante la utilización de diversas estrategias farmacológicas, técnicas de detección inmune e imagenología funcional, nuestros hallazgos ponen de manifiesto la relevancia de la señalización purinérgica y la interacción neuroglial en la modulación de los mecanismos moleculares subyacentes a la PSH presináptica.

### **La inmunofluorescencia de vGlut-1 permite detectar cambios en la función presináptica**

Los resultados obtenidos en este trabajo confirman que la abundancia y densidad de vGlut-1 aumentan en respuesta a la supresión crónica de la actividad neuronal con TTX, uno de los paradigmas experimentales ampliamente utilizados para inducir la PSH [14, 157]. El mismo resultado se obtiene al incrementar los niveles de  $\text{Ca}^{+2}$  extracelular de 2 a 5mM confirmando que el análisis de la fluorescencia asociada a este marcador representa una herramienta suficientemente sensible para estimar cambios en la fuerza sináptica.

Estos resultados coinciden con numerosos estudios que confirman que los niveles de vGlut-1 en la sinapsis están regulados homeostáticamente por la actividad neuronal y se correlaciona directamente la Pr [64, 66, 68]. Además, nuestros resultados son consistentes con trabajos previos que han caracterizado que vGlut-1 es responsable de controlar la cantidad de glutamato cargado a la VS y liberado a la hendidura sináptica, proveyendo un mecanismo presináptico que permite controlar la fuerza de la transmisión excitatoria durante el refinamiento sináptico y los mecanismos de plasticidad [66].

### **El ATP glial liberado por Cx43HC es necesario para el ajuste homeostático de la función presináptica**

Este trabajo muestra por primera vez que el ATP astrocitario media el ajuste de la función presináptica hipocampal en la PSH tras un periodo prolongado de inactividad neuronal. Confirmamos que la supresión de la actividad de la red promueve un aumento en los niveles extracelulares de este nucleótido liberado por Cx43HC, los cuales se expresan preferentemente en astrocitos [154, 158–160]. Teniendo en cuenta que la mayor parte del

## **Discusión**

ATP se forma a partir de ADP en las mitocondrias mediante el proceso de fosforilación oxidativa y en una cantidad menor, por medio de la vía glicolítica y en el ciclo del ácido cítrico [161], la incapacidad de ajustar la eficiencia presináptica frente a la inhibición selectiva del metabolismo glial, al aplicar ácido fluorocítrico a nuestros cultivos, complementó este resultado. Estos resultados están en línea con reportes obtenidos por la MSc. Andrea Cairus que confirman que la ausencia de células gliales fue suficiente para que las neuronas sean incapaces de experimentar mecanismos de PSH presináptica [1].

De esta manera, nuestros hallazgos se alinean con trabajos previos que describen al ATP glial como una molécula de señalización neuroglial y resaltan la importancia de los astrocitos en la regulación homeostática de la función presináptica [162, 163]. Además, estos resultados concuerdan con reportes de numerosos autores que confirman que los astrocitos operan como protagonistas activos en el control de la transferencia de información entre neuronas, formando parte de una sinapsis tripartita [121, 164–166]. En este sentido, experimentos realizados por nuestro grupo, resaltan la importancia de los astrocitos en la inducción y/o mantenimiento de la PSH presináptica, ya que cultivos neuronales crecidos sobre una monocapa enriquecida en astrocitos desencadenan cambios presinápticos compensatorios comparables con los observados en neuronas crecidas sobre una monocapa de glía mixta (incluye además de astrocitos, microglía y oligodendrocitos en baja proporción) [2].

Un resultado interesante surge de los experimentos de rescate de Cx43HC, en los que se agregó BzATP a co-cultivos neurogliales tratados con GAP26 y expuestos al bloqueo prolongado de la actividad neuronal. En estas condiciones, las neuronas fueron incapaces de experimentar una potenciación homeostática de la función presináptica. Este resultado concuerda con los obtenidos por la MSc. Andrea Cairus, donde el agregado de MgATP o BzATP a cultivos enriquecidos de neuronas hipocampales en condiciones basales replicó dicho resultado [1]. De esta manera, evidenciamos que, si bien el ATP glial es esencial para la inducción/mantenimiento de la PSH, no es suficiente cuando actúa en ausencia de otro factor soluble de origen glial dependiente de Cx43HC. En este sentido, numerosos autores han caracterizado los mecanismos a través de los cuales cambios en la función neuronal promueven la liberación de gliotransmisores tales como el TNF-alfa, glutamato, D-serina,

## ***Discusión***

neuropéptidos, eicosanoides, y factores de crecimiento [20, 165, 167–170], por lo que no descartamos la participación de alguno de ellos en el ajuste homeostático de la eficacia presináptica.

### **Los P2X7R presinápticos modulan el ajuste homeostático de la función sináptica**

En un contexto en el que la supresión prolongada de la actividad neuronal promueve un aumento en los niveles extracelulares de ATP, los P2X7R emergen como grandes candidatos para modular la fuerza presináptica, dada su baja afinidad por este nucleótido [90]. Si bien la expresión celular y subcelular de estos receptores es un tema controversial, diversos reportes muestran que se expresan tanto en células gliales como en neuronas [99, 100, 171]. En nuestro modelo experimental observamos que los P2X7R colocalizan preferentemente con marcadores neuronales y que se expresan predominantemente en la terminal presináptica, coincidiendo con diversos reportes [98, 100, 171, 172]. Si bien observamos una baja proporción de P2X7R postsinápticos, consideramos que esto se debe principalmente a una limitación de la microscopía confocal que es incapaz de resolver las terminales pre y postsinápticas de manera independiente.

Por otra parte, nuestros resultados sugieren un rol esencial de los P2X7R en el ajuste homeostático de la fuerza presináptica. Así nos planteamos si este rol pudiera estar mediado por cambios en la distribución y/o abundancia de estos receptores o bien por cambios en su actividad. Observamos que no existen diferencias en el área, densidad y abundancia de los P2X7R presinápticos. Sin embargo, la permeabilidad de la membrana se incrementó por la activación de estos receptores. En este sentido, experimentos de captación de BrEt, muestran un aumento en la internalización de este marcador en respuesta a la supresión prolongada de la actividad neuronal. Interesantemente, dicho aumento se previene por el agregado de antagonistas específicos de los P2X7R. Con estos resultados podemos especular que el ajuste homeostático de la función presináptica involucra cambios en la actividad del receptor y como consecuencia en la permeabilidad de membrana. Los mecanismos moleculares que subyacen a este aumento en la permeabilidad del receptor

## **Discusión**

son materia de debate. Sin embargo, existe consenso en que la formación del poro de este receptor, permeable al BrEt [151], está modulada por segmentos específicos de su extremo C-terminal. En este sentido, la delección génica de los residuos 551-581 de esta región afectó tanto la formación del poro como la expresión de los P2X7R en la superficie celular [152].

