

Laboratorio de Comunicación Sináptica, Departamento de
Fisiología, Facultad de Medicina, UdelaR.

Tesina de grado para la Licenciatura en bioquímica

IMPORTANCIA DE LAS CÉLULAS GLIALES EN PROCESOS DE PLASTICIDAD SINÁPTICA HOMEOSTÁTICA

BACH. IVANNA BRAY

Orientador: Nathalia Vitureira, PhD.

Montevideo, Uruguay

2015

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todos los que de alguna forma formaron parte de este trabajo:

A Nathalia Vitureira por la orientación y tutoría.

A Francesco Rossi por la revisión del trabajo.

Al personal del laboratorio de virología de Facultad de Ciencias, que nos prestó la sala de cultivo mientras refaccionaban la de Facultad de Medicina.

A todo el Departamento de histología de la Facultad de Medicina por permitirnos utilizar su sala de cultivo y ayudarnos cada vez que lo necesitamos, en especial a Patricia Cassina, Laura Martínez, Ernesto Miquel, Sebastián Rodríguez y Valentina Lagos.

A Alicia Costa, Luciana Benedetto y Verónica Abudara por la colaboración en los experimentos.

A Hugo Peluffo por la donación de anticuerpos.

A Marcela Alsina y a los integrantes del laboratorio de genética por la ayuda brindada en el día a día.

A Mariela Santos, Martín Breijo y todo el personal de U.R.B.E.

A Marcela Díaz por la orientación al utilizar el microscopio confocal del Instituto Pasteur.

A Mariana Firpi por la orientación al utilizar el microscopio de epifluorescencia de la Facultad de Medicina.

A mi familia, por el apoyo brindado durante este tiempo, especialmente a Adrian, Graciela, Mathías, Laila, Edda y Mario.

A mis amigos y compañeros, los que compartieron parte de la carrera conmigo y los que no, que por suerte son muchos para nombrarlos y no quiero olvidarme de ninguno.

Índice

Resumen	4
Introducción	5
Objetivo	20
Materiales y métodos	21
Resultados	26
Discusión	38
Conclusiones	43
Bibliografía.....	44

Resumen

La actividad neural se encuentra bajo dos requerimientos opuestos: la necesidad de cambio y la necesidad de estabilidad. Los cambios en la actividad neural se producen mediante alteraciones en el número y fuerza de las conexiones sinápticas, de forma dependiente de la actividad neuronal, y permite que las propiedades del circuito se refinan con la experiencia. Resulta interesante cuestionar como se mantiene cierto grado de constancia en las propiedades básicas de un circuito cuando este necesita tanto del cambio como de la estabilidad. Recientemente se ha identificado un tipo de plasticidad sináptica denominada “Plasticidad Sináptica Homeostática”, la cual se propone, es la encargada de mantener la estabilidad del circuito. Este tipo de plasticidad se define como un mecanismo de “*feedback negativo*” utilizado por las neuronas para compensar la excitación o inhibición excesivas mediante el ajuste de la eficacia sináptica (Pozo and Goda, 2010).

No hasta hace poco tiempo, la transferencia y el procesamiento de información en el sistema nervioso eran considerados procesos llevados a cabo exclusivamente por las neuronas. Sin embargo, recientemente se ha identificado que las células gliales desempeñan un rol mucho más activo en estos procesos (Araque and Navarrete, 2010). Por este motivo, estamos interesados en investigar el rol que cumplen las células gliales en la plasticidad sináptica homeostática. Para esto, nos propusimos validar una técnica de imagenología que resulte lo suficientemente sensible para estimar cambios en la función presináptica y analizar la inducción y/o mantenimiento de este tipo de plasticidad en cultivos neuronales en contacto con células gliales o en su ausencia o escasa presencia de estas. Los resultados obtenidos sugieren que las células gliales cumplen un papel esencial en la correcta inducción y/o mantenimiento de la plasticidad sináptica homeostática.

Si bien resta mucho por investigar respecto a este tipo de plasticidad, la comprensión de este fenómeno y del rol relevante que cumplen las células gliales es de gran relevancia ya que se propone que defectos en la plasticidad sináptica homeostática se encuentran vinculados con estados patológicos del sistema nervioso, como por ejemplo, la epilepsia.

Palabras clave: Plasticidad sináptica homeostática; células gliales; sistema nervioso; función sináptica; astrocitos

Introducción

Conceptos generales

En el sistema nervioso existen aproximadamente cien billones de neuronas, las cuales establecen un estimado de cien trillones de sinapsis. Dichas sinapsis son uniones intercelulares entre una neurona presináptica y una célula postsináptica, la cual generalmente es otra neurona. Estas uniones median la comunicación entre ambas células (Südhof, 2013a), la cual es fundamental para diversos procesos cognitivos, entre ellos, el aprendizaje y la memoria.

Si bien existen grandes variantes entre cada una de las sinapsis que se establecen en un organismo, existen dos grandes categorías generales: las sinapsis eléctricas y las sinapsis químicas. La primer variante permite el flujo pasivo y directo de corriente eléctrica entre neuronas. En estas sinapsis, los citoplasmas de las terminales nerviosas se encuentran comunicados por uniones de tipo gap (Figura 1a) (Purves, 2007). Las sinapsis de tipo químico se diferencian de las anteriores en su estructura y en la secuencia de eventos necesaria para que la transmisión sináptica se lleve a cabo. La estructura de una sinapsis de tipo químico consta de diversos componentes: una terminal presináptica y una terminal postsináptica ambas separadas entre sí por la hendidura sináptica (Figura 1b). La información llega a través de la terminal presináptica en forma de un potencial de acción y es transmitida a la neurona postsináptica a través de un mensajero químico, conocido como neurotransmisor (Südhof, 2013a). La terminal presináptica posee una región denominada “zona activa” la cual puede definirse como un área especializada en la membrana plasmática donde las vesículas sinápticas conteniendo el neurotransmisor se anclan y se encuentran listas para ser liberadas (Harris and Weinberg, 2012). Este conjunto de vesículas sinápticas es comúnmente denominado “*ready releasable pool*” (RRP). También existen otros dos grupos de vesículas distribuidas en la terminal presináptica que componen el “pool de reciclaje” y el “pool de reserva” que mantienen la transferencia de información en condiciones fisiológicas y de actividad intensa, respectivamente (Harris and Weinberg, 2012). Se conocen más de cien sustancias que pueden actuar como neurotransmisores, las cuales pueden ser de diversa naturaleza química como por ejemplo: aminoácidos (ácido gama-aminobutírico, glutamato, etc.) y neuropéptidos (oxcitocina) (Purves, 2007).

El proceso de transmisión sináptica se desencadena cuando un potencial de acción llega a la terminal presináptica promoviendo la apertura de canales de calcio sensibles al voltaje. El calcio

ingresa a la terminal presináptica y se une a una proteína denominada sinaptotagmina, la cual, a su vez, se une a una maquinaria compuesta por proteínas SNARE (acrónimo proveniente de “*SNAP receptor*”, siendo SNAP “*Soluble NSF Attachment Protein*”) y proteínas SM (“*Sec1/Munc18-like*”) las que en conjunto median el proceso de fusión de la membrana vesicular y plasmática. De esta manera el neurotransmisor es liberado mediante exocitosis a la hendidura sináptica, una vez allí, alcanzará los receptores postsinápticos y se unirá a ellos activándolos (Südhof, 2013a, 2013b). Dicha unión promueve la entrada de iones que producen un cambio en el potencial de membrana, el cual depende de la naturaleza del neurotransmisor, su receptor y los iones que ingresan a la terminal postsináptica (Vitureira and Goda, 2013).

La terminal postsináptica está especializada en recibir la señal del neurotransmisor liberado desde la presinapsis y transducir la señal en cambios eléctricos y bioquímicos en la célula postsináptica. Un factor clave en la función postsináptica es la presencia de receptores ionotrópicos. Estos receptores se encuentran concentrados en la postsinapsis y embebidos en una densa red proteica que incluye proteínas de andamiaje y anclaje, enzimas, componentes del citoesqueleto y otras proteínas de membrana. Esta red ,en conjunto con los receptores ionotrópicos, es un área especializada denominada “densidad postsináptica” (PSD), la cual se localiza contrapuesta a la “zona activa” (Sheng and Kim, 2011) y está separada de ésta por la hendidura sináptica. Una de las proteínas que componen la PSD son aquellas pertenecientes a la familia Homer las cuales actúan como adaptador para otras proteínas de la PSD (Shiraishi-Yamaguchi and Furuichi, 2007).

El contenido de esta tesina se centra en comprender los mecanismos que regulan la función presináptica en sinapsis químicas glutamatérgicas por lo que los conceptos a desarrollar a continuación se enmarcan en este modelo.

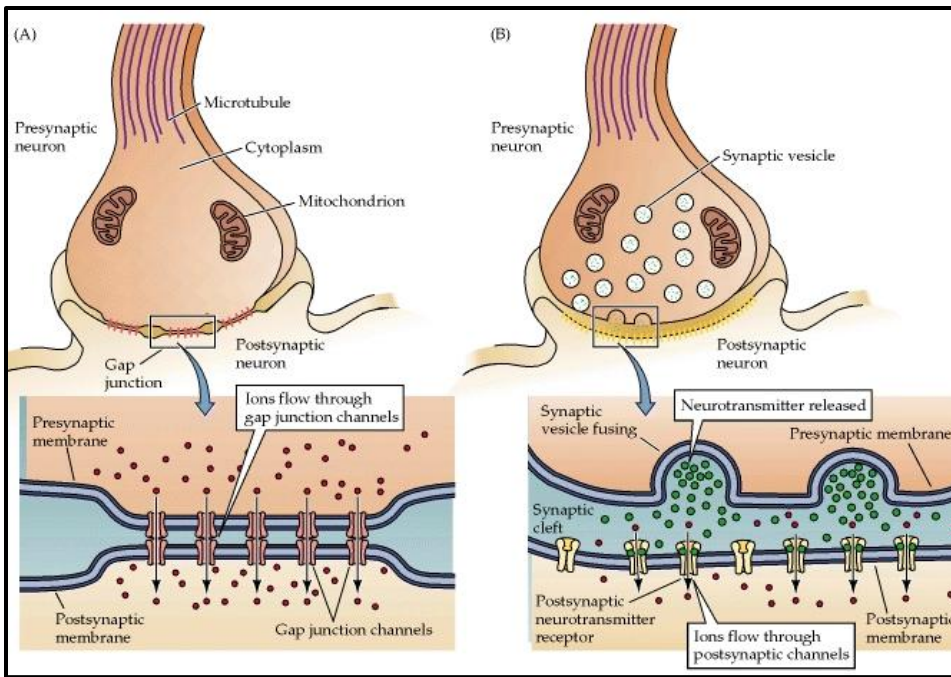


Figura 1: Estructura de sinapsis eléctricas y químicas A) Sinápsis eléctricas. Se observa la continuidad entre ambas células y las uniones de tipo gap B) Sinapsis químicas. Se observa la hendidura sináptica entre la célula presináptica y la postsináptica, así como las vesículas sinápticas conteniendo el neurotransmisor en la terminal presináptica y los receptores en la membrana postsináptica. Fuente: (Purves, D. 2007)

Plasticidad sináptica homeostática

Una característica fundamental de la función neural, imprescindible para el correcto funcionamiento de los procesos cognitivos, es la capacidad de cambiar dinámicamente la eficacia de la transmisión sináptica (también llamada “fuerza sináptica”) dependiendo del patrón de activación sináptica y el nivel global de excitación de la red neural, esta característica es denominada plasticidad sináptica (Vitureira and Goda, 2013).

La eficacia de la transmisión sináptica está determinada por dos variables: la probabilidad de que las vesículas experimenten exocitosis en respuesta a un potencial de acción, es decir, la probabilidad de liberación del neurotransmisor (pr), y la cantidad de receptores postsinápticos disponibles para la unión del neurotransmisor liberado (Del Castillo and Katz, 1954; Lisman et al., 2007). Cambios en estas variables en distintas escalas de tiempo determinan distintas formas de plasticidad a corto y largo plazo (Abbott and Regehr, 2004; Lisman et al., 2007).

La capacidad de cambiar la fuerza sináptica a largo plazo plantea el hecho de que la actividad neural se encuentra bajo dos requerimientos opuestos: la necesidad de cambio y la necesidad de estabilidad. Los cambios en la actividad neural se llevan a cabo mediante alteraciones en el número y fuerza de las conexiones sinápticas dependientes de la actividad neuronal y permite que las

propiedades del circuito se refinan con la experiencia (Turrigiano, 1999). Para que esto se lleve a cabo, se requiere de la detección de eventos en el ambiente y su almacenamiento como cambios en la fuerza sináptica u otras propiedades celulares (Abbott and Nelson, 2000). Este fenómeno es denominado “Plasticidad Sináptica Hebbiana” y consiste en un mecanismo de “*feedback positivo*”, que produce cambios específicos de entrada, rápidamente inducidos y asociativos (Turrigiano, 2008). El hecho de que se trate de un mecanismo asociativo implica que cuando una estimulación débil de una vía simple es insuficiente para la inducción de este tipo de plasticidad, la estimulación fuerte y simultánea de otra vía inducirá plasticidad en ambas. Este tipo de plasticidad comprende los fenómenos de “Potenciación a largo plazo” (LTP) y “Depresión a largo plazo” (LTD) y ha sido ampliamente estudiada, principalmente por ser considerada como la base celular de procesos de aprendizaje y memoria (Pozo and Goda, 2010). Estos fenómenos permiten reforzar las entradas que son efectivas en despolarizar la neurona postsináptica y debilitar aquellos que no lo son (Turrigiano, 2008).