Teniendo en cuenta la elevada permeabilidad al  $\text{Ca}^{+2}$  de estos receptores [29, 90], analizamos si la activación/bloqueo de los P2X7R promovía cambios en este parámetro [78, 134]. Cabe destacar que para cuantificar cambios en los niveles de  $\text{Ca}^{+2}$  analizamos la fluorescencia somática asociada al FLUO-4/AM. El análisis del  $\text{Ca}^{+2}$  somático para inferir cambios en la actividad neuronal constituye una técnica ampliamente utilizada en las neurociencias y una de las principales razones de ello, es que fluctuaciones a nivel somático de este ion son un reflejo de eventos eléctricos en las neuronas [173–175]. Si bien confirmamos que los niveles de  $\text{Ca}^{+2}$  neuronal aumentan en presencia de agonistas específicos de los P2X7R, mientras que lo contrario se observa frente a su bloqueo, resultaría interesante el uso de marcadores de  $\text{Ca}^{+2}$  genéticamente codificados tales como SynGCamp6F que permitiría la monitorización específica de los niveles de  $\text{Ca}^{+2}$  presináptico [176].

Por otra parte, la activación de los P2X7R también dio lugar a un aumento en el tamaño del pool de VS. Dicho aumento fue caracterizado mediante el análisis de la fluorescencia asociada al dominio luminal de la proteína vesicular Stg1. Este aumento podría estar determinado por un aumento en el reciclaje vesicular o por el aumento homeostático en la abundancia presináptica de la Stg1, sin cambios en el reciclaje vesicular. Sin embargo, la segunda opción puede descartarse gracias a un trabajo llevado adelante por Lazarevic y cols. en el que se analizó en detalle la reestructuración que experimenta la terminal presináptica durante la adaptación homeostática al silenciamiento de la actividad de la red. En este trabajo, se describieron niveles significativamente elevados de Stg1 sináptica, sin cambios en los niveles de expresión total de esta proteína, lo que sugiere que dicho incremento está determinado por una translocación de Stg1 desde un pool de vesículas no sinápticas hacia las sinapsis [45]. Es interesante resaltar que, en nuestros experimentos, el marcaje vesicular se realizó en cocultivos neurogliales *in vivo*, mediante la aplicación de un estímulo eléctrico

## **Discusión**

de campo luego de lavar la TTX del medio de cultivo (ver métodos para más detalles). Así, los resultados obtenidos mediante esta maniobra experimental podrían suponer que el aumento del tamaño del pool de VS experimentado tras la supresión de la actividad neuronal también involucra influjos de  $\text{Ca}^{+2}$  a través de vías dependientes de voltaje. Sin embargo, la disminución de fluorescencia de Stg1 observada en presencia de A804598 durante la inactividad crónica neuronal, demuestra que los influjos de  $\text{Ca}^{+2}$  a través de VGCC son insuficientes por si solos para promover el aumento en el tamaño del pool de VS. Para evaluar el aporte relativo de ambas vías por separado sería interesante analizar si en el hipocampo existen mecanismos de liberación vesicular dependientes de  $\text{Ca}^{+2}$  evocados exclusivamente por ATP, tal como se ha caracterizado en otros modelos [98, 177].

### **La PSH presináptica requiere la interacción entre los P2X7R y los Panx1HC**

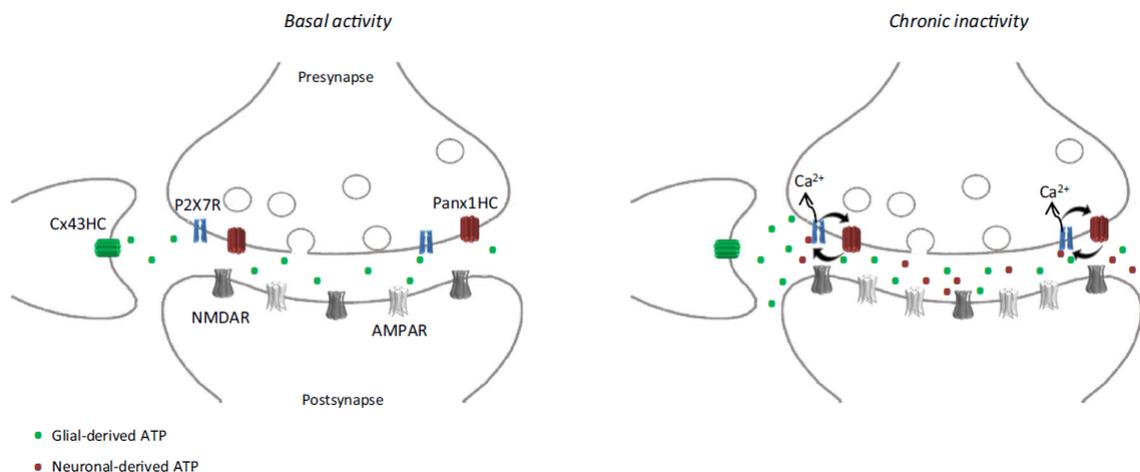
Numerosos autores reportaron que el poro asociado al P2X7R podría representar una propiedad intrínseca del propio receptor. Su activación sostenida generaría un reordenamiento de elementos del citoesqueleto dando lugar a la formación de un poro permeable [103, 104]. Sin embargo, otros autores sugieren que el poro asociado al P2X7R es una estructura separada del receptor, representada por un Panx1HC [110, 178]. En este segundo modelo, la activación del P2X7R sería necesaria para la apertura del poro de Panx1HC y el ATP liberado a través de esta vía reforzaría la activación de los P2X7R, operando como un *loop* de retroalimentación positiva [156, 179]. Resultados obtenidos por nuestro laboratorio refuerzan este segundo modelo. Nuestros hallazgos confirman que la potenciación homeostática de la función presináptica dependiente de la actividad requiere la liberación de ATP por Panx1HC. Interesantemente, el agregado de BzATP en co-cultivos tratados con PBD/TTX rescató la potenciación sináptica dependiente de los P2X7R durante la inactividad crónica, confirmando la existencia de un vínculo funcional entre P2X7R y Panx1HC. Con estos resultados, podemos especular que el bloqueo de Panx1HC impediría la liberación de ATP al espacio extracelular y, por consiguiente, la activación de los P2X7R necesaria para el aumento en los niveles de  $\text{Ca}^{+2}$  citosólico y del reciclaje vesicular. Estos resultados complementan los obtenidos por la MSc. Marina Tizzoni que confirman que los

## Discusión

canales de Panx1HC neuronales, y no los gliales, juegan un rol central en el ajuste homeostático de la función presináptica [1].