Debido a la existencia de mecanismos que promueven cambios a nivel sináptico surge la interrogante de cómo se satisface la necesidad de estabilidad, es decir, como se mantiene cierto grado de constancia en las propiedades básicas de un circuito cuando este necesita tanto de la estabilidad como del cambio. Además, la estabilidad de un circuito se vuelve un desafío si se tiene en cuenta la naturaleza de “*feedback positivo*” de los fenómenos de plasticidad Hebbiana ya que a medida que las entradas excitatorias 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. Como resultado, se produce una mayor potenciación. De esta manera, las entradas que son potenciadas aumentarían al extremo y las que son disminuidas se reducen hasta llegar a niveles cercanos a cero perdiéndose la selectividad de la red (Turrigiano, 1999). Las sinapsis que son reforzadas se vuelven más efectivas en la despolarización de la neurona postsináptica y van a continuar siendo reforzadas de forma ilimitada en un ciclo que puede llevar a la neurona a la saturación (Abbott and Nelson, 2000). De esta forma, ante esta situación de refuerzo extremo de determinadas sinapsis, la neurona postsináptica sería capaz de disparar ante estímulos que en principio no provocaban este efecto e incluso podría llegar a producirse un disparo sin estímulo ambiental (Turrigiano, 2008) (Figura 2a y 2b).

El desafío de satisfacer tanto los requerimientos en materia de cambios de eficacia sináptica como la necesidad de estabilidad no se limita únicamente a los procesos que involucran aprendizaje y memoria, sino también es esencial durante el desarrollo del sistema nervioso. En este proceso, muchas neuronas experimentan un aumento dramático del número de conexiones sinápticas que

reciben y por lo tanto deben ser capaces de evitar que la tasa de disparo alcance niveles extremos, tanto en aumento como en disminución, y a la vez deben permitir que conexiones individuales sean fortalecidas o debilitadas de manera específica (Turrigiano, 1999).

Se han identificado mecanismos que mantienen la estabilidad del circuito neuronal permitiendo a su vez realizar los cambios dependientes de la experiencia necesarios para un correcto funcionamiento y adaptabilidad del sistema y el organismo (Turrigiano, 1999). Estos procesos configuran un tipo de plasticidad denominada “Plasticidad Sináptica Homeostática” la cual se define como un mecanismo de “*feedback negativo*” utilizado por las neuronas para compensar la excitación o inhibición excesivas mediante el ajuste de la eficacia sináptica (Pozo and Goda, 2010) (Figura 2c). Existen diversas maneras de mantener controlada la tasa de disparo a través de una regulación homeostática de algunos aspectos de la excitabilidad neural. Dentro de las posibilidades de regulación, se encuentran el balance de las conductancias voltaje dependientes entrantes y salientes que determinan las propiedades de disparo o “excitabilidad intrínseca”, (Desai, 2004; Marder and Goaillard, 2006), la regulación de la fuerza sináptica excitatoria y/o inhibitoria (Turrigiano and Nelson, 2004), el control del número de sinapsis establecidas (Kirov et al., 2004) o el ajuste en la facilidad con la cual pueden inducirse otras formas de plasticidad (Abraham and Bear, 1996). Independientemente de que proceso se implemente, éste debe satisfacer un conjunto de requerimientos básicos a saber: censar algún aspecto de la actividad, integrar esta medida en un lapso de tiempo largo (minutos a horas) en comparación con el tiempo que requiere la transferencia de información (milisegundos a minutos) y poder ajustar las propiedades sinápticas para mantenerse cercano al valor de referencia (Turrigiano, 2008).

Si bien existe evidencia de la existencia de mecanismos compensatorios desde décadas atrás, los mecanismos subyacentes a los procesos de Plasticidad Sináptica Homeostática se han comenzado a estudiar recientemente. Así, las investigaciones realizadas hasta el momento ilustran una imagen compleja en la cual las sinapsis implementan estos mecanismos a través de procesos celulares diversos. Dichos mecanismos difieren dependiendo del estado de desarrollo, el tipo celular y los cambios en la actividad del circuito que lleva a la expresión de este tipo de plasticidad (Pozo and Goda, 2010).

Con el motivo de simplificar la comprensión de los fenómenos que involucran ajustes compensatorios en la eficacia sináptica se pueden clasificar a los mismos en aquellos que involucran mecanismos postsinápticos: que regulan la disponibilidad de receptores postsinápticos, o aquellos que involucran mecanismos presinápticos: los cuales controlan la probabilidad de liberación del

neurotransmisor (*pr*). Sin embargo, cabe destacar que una clasificación estricta quizás no sea del todo correcta lo cual discutirá más adelante.

Los cambios compensatorios a nivel estructural consisten básicamente en el aumento del área de componentes sinápticos, como la zona activa y la PSD, ante una disminución de la actividad y de una reducción de dichos componentes ante un aumento de la actividad de las conexiones. A nivel funcional, una disminución de la actividad del circuito provoca un aumento del RRP y de la *pr* (Moulder et al., 2006; Murthy et al., 2001). A nivel de la postsinapsis, se produce un aumento en la acumulación de receptores de glutamato de tipo AMPA (O'Brien et al., 1998). Por el contrario, un aumento en la actividad neural produce una disminución en la *pr* vinculada a una reducción del RRP (Branco et al., 2008; Moulder et al., 2006) mientras que a nivel postsináptico, se describe una disminución en la acumulación de receptores del tipo AMPA (Lissin et al., 1998) (Figura 3).