### Modelo de la PSH dependiente del ATP en el hipocampo murino

Una posible interpretación de estos resultados podría ser que las células gliales son capaces de sensor los cambios en la actividad y en respuesta a esto, medien los mecanismos necesarios para realizar el ajuste compensatorio de la función presináptica, mediante la coliberación de ATP junto a otros gliotransmisores que actúen a nivel neuronal. Una vez iniciada esta liberación, la activación de los P2X7R por el ATP derivado de los Cx43HC daría lugar a la entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  a la terminal presináptica. López y cols, caracterizaron mecanismos por medio de los cuales un aumento en los niveles de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular promueven la activación de Panx1HC [180] por lo que postulamos además que el aumento en los niveles de  $\text{Ca}^{+2}$  dependiente de los P2X7R promueve la apertura de Panx1HC. El ATP liberado a través de esta vía reforzaría la activación de los P2X7R mediante un bucle de retroalimentación positiva, promoviendo el incremento compensatorio del  $\text{Ca}^{+2}$  citosólico y el consecuente reciclaje vesicular y, por ende, el aumento de la función presináptica tras el bloqueo de la actividad sináptica (**Fig.18**).



**Fig. 18 Los receptores P2X7 y los hemicanales Panx1 modulan la plasticidad homeostática presináptica: vía hipotética.** Ante la inactividad crónica, los astrocitos detectan la reducción de la concentración de glutamato en la hendidura sináptica y, como consecuencia, aumentan la cantidad de ATP liberado por los hemicanales de conexina 43 (Cx43HCs). El ATP liberado por las células gliales activa los receptores presinápticos P2X7, aumentando la cantidad de  $\text{Ca}^{+2}$  que entra en la terminal y la probabilidad de liberación del neurotransmisor. Simultáneamente, el aumento de  $\text{Ca}^{+2}$  presináptico activa los hemicanales neuronales

## ***Discusión***

Panx1, lo que a su vez libera ATP, reforzando la activación de los receptores P2X7 mediante un bucle de retroalimentación positiva y promoviendo el incremento compensatorio de la función presináptica tras el bloqueo de la actividad sináptica [3].

## **Perspectivas**

La PSH ha sido definida como un mecanismo que promueve la estabilidad de la actividad neuronal, actuando en asociación con otros mecanismos plásticos implicados en el aprendizaje y la consolidación de la memoria. Recientemente, se ha planteado la posibilidad de la existencia de un link entre la neurodegeneración y mecanismos aberrantes en la PSH. La pérdida en la homeostasis de la excitabilidad neuronal llevaría al desarrollo de múltiples desordenes neurológicos y psiquiátricos tales como el autismo, la esquizofrenia y la depresión [181]. Así mismo, un desbalance en la PSH podría estar directamente involucrado en el desarrollo de enfermedades tales como el Parkinson, la enfermedad de Alzheimer y la esclerosis lateral amiotrófica[182].

Es por eso que planteamos como continuación de esta línea de investigación estudiar el rol de la señalización purinérgica y la PSH en condiciones patológicas, centrandó nuestro estudio en la enfermedad de Alzheimer donde se ha caracterizado una desregulación de la señalización purinérgica caracterizada para la PSH. [183, 184]. Esperamos que profundizar en el conocimiento generado en relación a la PSH a nivel de investigación básica, favorezca la comprensión de algunos trastornos del comportamiento, así como de la conducta normal.

## **Bibliografía**

### **Bibliografía**

1. Rafael A, Cairus A, Tizzoni M, et al (2020) Glial ATP and Large Pore Channels Modulate Synaptic Strength in Response to Chronic Inactivity. *Mol Neurobiol* 57:2856–2869. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-01919-0>
2. Rafael A, Tizzoni M, Justet C, et al (2024) Glial Cx43 hemichannels and neuronal Panx1 hemichannels and P2X7 receptors orchestrates presynaptic homeostatic plasticity. *Cell Signal* 117:1–25
3. Vitureira N, Rafael A, Abudara V (2023) P2X7 receptors and pannexin1 hemichannels shape presynaptic transmission. *Purinergic Signal* Sept 15:Epub ahead of print. PMID: 37713157. <https://doi.org/10.1007/s11302-023-09965-8>
4. Petrosini L, De Bartolo P, Foti F, et al (2009) On whether the environmental enrichment may provide cognitive and brain reserves. *Brain Res Rev* 61:221–239. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2009.07.002>
5. Mandolesi L, Gelfo F, Serra L, et al (2017) Environmental Factors Promoting Neural Plasticity: Insights from Animal and Human Studies. *Neural Plast* 2017:7219461. <https://doi.org/10.1155/2017/7219461>
6. Magee JC, Grienberger C (2020) Synaptic Plasticity Forms and Functions. *Annu Rev Neurosci* 43:95–117. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-090919-022842>
7. Citri A, Malenka RC (2008) Synaptic Plasticity: Multiple Forms, Functions, and Mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 33:18–41. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301559>
8. Yang Y, Calakos N (2013) Presynaptic long-term plasticity. *Front Synaptic Neurosci* 5:1–22. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2013.00008>
9. Bliss TVP, Gardner-Medwin AR (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232:357–374. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1973.sp010274>

## **Bibliografía**

10. Malenka RC, Bear MF, Abraham W, et al (2004) LTP and LTD. *Neuron* 44:5–21. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.09.012>
11. Castillo PE (2012) Presynaptic LTP and LTD of excitatory and inhibitory synapses. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4:. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005728>
12. Vituriera N, Letellier M, Goda Y (2012) Homeostatic synaptic plasticity: From single synapses to neural circuits. *Curr Opin Neurobiol* 22:516–521. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2011.09.006>
13. Turrigiano & Nelson (2000) Hebb and homeostasis in neuronal plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 10:358–364. <https://doi.org/https://doi.org/10.18438/eblip29427>
14. Turrigiano GG (1999) Homeostatic plasticity in neuronal networks: The more things change, the more they stay the same. *Trends Neurosci* 22:221–227. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(98\)01341-1](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(98)01341-1)
15. Murthy VN, Schikorski T, Stevens CF, Zhu Y (2001) Inactivity produces increases in neurotransmitter release and synapse size. *Neuron* 32:673–682. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00500-1](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00500-1)
16. Burrone J, O´Byrne M, Murthy VN (2002) Multiple forms of synaptic plasticity. *Nature* 420:414–418. <https://doi.org/10.1038/nature01179.1>.
17. Tokuoka H, Goda Y (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. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805705105>
18. Pozo K, Goda Y (2010) Unraveling mechanisms of homeostatic synaptic plasticity. *Neuron* 66:337–351. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.04.028>
19. Echegoyen J, Neu A, Graber KD, Soltesz I (2007) Homeostatic plasticity studies using in vivo hippocampal activity-blockade: Synaptic scaling, intrinsic plasticity and age-dependence. *PLoS One* 2:. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000700>
20. Turrigiano GG (2008) The Self-Tuning Neuron: Synaptic Scaling of Excitatory Synapses. *Cell* 135:422–435. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.10.008>

## **Bibliografía**

21. Kim J, Tsien RW (2008) Synapse-Specific Adaptations to Inactivity in Hippocampal Circuits Achieve Homeostatic Gain Control while Dampening Network Reverberation. *Neuron* 58:925–937. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.05.009>
22. del Castillo J, Katz B (1954) Quantal components of the end-plate potential. *J Physiol* 124:560–573. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1954.sp005129>
23. Huang CH, Bao J, Sakaba T (2010) Multivesicular release differentiates the reliability of synaptic transmission between the visual cortex and the somatosensory cortex. *J Neurosci* 30:11994–12004. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2381-10.2010>
24. Murthy VN (1998) Synaptic plasticity: Step-wise strengthening. *Curr Biol* 8:650–653. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(07\)00414-9](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(07)00414-9)
25. Körber C, Horstmann H, Venkataramani V, et al (2015) Modulation of Presynaptic Release Probability by the Vertebrate-Specific Protein Mover. *Neuron* 87:521–533. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.07.001>
26. Lazarevic V, Pothula S, Andres-Alonso M, Fejtova A (2013) Molecular mechanisms driving homeostatic plasticity of neurotransmitter release. *Front Cell Neurosci* 7:1–10. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00244>
27. Moulder KL, Meeks JP, Shute AA, et al (2004) Plastic Elimination of Functional Glutamate Release Sites by Depolarization. *Neuron* 42:423–435. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(04\)00184-9](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(04)00184-9)
28. Zhao CJ, Dreosti E, Lagnado L (2011) Homeostatic synaptic plasticity through changes in presynaptic calcium influx. *J Neurosci* 31:7492–7496. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6636-10.2011>
29. Südhof TC (2013) Neurotransmitter release: The last millisecond in the life of a synaptic vesicle. *Neuron* 80:675–690. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.022>
30. Perin MS, Fried VA, Mignery GA, et al (1990) Phospholipid binding by a synaptic vesicle protein homologous to the regulatory region of protein kinase C. *Nature* 345:260–3. <https://doi.org/10.1038/345260a0>

## **Bibliografía**

31. Fernández-Chacón R, Königstorfer A, Gerber SH, et al (2001) Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability. *Nature* 410:41–49. <https://doi.org/10.1038/35065004>
32. Fernández-Chacón R, Shin OH, Königstorfer A, et al (2002) Structure/function analysis of Ca<sup>2+</sup> binding to the C2A domain of synaptotagmin 1. *J Neurosci* 22:8438–8446. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-19-08438.2002>
33. Pang ZP, Südhof TC (2010) Cell biology of Ca<sup>2+</sup>-triggered exocytosis. *Curr Opin Cell Biol* 22:496–505. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2010.05.001>
34. Südhof TC, Rothman JE (2009) Membrane fusion: Grappling with SNARE and SM proteins. *Science* (80- ) 323:474–477. <https://doi.org/10.1126/science.1161748>
35. Ramakrishnan NA, Drescher MJ, Drescher DG (2012) The SNARE complex in neuronal and sensory cells. *Mol Cell Neurosci* 50:58–69. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2012.03.009>
36. Sørensen JB, Matti U, Wei SH, et al (2002) The SNARE protein SNAP-25 is linked to fast calcium triggering of exocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:1627–1632. <https://doi.org/10.1073/pnas.251673298>
37. Maximov A, Tang J, Yang X, et al (2009) Complexin Controls the Force Transfer from SNARE Complexes to Membranes in Fusion. *Science* (80- ) 323:516–521. <https://doi.org/10.1126/science.1166505>
38. Tang J, Maximov A, Shin OH, et al (2006) A Complexin/Synaptotagmin 1 Switch Controls Fast Synaptic Vesicle Exocytosis. *Cell* 126:1175–1187. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.08.030>
39. Rizzoli SO, Betz WJ (2005) Synaptic vesicle pools. *Nat Rev Neurosci* 6:57–69. <https://doi.org/10.1038/nrn1583>
40. Südhof TC (2004) The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci* 27:509–547. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.26.041002.131412>
41. Murthy VN, Stevens CF (1998) Synaptic vesicles retain their identity through the

## **Bibliografía**

- endocytic cycle. *Nature* 392:497–501. <https://doi.org/10.1038/33152>
42. Murthy VN, Stevens CF (1999) Reversal of synaptic vesicle docking at central synapses. *Nat Neurosci* 2:503–507. <https://doi.org/10.1038/9149>
  43. Alabi A a., Tsien RW (2012) Synaptic vesicle pools and dynamics. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4:1–18. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a013680>
  44. Kaeser PS, Regehr WG (2017) The readily releasable pool of synaptic vesicles. *Curr Opin Neurobiol* 43:63–70. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2016.12.012>
  45. Lazarevic V, Schöne C, Heine M, et al (2011) Extensive remodeling of the presynaptic cytomatrix upon homeostatic adaptation to network activity silencing. *J Neurosci* 31:10189–10200. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2088-11.2011>
  46. Korber C, Kuner T (2016) Molecular machines regulating the release probability of synaptic vesicles at the active zone. *Front Synaptic Neurosci* 8:1–17. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2016.00005>
  47. Sakaba T, Neher E (2003) Involvement of actin polymerization in vesicle recruitment at the calyx of held synapse. *J Neurosci* 23:837–846. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-03-00837.2003>
  48. Luo L (2002) Actin cytoskeleton regulation in neuronal morphogenesis and structural plasticity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 18:601–635. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.18.031802.150501>
  49. Kim SH, Ryan TA (2010) CDK5 Serves as a Major Control Point in Neurotransmitter Release. *Neuron* 67:797–809. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.08.003>
  50. Dulubova I, Lou X, Lu J, et al (2005) A Munc13/RIM/Rab3 tripartite complex: From priming to plasticity? *EMBO J* 24:2839–2850. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600753>
  51. Takai Y, Sasaki T, Shirataki H, Nakanishi H (1996) Rab3A small GTP-binding protein in Ca<sup>2+</sup>-dependent exocytosis. *Genes to Cells* 1:615–632. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.1996.00257.x>

## **Bibliografía**

52. Kawabe H, Mitkovski M, Kaeser PS, et al (2017) Correction: ELKS1 localizes the synaptic vesicle priming protein bMunc13-2 to a specific subset of active zones. *J Cell Biol* 216:1205–1205. <https://doi.org/10.1083/jcb.20160608603092017c>
53. Fischer G, Mignery GA, Baumert M, et al (1990) rab3 is a small GTP-binding protein exclusively localized to synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:1988–1992. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.5.1988>
54. Davis GW, DiAntonio A, Petersen SA, Goodman CS (1998) Postsynaptic PKA controls quantal size and reveals a retrograde signal that regulates presynaptic transmitter release in *Drosophila*. *Neuron* 20:305–315. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80458-4](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80458-4)
55. Fernandes D, Carvalho AL (2016) Mechanisms of homeostatic plasticity in the excitatory synapse. *J Neurochem* 139:973–996. <https://doi.org/10.1111/jnc.13687>
56. Müller M, Genç Ö, Davis GW (2015) RIM-Binding Protein Links Synaptic Homeostasis to the Stabilization and Replenishment of High Release Probability Vesicles. *Neuron* 85:1056–1069. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.01.024>
57. Delvendahl I, Müller M (2019) Homeostatic plasticity—a presynaptic perspective. *Curr Opin Neurobiol* 54:155–162. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.10.003>
58. Yashiro K, Corlew R, Philpot BD (2005) Visual deprivation modifies both presynaptic glutamate release and the composition of perisynaptic/extrasynaptic NMDA receptors in adult visual cortex. *J Neurosci* 25:11684–11692. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4362-05.2005>
59. Yashiro K, Philpot BD (2008) Regulation of NMDA receptor subunit expression and its implications for LTD, LTP, and metaplasticity. *Neuropharmacology* 55:1081–1094. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.07.046>
60. Ratnayaka A, Marra V, Bush D, et al (2012) Recruitment of resting vesicles into recycling pools supports NMDA receptor-dependent synaptic potentiation in cultured hippocampal neurons. *J Physiol* 590:1585–1597.