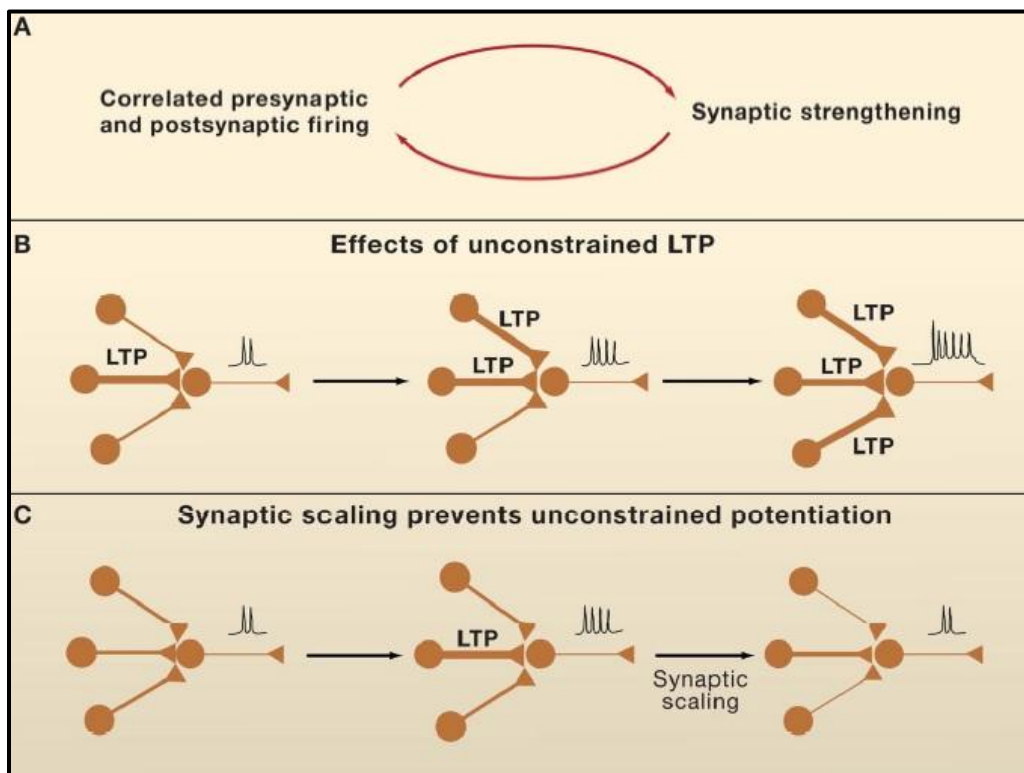


Figura 2: Los mecanismos de plasticidad Hebbiana son potencialmente desestabilizantes. A) Correlación entre disparos presinápticos y postsinápticos inducen LTP, el cual produce un aumento de la fuerza sináptica, lo que a su vez aumenta la correlación nuevamente, generándose un ciclo. B) Efectos de un LTP sin restricciones. Se produce la pérdida de la especificidad sináptica ya que cuando una entrada experimenta un LTP, hace más sencillo para otras entradas hacer disparar la neurona postsináptica y a su vez estas experimentan también LTP. C) La plasticidad sináptica homeostática evita la potenciación cíclica. Cuando un LTP de una entrada aumenta las tasa de disparo postsináptico, mecanismos de plasticidad homeostática disminuyen igualmente la fuerza sináptica de todas las entradas de manera de volver a los niveles normales sin perder las diferencias relativas introducidas por el LTP. Fuente: (Turriqiano, 2008)

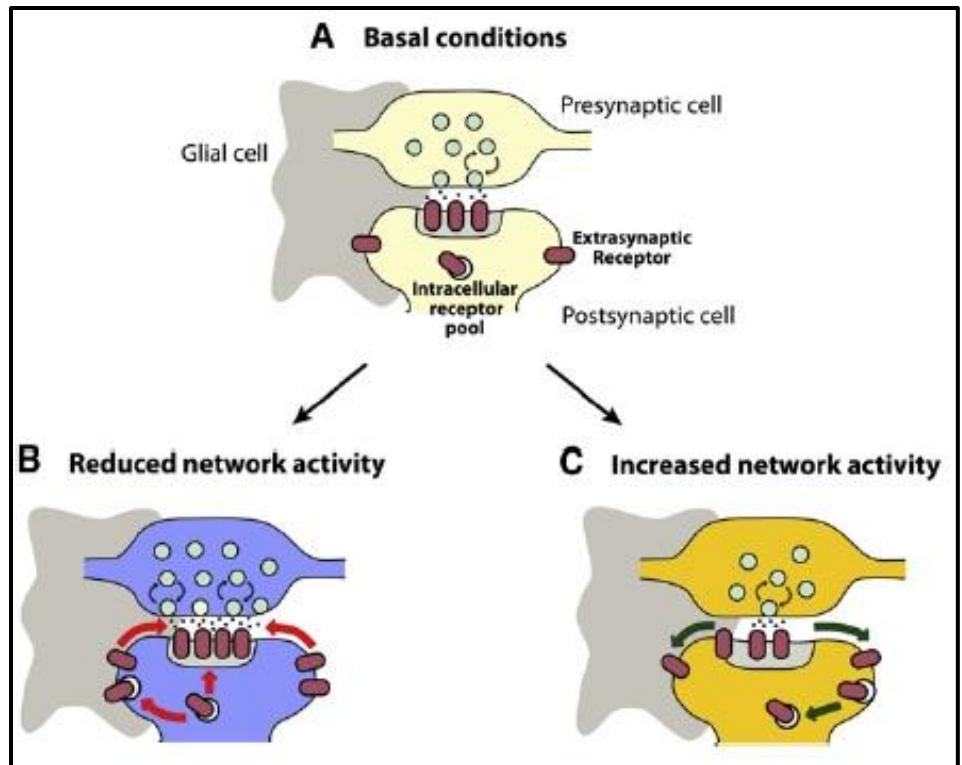


Figura 3: Esquema básico de la Plasticidad Sináptica Homeostática en una sinapsis excitatoria. A) Condiciones basales. La fuerza sináptica está determinada tanto por la cantidad de receptores disponibles en la postsinápsis como por la probabilidad de liberación del neurotransmisor. B) Actividad neural reducida. Ante una disminución de la actividad aumenta el reciclaje de vesículas sinápticas, el número de vesículas listas para ser liberadas y/o la cantidad de receptores disponibles en la postsinápsis. C) Actividad neural incrementada. Un aumento excesivo en la actividad neural produce la disminución de la probabilidad de liberación del neurotransmisor y/o una reducción del número de receptores postsinápticos.

Plasticidad sináptica homeostática postsináptica

La clase de plasticidad sináptica homeostática más estudiada hasta el momento y la primera en identificarse es aquella que involucra mecanismos postsinápticos. Este proceso es denominado “*synaptic scaling*” y ha sido demostrado tanto *in vivo* como *in vitro* (Turrigiano, 2008). La manipulación farmacológica de la actividad sináptica induce cambios compensatorios en la fuerza de las sinapsis glutamatérgicas en una escala de tiempo de algunas horas (Ibata et al., 2008; Sutton et al., 2006; Turrigiano, 2000). Por ejemplo, en condiciones de inactividad crónica generadas en cultivo de neuronas espinales mediante la adición de 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona (CNQX), un antagonista de receptores de glutamato de tipo AMPA, se produce un aumento de la amplitud de las corrientes postsinápticas excitatorias en miniatura (mEPSCs) (O'Brien et al., 1998), las cuales representan la respuesta postsináptica a la liberación individual de vesículas sinápticas (Turrigiano, 2008). Mediante la medida de la expresión de receptores de glutamato del tipo AMPA, se demostró

que los cambios en mEPSC son acompañados por cambios en la acumulación de estos receptores y que estos últimos se regulan de manera dependiente de la actividad del circuito (Lissin et al., 1998; O'Brien et al., 1998). Además, se ha demostrado que la reducción de la actividad sináptica aumenta la vida media de los receptores AMPA (O'Brien et al., 1998). Sin embargo, a pesar de que se observan aumentos en la acumulación de receptores AMPA ante un descenso en la actividad no se detectan cambios en la cantidad de mRNA que los codifica (Mammen et al., 1997). Debido a lo expuesto anteriormente, surge la interrogante de como se produce la acumulación de estos receptores sin un aumento de su síntesis. La primera forma de explicar este fenómeno plantea la idea de que la estabilidad incrementada de los receptores genere un pool de mayor tamaño disponible para la inserción en membrana, lo que globalmente aumenta la tasa de inserción. La segunda posibilidad consiste en que se disminuya la tasa de remoción de los receptores presentes en la membrana postsináptica (Turrigiano and Nelson, 1998) (Figuras 4 y 5).

Cabe destacar que también se ha constatado que las sinapsis inhibitorias son reguladas de manera similar pero en la dirección opuesta, ya que ante la supresión de actividad durante dos días en cultivos corticales se observa una disminución de la amplitud de las corrientes postsinápticas inhibitorias en miniatura (mIPSC) (Kilman et al., 2002). Esto sugiere que ambos tipos de sinapsis se regulan por mecanismos similares. Sin embargo, la variante mejor entendida hasta el momento es aquella que se expresa en sinapsis de tipo excitatorio (Turrigiano, 2008).

Los cambios introducidos por el proceso de "*synaptic scaling*" en las fuerzas sinápticas son de naturaleza multiplicativa, es decir, las fuerzas sinápticas de todas las sinapsis de una red serán disminuidas o aumentadas por un mismo factor (Turrigiano and Nelson, 1998). Esta característica permite mantener las diferencias relativas entre pesos sinápticos de manera de no alterar el almacenamiento de información y aprendizaje inducido por mecanismos de plasticidad Hebbiana (Turrigiano, 2008) (Figura 2c).

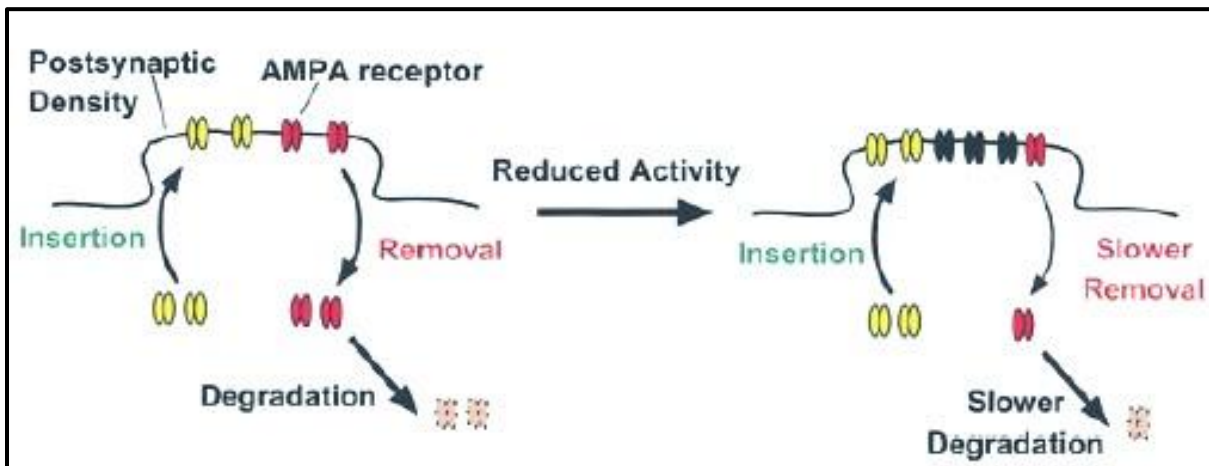


Figura 4: Acumulación de receptores tipo AMPA en la postsinapsis. Tanto un aumento en la tasa de inserción como una disminución de la tasa de remoción y degradación pueden llevar a la acumulación ante una disminución de actividad. Fuente: (Turrigiano and Nelson, 1998)

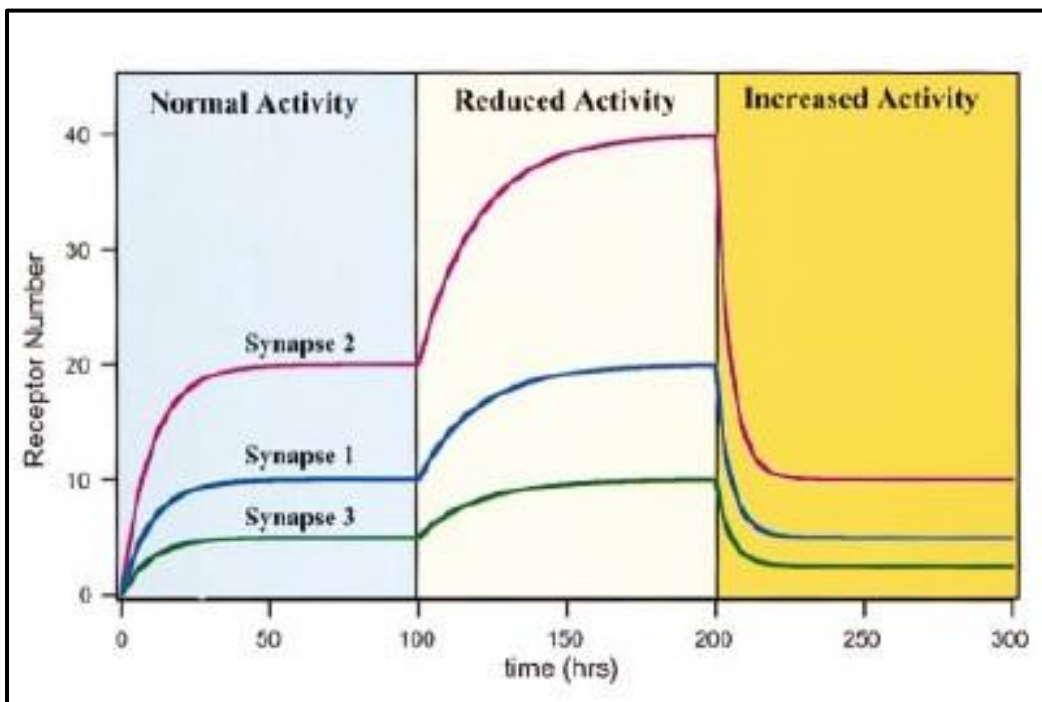


Figura 5: Acumulación de receptores tipo AMPA en la postsinapsis en función del tiempo para un sistema con actividad normal, reducida e incrementada. A un nivel de actividad normal el número de receptores aumenta hasta mantenerse estable. Al reducirse la actividad sináptica incrementa notoriamente el número de receptores AMPA. Ante un aumento excesivo de la actividad se reduce la cantidad de receptores. Fuente: (Turrigiano and Nelson, 1998)