## **Bibliografía**

<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.226688>

61. Matz J, Gilyan A, Kolar A, et al (2010) Rapid structural alterations of the active zone lead to sustained changes in neurotransmitter release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:8836–8841. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906087107>
62. Holderith N, Lorincz A, Katona G, et al (2012) Release probability of hippocampal glutamatergic terminals scales with the size of the active zone. *Nat Neurosci* 15:988–997. <https://doi.org/10.1038/nn.3137>
63. Schikorski T, Stevens CF (1997) Quantitative Ultrastructural Analysis of Hippocampal. *J Neurosci* 17:5858–5867
64. Herman M a., Ackermann F, Trimbuch T, Rosenmund C (2014) Vesicular glutamate transporter expression level affects synaptic vesicle release probability at hippocampal synapses in culture. *J Neurosci* 34:11781–11791. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1444-14.2014>
65. Wojcik SM, Rhee JS, Herzog E, et al (2004) An essential role for vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1) in postnatal development and control of quantal size. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:7158–63. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401764101>
66. Wilson NR (2005) Presynaptic Regulation of Quantal Size by the Vesicular Glutamate Transporter VGLUT1. *J Neurosci* 25:6221–6234. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3003-04.2005>
67. Lau CG, Murthy VN (2012) Activity-dependent regulation of inhibition via GAD67. *J Neurosci* 32:8521–8531. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1245-12.2012>
68. de Jong APH, Schmitz SK, Toonen RFG, Verhage M (2012) Dendritic position is a major determinant of presynaptic strength. *J Cell Biol* 197:327–337. <https://doi.org/10.1083/jcb.201112135>
69. Katz B, Miledi R (1967) Ionic requirements of synaptic transmitter release [42]. *Nature* 215:651. <https://doi.org/10.1038/215651a0>
70. Südhof TC (2012) Calcium control of neurotransmitter release. *Cold Spring Harb*

## **Bibliografía**

- Perspect Biol 4: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011353>
71. Wu LG, Westenbroek RE, Borst JGG, et al (1999) Calcium channel types with distinct presynaptic localization couple differentially to transmitter release in single calyx-type synapses. *J Neurosci* 19:726–736. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.19-02-00726.1999>
  72. Stanley EF (1997) The calcium channel and the organization of the presynaptic transmitter release face. *Trends Neurosci* 20:404–409. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(97\)01091-6](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(97)01091-6)
  73. Llinás R, Steinberg IZ, Walton K (1981) Relationship between presynaptic calcium current and postsynaptic potential in squid giant synapse. *Biophys J* 33:323–351. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(81\)84899-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(81)84899-0)
  74. Catterall WA (1999) Interactions of presynaptic Ca<sup>2+</sup> channels and snare proteins in neurotransmitter release. *Ann N Y Acad Sci* 868:144–159. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb11284.x>
  75. Llinás R, Sugimori M, Silver RB (1995) The concept of calcium concentration microdomains in synaptic transmission. *Neuropharmacology* 34:1443–1451. [https://doi.org/10.1016/0028-3908\(95\)00150-5](https://doi.org/10.1016/0028-3908(95)00150-5)
  76. Simon SM, Llinás RR (1985) Compartmentalization of the submembrane calcium activity during calcium influx and its significance in transmitter release. *Biophys J* 48:485–498. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(85\)83804-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(85)83804-2)
  77. Tropea D, Kreiman G, Lyckman A, et al (2006) Gene expression changes and molecular pathways mediating activity-dependent plasticity in visual cortex. *Nat Neurosci* 9:660–668. <https://doi.org/10.1038/nn1689>
  78. Jeans AF, van Heusden FC, Al-Mubarak B, et al (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. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.09.061>

## **Bibliografía**

79. Zhuang X, Wong NF, Sun W, Xu-Friedman MA (2020) Mechanisms and functional consequences of presynaptic homeostatic plasticity at auditory nerve synapses. *J Neurosci* 40:6896–6909. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1175-19.2020>
80. Rátkai A, Tárnok K, Aouad H El, et al (2021) Homeostatic plasticity and burst activity are mediated by hyperpolarization-activated cation currents and T-type calcium channels in neuronal cultures. *Sci Rep* 11:1–17. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82775-3>
81. Kwon SK, Sando R, Lewis TL, et al (2016) LKB1 Regulates Mitochondria-Dependent Presynaptic Calcium Clearance and Neurotransmitter Release Properties at Excitatory Synapses along Cortical Axons. *PLoS Biol* 14:1–27. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002516>
82. Horton AC, Ehlers MD (2003) Neuronal polarity and trafficking. *Neuron* 40:277–295. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00629-9](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00629-9)
83. Attwell D, Laughlin SB (2001) An Energy Budget for Signaling in the Grey Matter of the Brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 21:1133–1145. <https://doi.org/10.1097/00004647-200110000-00001>
84. Vergara RC, Jaramillo-Riveri S, Luarte A, et al (2019) The Energy Homeostasis Principle: Neuronal Energy Regulation Drives Local Network Dynamics Generating Behavior. *Front Comput Neurosci* 13:1–18. <https://doi.org/10.3389/fncom.2019.00049>
85. Cunha RA, Ribeiro JA (2000) ATP as a presynaptic modulator. *Life Sci* 68:119–137. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(00\)00923-1](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(00)00923-1)
86. Pankratov Y, Lalo U, Verkhratsky A, North RA (2006) Vesicular release of ATP at central synapses. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 452:589–597. <https://doi.org/10.1007/s00424-006-0061-x>
87. Burnstock G (2006) Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends Pharmacol Sci* 27:166–176. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2006.01.005>