Plasticidad sináptica homeostática presináptica

La plasticidad sináptica homeostática que involucra mecanismos presinápticos ha sido menos estudiada que su variante postsináptica y es el tipo de plasticidad sináptica homeostática en el cual se centra este trabajo. Los primeros estudios que involucran este tipo de regulación homeostática se realizaron en la unión neuromuscular de *Drosophila Melanogaster*. Sin embargo, también se han realizado estudios en cultivos disociados de neuronas corticales y/o hipocámpales de roedores donde se ha demostrado que la eficacia sináptica puede ajustarse mediante la modificación de la función presináptica de manera compensatoria según los cambios en la actividad de la red (Pozo and Goda, 2010). Por ejemplo, se ha constatado que la supresión crónica de la actividad neural por el uso de tetrodotoxina (TTX) o antagonistas de los receptores de glutamato (CNQX) provocan un aumento de tamaño de las zonas activas y un incremento en el número de vesículas ancladas en dicha zona (Moulder et al., 2006; Murthy et al., 2001). También se ha demostrado que la supresión crónica de la actividad produce un aumento en la cinética de reciclaje de las vesículas sinápticas (Bacci et al., 2001; Burrone et al., 2002; Han and Stevens, 2009; Moulder et al., 2006; Thiagarajan et al., 2005). En su conjunto, estos cambios promueven un aumento en la *pr* (Murthy et al., 2001).

Si bien los mecanismos que subyacen este tipo de plasticidad no se encuentran del todo claros, se cree que este tipo de regulación homeostática ocurre debido a cambios en la entrada de calcio en respuesta a una espiga presináptica (Zhao et al., 2011). Además, otros estudios señalan que en sinapsis sometidas a bloqueos de actividad, se produce un enriquecimiento en la proteína sensora de calcio sinaptotagmina, la subunidad Cav2.1 de los canales de calcio de tipo P/Q (Lazarevic et al., 2011) y en la proteína vesicular SV2B, implicada en la facilitación de la *pr* (Custer et al., 2006). Estas evidencias sugieren que este tipo de plasticidad homeostática podría estar regulada mediante el control de la cantidad de canales de calcio voltaje dependientes, y por lo tanto, controlando el flujo de calcio que ingresa a la neurona y la respuesta de la maquinaria de liberación del neurotransmisor a dicho ion (Vitureira et al., 2012a).

Plasticidad sináptica homeostática pre y postsináptica y su interacción

Algunos estudios sugieren que para que se produzcan cambios a nivel presináptico, se requiere de cierta actividad postsináptica (Branco et al., 2008; Pozo and Goda, 2010; Vitureira et al., 2012a). Estos estudios muestran que no existe correlación entre los niveles superficiales de la subunidad GluA2 de los receptores AMPA y la *pr* en condiciones basales, sin embargo, una correlación positiva surge cuando se aumenta la actividad del circuito (Tokuoka and Goda, 2008).

Esta coordinación entre la función pre y postsináptica se da como resultado de la disminución de los niveles superficiales de GluA2, lo cual indica una menor respuesta de la terminal postsináptica y plantea la pregunta de cómo esta ajusta la función de la terminal presináptica. Este proceso podría implicar una estrecha comunicación entre ambas terminales y el uso de una señalización retrógrada para la regulación homeostática de la función presináptica (Pozo and Goda, 2010; Tokuoka and Goda, 2008; Vitureira et al., 2012a). Debido a esto y como se mencionó anteriormente, una clasificación en mecanismos puramente postsinápticos y presinápticos no sería estrictamente correcta.

Rol de la glía en los procesos de plasticidad sináptica homeostática

Algunos experimentos vinculan diversos factores solubles derivados de células gliales con los procesos de plasticidad sináptica homeostática. El factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), citoquina que fue identificada en primera instancia como una molécula perteneciente al sistema inmune involucrada en la respuesta inflamatoria e iniciación de la muerte celular (Liu, 2005) es uno de los factores que se encuentra vinculado a este tipo de plasticidad. Así, se estableció que esta citoquina es producida en el sistema nervioso central de manera constitutiva por las células gliales y puede incrementar la acumulación de receptores de glutamato de tipo AMPA en las membranas neuronales (Beattie et al., 2002; Stellwagen et al., 2005). Los receptores de tipo AMPA son responsables de la mayoría de las corrientes excitatorias del sistema nervioso, por lo que un aumento en la acumulación de los mismos puede explicar la capacidad del TNF α de promover excitotoxicidad. Como se mencionó en secciones anteriores, se conoce que los receptores de tipo AMPA se encuentran involucrados en distintos tipos de plasticidad, incluyendo plasticidad sináptica homeostática, específicamente en procesos de “*synaptic scaling*”. Debido a esto, surge la idea de que el TNF α está involucrado en la regulación homeostática de la función postsináptica (Turrigiano, 2006). Dicha idea es analizada por estudios realizados en cultivos de neuronas de hipocampo donde se confirma que la aplicación de TNF α provoca un aumento en la acumulación de receptores AMPA similar al producido ante una disminución en el nivel de actividad provocada por el tratamiento de dichos cultivos con TTX. A modo de identificar el origen del TNF α responsable del aumento en la acumulación de receptores AMPA, los mismos autores, realizaron experimentos con neuronas y glías mutantes, incapaces de producir TNF α , y neuronas y glías salvajes. Se combinaron dichas células de manera de obtener cultivos con glía mutante y neuronas salvajes; cultivos con glías salvajes y neuronas mutantes; y cultivos con glía y neuronas mutantes. En estos últimos, como era de esperar, no se observan fenómenos de “*synaptic scaling*” ante el tratamiento con TTX, debido a la

ausencia de $\text{TNF}\alpha$ tanto de origen neuronal como glial (ambos tipos de células mutantes). Sin embargo, cultivos compuestos por neuronas mutantes y glía salvaje mostraron incrementos en mEPSC ante el tratamiento con TTX. También fueron analizados los resultados del tratamiento de cultivos con neuronas salvajes y glías mutantes y no se obtuvieron aumentos en mEPSC. Todo esto sugiere que el $\text{TNF}\alpha$ además de ser necesario para la inducción de “*synaptic scaling*”, es producido como respuesta a la inactividad por parte de la glía (Stellwagen and Malenka, 2006) (Figura 6). Cabe destacar que se conoce que el $\text{TNF}\alpha$ no participa en la modulación de la plasticidad sináptica Hebbiana del tipo LTP, en la cual también se encuentran involucrados los receptores de glutamato de tipo AMPA, lo que indica la participación de mecanismos moleculares diferentes entre la plasticidad sináptica Hebbiana y la homeostática. Por otra parte, se conoce que el $\text{TNF}\alpha$ no se encuentra involucrado en los procesos que disminuyen la fuerza sináptica ante aumentos en los niveles de actividad, solamente actúa en procesos que aumentan la fuerza sináptica ante bloqueos de actividad. Esto indica la participación de aún más factores que se desconocen (Turrigiano, 2006).