## **Bibliografía**

88. Burnstock G, Campbell G, Satchell D, Smythe A (1997) Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by nonadrenergic inhibitory nerves in the gut (Reprinted from Brit J Pharmacol, vol 40, pg 668-688, 1970). Br J Pharmacol 120:337–357. <https://doi.org/WOS:A1997WU05900045>
89. Verkhratsky A, Krishtal O (2010) Adenosine Triphosphate (ATP) as a Neurotransmitter. *Encycl Neurosci* 1:115–123. <https://doi.org/10.1016/B978-008045046-9.01245-6>
90. North R a (2002) Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* 82:1013–67. <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2002>
91. North RA, Verkhratsky A (2006) Purinergic transmission in the central nervous system. *Eur J Physiol* 452:479–485. <https://doi.org/10.1007/s00424-006-0060-y>
92. Guzman SJ, Gerevich Z (2016) P2Y Receptors in Synaptic Transmission and Plasticity: Therapeutic Potential in Cognitive Dysfunction. *Neural Plast* 2016:1–12. <https://doi.org/10.1155/2016/1207393>
93. Cunha RA, Milusheva E, Vizi ES, et al (1994) Excitatory and inhibitory effects of A1 and A2A adenosine receptor activation on the electrically evoked [3H]acetylcholine release from different areas of the rat hippocampus. *J Neurochem* 63:207–214
94. Yamazaki Y, Kaneko K, Fujii S, et al (2003) Long-term potentiation and long-term depression induced by local application of ATP to hippocampal CA1 neurons of the guinea pig. *Hippocampus* 13:81–92. <https://doi.org/10.1002/hipo.7999>
95. Lisman J (1994) The CaM kinase II hypothesis for the storage of synaptic memory. *Trends Neurosci* 17:406–412. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(94\)90014-0](https://doi.org/10.1016/0166-2236(94)90014-0)
96. Yamazaki Y, Fujii S (2015) Extracellular ATP modulates synaptic plasticity induced by activation of metabotropic glutamate receptors in the hippocampus. *Biomed Res* 36:1–9. <https://doi.org/10.2220/biomedres.36.1>
97. Sluyter R (2017) The P2X7 Receptor. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. pp 17–53

## **Bibliografía**

98. Sperlagh B, Kofalvi A, Deuchars J, et al (2002) Involvement of P2X7 receptors in the regulation of neurotransmitter release in the rat hippocampus. *J Neurochem* 81:1196–1211. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.00920.x>.
99. Kukley M, Barden J, Steinhäuser C, Jabs R (2001) Distribution of P2x receptors on astrocytes in juvenile rat hippocampus. *Glia* 36:11–21. <https://doi.org/10.1002/glia.1091>
100. Deuchars SA, Atkinson L, Brooke RE, et al (2001) Neuronal P2X7 Receptors Are Targeted to Presynaptic Terminals in the Central and Peripheral Nervous Systems. *J Neurosci* 21:7143–7152. <https://doi.org/21/18/7143> [pii]
101. Ireland MF, Noakes PG, Bellingham MC (2004) P2X 7-like receptor subunits enhance excitatory synaptic transmission at central synapses by presynaptic mechanisms. *Neuroscience* 128:269–280. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.06.014>
102. Duan S, Anderson CM, Keung EC, et al (2003) P2X7 receptor-mediated release of excitatory amino acids from astrocytes. *J Neurosci* 23:1320–1328. <https://doi.org/23/4/1320> [pii]
103. Duan S, Neary J (2006) P2X7 Receptors: Properties and relevance to CNS function. *Glia* 54:738–746. <https://doi.org/10.1002/glia>
104. Martínez-cuesta MÁ, Blanch-ruiz MA, Ortega-luna R, et al (2020) Structural and functional basis for understanding the biological significance of p2x7 receptor. *Int J Mol Sci* 21:1–23. <https://doi.org/10.3390/ijms21228454>
105. Compan V, Ulmann L, Stelmashenko O, et al (2012) P2X2 and P2X5 subunits define a new heteromeric receptor with P2X7-like properties. *J Neurosci* 32:4284–4296. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6332-11.2012>
106. Antonio LS, Stewart AP, Xu XJ, et al (2011) P2X4 receptors interact with both P2X2 and P2X7 receptors in the form of homotrimers. *Br J Pharmacol* 163:1069–1077. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01303.x>
107. Karasawa A, Kawate T (2016) Structural basis for subtype-specific inhibition of the

## **Bibliografía**

- P2X7 receptor. *Elife* 5:1–17. <https://doi.org/10.7554/eLife.22153>
108. Marcoli M, Cervetto C, Paluzzi P, et al (2008) P2X7 pre-synaptic receptors in adult rat cerebrocortical nerve terminals: a role in ATP-induced glutamate release. *J Neurochem* 105:2330–2342. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05322.x>
109. Abbracchio MP, Burnstock G, Verkhratsky A, Zimmermann H (2009) Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends Neurosci* 32:19–29. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.10.001>
110. Pelegrin P, Surprenant A (2006) Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1 release by the ATP-gated P2X7 receptor. *EMBO J* 25:5071–5082. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601378>
111. Khakh, Baljit S. & North AR (2012) Neuromodulation by extracellular ATP and P2X receptors in the CNS. 76:51–69. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2011.02.012>. *Investigations*
112. Gordon GRJ, Baimoukhametova D V, Hewitt S a, et al (2005) Norepinephrine triggers release of glial ATP to increase postsynaptic efficacy. *Nat Neurosci* 8:1078–1086. <https://doi.org/10.1038/nn1498>
113. Campos RC, Parfitt GM, Polese CE, et al (2014) Pharmacological blockage and P2X7 deletion hinder aversive memories: Reversion in an enriched environment. *Neuroscience* 280:220–230. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.09.017>
114. Diaz-Hernandez JI, Gomez-Villafuertes R, León-Otegui M, et al (2012) In vivo P2X7 inhibition reduces amyloid plaques in Alzheimer’s disease through GSK3 $\beta$  and secretases. *Neurobiol Aging* 33:1816–1828. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.09.040>
115. Miras-Portugal MT, Diaz-Hernandez JI, Gomez-Villafuertes R, et al (2015) Role of P2X7 and P2Y2 receptors on AB-secretase-dependent APP processing: Control of amyloid plaques formation “in vivo” by P2X7 receptor. *Comput Struct Biotechnol J* 13:176–181. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2015.02.005>

## **Bibliografía**

116. Martin E, Amar M, Dalle C, et al (2019) New role of P2X7 receptor in an Alzheimer's disease mouse model. *Mol Psychiatry* 24:108–125. <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0108-3>
117. Huang Q, Ying J, Yu W, et al (2023) P2X7 Receptor: an Emerging Target in Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol* Nov.:1–15. <https://doi.org/10.1007/s12035-023-03699-9>
118. Liu Y, Shen X, Zhang Y, et al (2023) Interactions of glial cells with neuronal synapses, from astrocytes to microglia and oligodendrocyte lineage cells. *Glia* 71:1383–1401. <https://doi.org/10.1002/glia.24343>
119. Simons M, Nave KA (2016) Oligodendrocytes: Myelination and axonal support. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8:1–15. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020479>
120. Chen Z, Trapp BD (2016) Microglia and neuroprotection. *J Neurochem* 136:10–17. <https://doi.org/10.1111/jnc.13062>
121. Araque A, Navarrete M (2010) Glial cells in neuronal network function. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 365:2375–2381. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0313>
122. Wake H, Moorhouse AJ, Jinno S, et al (2009) Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *J Neurosci* 29:3974–3980. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4363-08.2009>
123. Volterra A, Meldolesi J (2005) Astrocytes, from brain glue to communication elements: The revolution continues. *Nat Rev Neurosci* 6:626–640. <https://doi.org/10.1038/nrn1722>
124. Abreu DS, Gomes JI, Ribeiro FF, et al (2023) Astrocytes control hippocampal synaptic plasticity through the vesicular-dependent release of D-serine. *Front Cell Neurosci* 17:1–14. <https://doi.org/10.3389/fncel.2023.1282841>
125. Angulo MC, Kozlov AS, Charpak S, Audinat E (2004) Glutamate released from glial cells synchronizes neuronal activity in the hippocampus. *J Neurosci* 24:6920–6927. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0473-04.2004>
126. Pascual O, Casper KB, Kubera C, et al (2005) Astrocytic purinergic signaling

## **Bibliografía**

- coordinates synaptic networks. *Science* (80- ) 310:113–116.  
<https://doi.org/10.1126/science.1116916>
127. Coyle JT, Balu D, Wolosker H (2020) D-Serine, the shape-shifting NMDA receptor co-agonist. *Neurochem Res* 45:1344–1353. <https://doi.org/10.1007/s11064-020-03014-1>
128. Navarrete M, Perea G, de Sevilla DF, et al (2012) Astrocytes mediate in vivo cholinergic-induced synaptic plasticity. *PLoS Biol* 10:1–12.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001259>
129. Cunha RA, Sebastião AM, Ribeiro JA (2018) Inhibition by ATP of Hippocampal Synaptic Transmission Requires Localized Extracellular Catabolism by Ecto-Nucleotidases into Adenosine and Channeling to Adenosine A<sub>1</sub> Receptors. *J Neurosci* 18:1987–1995. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.18-06-01987.1998>
130. Pankratov Y V, Lalo U V, Krishtal O a (2002) Role for P2X receptors in long-term potentiation. *J Neurosci* 22:8363–8369
131. Wang Y, Haughey NJ, Mattson MP, Furukawa K (2004) Dual effects of ATP on rat hippocampal synaptic plasticity. *Neuroreport* 15:633–636.  
<https://doi.org/10.1097/00001756-200403220-00012>
132. Branco T, Staras K, Darcy KJ, Goda Y (2008) Local Dendritic Activity Sets Release Probability at Hippocampal Synapses. *Neuron* 59:475–485.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.07.006>
133. Turrigiano GG, Leslie KR, Desai NS, et al (1998) Activity-dependent scaling of quantal amplitude in neocortical neurons. *Nature* 391:892–896.  
<https://doi.org/10.1038/36103>
134. Vitreira N, Letellier M, White IJ, Goda Y (2012) Differential control of presynaptic efficacy by postsynaptic N-cadherin and  $\beta$ -catenin. *Nat Neurosci* 15:81–89.  
<https://doi.org/10.1038/nn.2995>
135. Ralevic V, Burnstock G (1998) Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev*

## **Bibliografía**

- 50:413–492. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-28863-0\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-642-28863-0_5)
136. Donnelly-Roberts DL, Namovic MT, Surber B, et al (2009) [3H]A-804598 ([3H]2-cyano-1-[(1S)-1-phenylethyl]-3-quinolin-5-ylguanidine) is a novel, potent, and selective antagonist radioligand for P2X7 receptors. *Neuropharmacology* 56:223–229. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.06.012>
137. Köles L, Fürst S, Illes P (2007) Purine ionotropic (P2X) receptors. *Curr Pharm Des* 13:2368–2384. <https://doi.org/10.2174/138161207781368747>
138. Ryan TA, Smith SJ (1995) Vesicle pool mobilization during action potential firing at hippocampal synapses. *Neuron* 14:983–989. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90336-4](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90336-4)
139. Justet C, Chifflet S, Hernandez JA (2019) Calcium oscillatory behavior and its possible role during wound healing in bovine corneal endothelial cells in culture. *Biomed Res Int* 2019:11–16. <https://doi.org/10.1155/2019/8647121>
140. Schindelin J, Arganda-Carrera I, Frise E, et al (2012) Fiji - an Open platform for biological image analysis. *Nat Methods* 9:676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019.Fiji>
141. Arganda-Carreras I, Kaynig V, Schindelin J, et al (2014) Trainable Weka Segmentation: A Machine Learning Tool for Microscopy Image Segmentation. *Neurosci 2014 Short Course 2 - Adv Brain-scale, Autom Anat Tech Neuronal Reconstr Tract Tracing, Atlasing* 73--80
142. Dunn KW, Kamocka MM, McDonald JH (2011) A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. *Am J Physiol Physiol* 300:C723–C742. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00462.2010>
143. Turrigiano G (2012) Homeostatic synaptic plasticity: Local and global mechanisms for stabilizing neuronal function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4:1–17. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005736>
144. Rusakov DA, Fine A (2003) Extracellular Ca<sup>2+</sup> Depletion Contributes to Fast Activity-

## **Bibliografía**

- Dependent Modulation of Synaptic Transmission in the Brain. *Neuron* 37:287–297
145. Wieraszko A (1996) Extracellular ATP as a neurotransmitter: Its role in synaptic plasticity in the hippocampus. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 56:637–648
146. Boué-Grabot E, Pankratov Y (2017) Modulation of Central Synapses by Astrocyte-Released ATP and Postsynaptic P2X Receptors. *Neural Plast* 2017:.. <https://doi.org/10.1155/2017/9454275>
147. Hassel B, Paulsen RE, Johnsen A, Fonnum F (1992) Selective inhibition of glial cell metabolism in vivo by fluorocitrate. *Brain Res* 576:120–124. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(92\)90616-H](https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)90616-H)
148. Shang XL, Wang QB, Liu XP, et al (2015) Fluorocitrate induced the alterations of memory-related proteins and tau hyperphosphorylation in SD rats. *Neurosci Lett* 584:230–235. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.10.036>
149. Khakh BS (2001) Molecular physiology of P2X receptors and ATP signalling at synapses. *Nat Rev Neurosci* 2:165–174. <https://doi.org/10.1038/35058521>
150. Liu D, Yang Q, Li S (2013) Activation of extrasynaptic NMDA receptors induces LTD in rat hippocampal CA1 neurons. *Brain Res Bull* 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2012.12.003>
151. Sperlágh B, Vizi ES, Wirkner K, Illes P (2006) P2X7 receptors in the nervous system. *Prog Neurobiol* 78:327–346. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2006.03.007>
152. Smart ML, Gu B, Panchal RG, et al (2003) P2X7 receptor cell surface expression and cytolytic pore formation are regulated by a distal C-terminal region. *J Biol Chem* 278:8853–8860. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211094200>
153. Kraszewski K, Mundigl O, Daniell L, et al (1995) Synaptic vesicle dynamics in living cultured hippocampal neurons visualized with CY3-conjugated antibodies directed against the luminal domain of synaptotagmin. *J Neurosci* 15:4328–42
154. Cheung G, Chever O, Rouach N (2014) Connexons and pannexons: Newcomers in neurophysiology. *Front Cell Neurosci* 8:1–19.