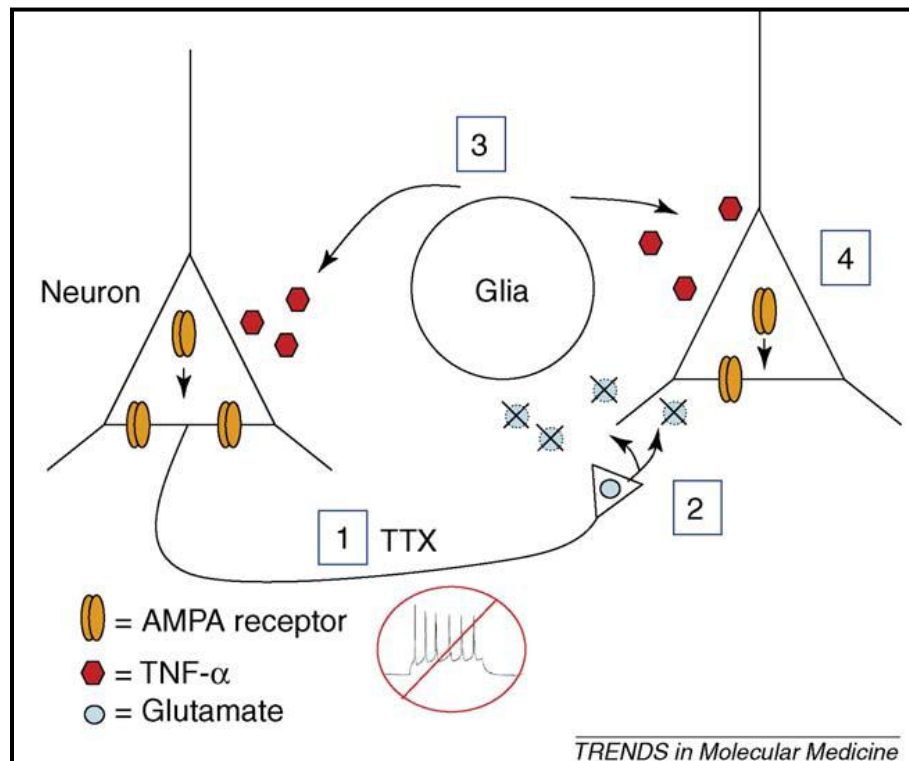


Figura 6: Modelo de la interacción glía-neurona en los procesos de “*synaptic scaling*” y el rol del $\text{TNF}\alpha$. Cuando la actividad es bloqueada (1), disminuye la liberación de glutamato (2) lo que provoca un aumento de la liberación de $\text{TNF}\alpha$ por parte de la glía (3). El $\text{TNF}\alpha$ actúa sobre las neuronas aumentando la acumulación de receptores AMPA. Fuente: (Turrigiano, 2006)

Existen numerosos estudios que demuestran que los astrocitos, son elementos integrales y funcionales de las sinapsis. Estas células están activamente involucradas en el procesamiento, almacenaje y transferencia de la información en coordinación con las neuronas, lo que desafía el paradigma que plantea que la función neural es el resultado casi exclusivo de la actividad de las neuronas. Esto introduce un grado de complejidad extra en las redes que componen el sistema nervioso y deja un interesante terreno por explorar (Araque and Navarrete, 2010).

Los astrocitos modifican la estructura y función del espacio extracelular, jugando un importante rol en la homeostasis de dicho medio ya que proveen las condiciones adecuadas para un correcto funcionamiento de las neuronas y sinapsis. Estructuralmente, el medio es modificado por estas células debido a la dinámica movilidad de los procesos astrocíticos, lo que provoca cambios en la difusión de los neurotransmisores, teniendo un gran impacto en la red neural. La “envoltura” de los astrocitos sobre las sinapsis que ocurre en determinados estados fisiológicos puede afectar fuertemente la eficacia sináptica debido a cambios, por ejemplo, en la efectividad del “*clearance*” o remoción del glutamato. También se ha constatado que estas células extienden y retraen sus procesos en coordinación con los cambios en la morfología de las espinas dendríticas, lo que puede llevar a la consolidación de las mismas (Araque and Navarrete, 2010). Además de las modificaciones estructurales impuestas por los astrocitos, el espacio extracelular puede ser delimitado funcionalmente mediante la expresión selectiva de algunas proteínas de membrana, por ejemplo, canales dependientes de voltaje o transportadores de neurotransmisores. En particular, los astrocitos son los encargados de controlar la concentración extracelular de potasio mediante la expresión de un canal de potasio rectificador. Se ha propuesto que un déficit en la expresión de dicho canal podría llevar a una hiperexcitabilidad neuronal y epilepsia (Araque and Navarrete, 2010).

Una de las razones por las cuales los astrocitos fueron subestimados en cuanto a su rol en relación a la funcionalidad sináptica fue la consideración de que no son células eléctricamente excitables. Sin embargo, y a pesar de no registrar cambios eléctricos a nivel de membrana como en el caso de las neuronas, los astrocitos son células comunicantes. Se ha comprobado que dichas células muestran una forma de excitabilidad basada en variaciones en la concentración de calcio citosólico. Así, los canales sensibles al voltaje presentes en la membrana plasmática astrocitaria funcionan simplemente como mecanismo de mantenimiento de la homeostasis de los niveles de iones extracelulares, con muy poca influencia en mecanismos de señalización celular. Sin embargo, el calcio almacenado en el retículo endoplásmico es utilizado como fuente del ion para mecanismos de señalización. Este mecanismo funciona como una señal intracelular e intercelular ya que puede propagarse entre astrocitos de la red gracias a las uniones de tipo gap existentes en los mismos

(Araque and Navarrete, 2010). Se ha establecido que este mecanismo de señalización a través del ion calcio puede ser desencadenado por la actividad neuronal ya que los astrocitos expresan receptores para neurotransmisores (Perea and Araque, 2005). Como respuesta a las elevaciones en la concentración de calcio, los astrocitos liberan sustancias neuroactivas, llamadas gliotransmisores, que regulan la transmisión sináptica. Sustancias como el ATP y la D-serina son algunos ejemplos (Araque and Navarrete, 2010). La capacidad de los astrocitos de responder a la actividad neuronal y modularla mediante la liberación de sustancias neuroactivas plantea el concepto de “sinapsis tripartita” donde estas células gliales son parte esencial en la comunicación entre dos neuronas. Por otra parte, se conoce que la respuesta de los astrocitos no es lineal, ni se trata de un mecanismo de tipo “on-off”, sino que existen diversos patrones y cinéticas de respuesta. Esta evidencia plantea la posibilidad de que exista un procesamiento de la información por parte de los astrocitos ante los estímulos recibidos, característica que sigue agregando complejidad al mecanismo de transmisión sináptica (Araque and Navarrete, 2010; Araque et al., 2014).