## **Bibliografía**

- <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00348>
155. Surprenant A, Kawashima E, Rassendren F, et al (1996) The cytolytic P2z receptor for extracellular ATP identified as a P2x receptor ( P2X7 ). *Science* (80- ) 272:735–738. <https://doi.org/doi: 10.1126/science.272.5262.735>.
  156. Purohit R, Bera AK (2021) Pannexin 1 plays a pro-survival role by attenuating P2X7 receptor-mediated Ca<sup>2+</sup> influx. *Cell Calcium* 99:102458. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2021.102458>
  157. Vituriera N, Letellier M, White I, Goda Y (2012) Differential control of presynaptic efficacy by postsynaptic N-cadherin and  $\beta$ -catenin. *Nat Neurosci* 15:81–89. <https://doi.org/10.1038/nn.2995>
  158. Rash JE, Yasumura T, Davidson KGV, et al (2001) Identification of cells expressing Cx43, Cx30, Cx26, Cx32 and Cx36 in gap junctions of rat brain and spinal cord. *Cell Commun Adhes* 8:315–320. <https://doi.org/10.3109/15419060109080745>
  159. Roux L, Madar A, Lacroix MM, et al (2015) Astroglial connexin 43 hemichannels modulate olfactory bulb slow oscillations. *J Neurosci* 35:15339–15352. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0861-15.2015>
  160. Cheung G, Chever O, Rollenhagen A, et al (2023) Astroglial connexin 43 regulates synaptic vesicle release at hippocampal synapses. *Cells* 12:1–16. <https://doi.org/10.3390/cells12081133>
  161. Senior AE (1988) ATP synthesis by oxidative phosphorylation. *Physiol Rev* 68:177–231. <https://doi.org/10.1152/physrev.1988.68.1.177>
  162. Fields RD, Stevens B (2000) ATP: An extracellular signaling molecule between neurons and glia. *Trends Neurosci* 23:625–633. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(00\)01674-X](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(00)01674-X)
  163. Verderio C, Matteoli M (2011) ATP in neuron-glia bidirectional signalling. *Brain Res Rev* 66:106–114. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2010.04.007>
  164. Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG (1999) Tripartite synapses: Glia, the

## **Bibliografía**

- unacknowledged partner. *Trends Neurosci.* 22:208–215
165. Araque A, Perea G (2004) Glial modulation of synaptic transmission in culture. *Glia* 47:241–248. <https://doi.org/10.1002/glia.20026>
166. Perea G, Navarrete M, Araque A (2009) Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci* 32:421–431. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2009.05.001>
167. Perez-Alvarez A, Navarrete M, Covelo A, et al (2014) Structural and functional plasticity of astrocyte processes and dendritic spine interactions. *J Neurosci* 34:12738–12744. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2401-14.2014>
168. Haydon PG (2001) Glia: Listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci* 2:185–193. <https://doi.org/10.1038/35058528>
169. Wang J, Xu T, Murugan M, et al (2017) TNF- $\alpha$  Differentially Regulates Synaptic Plasticity in the Hippocampus and Spinal Cord by Microglia-Dependent Mechanisms after Peripheral Nerve Injury. *J Neurosci* 37:871–881. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.2235-16.2017>
170. Heir R, Stellwagen D (2020) TNF-Mediated Homeostatic Synaptic Plasticity: From in vitro to in vivo Models. *Front Cell Neurosci* 14:1–12. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.565841>
171. Miras-Portugal MT, Ortega F, Gómez-Villafuertes R, et al (2021) P2X7 receptors in the central nervous system. *Biochem Pharmacol* 187:. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114472>
172. Atkinson L, Batten TFC, Moores TS, et al (2004) Differential co-localisation of the P2X7 receptor subunit with vesicular glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in rat CNS. *Neuroscience* 123:761–768. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2003.08.065>
173. Sasaki T, Takahashi N, Matsuki N, Ikegaya Y (2008) Calcium Fluctuations. *J Neurophysiol* 100:1668–1676. <https://doi.org/10.1152/jn.00084.2008>.

## **Bibliografía**

174. Franconville R, Revet G, Astorga G, et al (2011) Somatic calcium level reports integrated spiking activity of cerebellar interneurons in vitro and in vivo. *J Neurophysiol* 106:1793–1805. <https://doi.org/10.1152/jn.00133.2011>.
175. Ali F, Kwan AC (2020) Interpreting in vivo calcium signals from neuronal cell bodies , axons , and dendrites : a review Interpreting in vivo calcium signals from neuronal cell bodies , axons , and dendrites : a review. *Neurophotonics* 7:011402-1-011402–12. <https://doi.org/10.1117/1.NPh.7.1.011402>
176. Brockhaus J, Brügger B, Missler M (2019) Imaging and analysis of presynaptic calcium influx in cultured neurons using syngcamp6f. *Front Synaptic Neurosci* 11:1–12. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2019.00012>
177. Boehm S (1999) ATP stimulates sympathetic transmitter release via presynaptic P2X purinoceptors. *J Neurosci* 19:737–746. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.19-02-00737.1999>
178. Chiu YH, Schappe MS, Desai BN, Bayliss DA (2018) Revisiting multimodal activation and channel properties of Pannexin 1. *J Gen Physiol* 150:19–39. <https://doi.org/10.1085/jgp.201711888>
179. Purohit R, Bera AK (2023) Carboxyl terminus of Pannexin-1 plays a crucial role in P2X7 receptor-mediated signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 664:20–26. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2023.04.081>
180. López X, Palacios-Prado N, Güiza J, et al (2021) A physiologic rise in cytoplasmic calcium ion signal increases pannexin1 channel activity via a C-terminus phosphorylation by CaMKII. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118:1–10. <https://doi.org/10.1073/pnas.2108967118>
181. Wondolowski J, Dickman D (2013) Emerging links between homeostatic synaptic plasticity and neurological disease. *Front Cell Neurosci* 7:1–9. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00223>
182. Taylor HBC, Jeans AF (2021) Friend or Foe? The Varied Faces of Homeostatic Synaptic

## **Bibliografía**

- Plasticity in Neurodegenerative Disease. *Front Cell Neurosci* 15:1–10.  
<https://doi.org/10.3389/fncel.2021.782768>
183. Zhang C, Rissman RA, Feng J (2015) Characterization of ATP alternations in an Alzheimer's disease transgenic mouse model. *J Alzheimer's Dis* 44:375–378.  
<https://doi.org/10.3233/JAD-141890>
184. McLarnon JG, Ryu JK, Walker DG, Choi HB (2006) Upregulated Expression of Purinergic P2X 7 Receptor in Alzheimer Disease and Amyloid- $\beta$  Peptide-Treated Microglia and in Peptide-Injected Rat Hippocampus. *J Neuropathol Exp Neurol* 65:1090–1097. <https://doi.org/10.1097/01.jnen.0000240470.97295.d3>