Investigaciones al respecto de la neuromodulación generada por los gliotransmisores liberados por los astrocitos muestra varias características interesantes: en primer lugar, se conoce que un mismo gliotransmisor actúa sobre diferentes blancos (Jourdain et al., 2007; Navarrete and Araque, 2010; Navarrete et al., 2012). Por lo tanto, un mismo gliotransmisor puede tener múltiples efectos dependiendo del tipo de circuito, las neuronas y los tipos de receptores involucrados (Araque et al., 2014). Por otra parte, los astrocitos son capaces de liberar diferentes gliotransmisores (Henneberger et al., 2010; Zhang et al., 2008; Zhuang et al., 2011). Por último, las características de los astrocitos mencionadas hasta el momento, es decir, la capacidad de responder a la actividad neural, su capacidad de procesar la información y la liberación de gliotransmisores que regulan la actividad neural, tienen un fuerte impacto en las redes neurales; esto se debe a que cada astrocito se encuentra en contacto con gran cantidad de sinapsis y a su vez, los astrocitos se comunican entre sí, lo que les permite activar y regular la actividad de poblaciones neuronales. Un ejemplo de este fenómeno se puede apreciar en el hipocampo donde elevaciones en la concentración de calcio en los astrocitos y la liberación de glutamato tiene como resultado la activación sincrónica de grupos de neuronas piramidales, lo que indica un fuerte rol de los astrocitos en la sincronización neuronal (Araque and Navarrete, 2010; Araque et al., 2014).

Según lo expuesto hasta el momento, es claro que existen características de los astrocitos que los hacen grandes candidatos a jugar un rol importante en procesos de plasticidad. La capacidad de responder a la actividad neuronal sugiere que estas células gliales podrían ser capaces de censar los niveles de actividad, algo fundamental a la hora de establecer límites que luego serán la base de

los procesos de plasticidad homeostática. Asimismo, la liberación de gliotransmisores podría ser la clave para regular los niveles de actividad de las redes neurales debido a la posibilidad de sincronizar poblaciones de neuronas dado el estrecho contacto existente entre los astrocitos y la gran cantidad de sinapsis con las que tienen contacto.

A pesar de que la evidencia expuesta hasta el momento plantea una hipótesis atractiva, aún queda mucho por establecer en cuanto a este tipo de plasticidad y el rol que desempeñan las células gliales en el proceso.

Objetivos

Comprender los mecanismos moleculares fundamentales que gobiernan los cambios homeostáticos de la función presináptica a nivel de sinapsis individuales. En particular, nos interesa investigar el papel de las células gliales en este proceso.

Objetivos específicos:

1. Puesta a punto de una técnica de imagenología lo suficientemente sensible como para detectar cambios en la función presináptica en condiciones de actividad basal y de supresión crónica de actividad.
2. Determinar la relevancia de células gliales en la inducción y/o mantenimiento de la plasticidad sináptica homeostática.

Materiales y métodos

Para la realización de este trabajo se utilizaron cultivos disociados de hipocampo compuestos por células neuronales y gliales (cocultivos) y cultivos compuestos casi exclusivamente por neuronas (cultivos neuronales). Las células fueron extraídas de hipocampo de rata Wistar neonata en el día de nacimiento o día posterior al nacimiento (P0 o P1, respectivamente). Los animales fueron sacrificados mediante decapitación, realizándose todos los esfuerzos para minimizar el número de animales empleados y su sufrimiento. 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 manejo de los animales de experimentación fue realizado por personal que cumple con los requisitos establecidos por el comité de ética de la Facultad de Medicina y está acreditado por la CHEA (Comisión Honoraria de Experimentación Animal).

1- Extracción de células de hipocampo para cultivo

Se extrajo el hipocampo, se fragmentó y se introdujo en 3ml de una solución enzimática conteniendo papaína (20 unidades), EDTA (0.5mM), CaCl_2 (1.5 mM), L-cisteína (0.2 g/L) y DNAsa (0.1 mg/L). Se incubó por 15 minutos a 37°C, se lavó con medio BME (Basal Medium Eagle) conteniendo glucosa (2.97 g/L), suero fetal bovino (10 %), piruvato (1mM), hepes (0.01M), 500µl Penicilina/Streptomicina (medio G), luego el tejido se disgregó con medio Neurobasal conteniendo glucosa (6 mg/ml), 2.5% de B27, 2mM Glutamax y 500µl Penicilina/Streptomicina (medio N) y se centrifugó a 1000 rpm por 5 minutos (Vitureira et al., 2012b) .

2- Co-cultivos

El pellet resultante de la extracción se resuspendió en medio G y las células de incubaron a 37°C en estufa de CO_2 durante 7 a 10 días hasta la formación de una monocapa. Para realizar los cocultivos, la monocapa de células gliales fue incubada por 1-2 min a 37°C con una solución conteniendo tripsina, luego se agregó medio y se contaron las células en cámara de Neubauer. Se sembraron 4.5×10^4 células por pocillo en placas de 24 pocillos y se incubaron a 37 °C en estufa de CO_2 . Cada pocillo contiene un cubreobjeto que fue tratado previamente con una solución

conteniendo ácido acético (3 mM), colágeno de cola de rata (23%), poli-D-lisina (20µg/ml) en agua. Pasados 4-5 días o una vez que la monocapa de células alcanzara un 50-70% de confluencia se procedió a sembrar neuronas. Las células resultantes de una nueva extracción realizada como se expuso el en apartado 1 se resuspendieron en 1ml de medio N, y se contó el número de células extraídas en cámara de Neubauer. Se sembraron 2.5×10^4 células por pocillo y se mantuvieron a 37°C en estufa de CO₂ durante 12-15 DIV. Se trato con el antimitótico citosina arabinosa (Ara C, 4µM) a las 24 hs para evitar el crecimiento excesivo de células gliales (Vitureira et al., 2012b).

3- Cultivos neuronales

Las células resultantes de otra extracción realizada como se expuso en el apartado 1 se resuspendieron en 1ml de medio N y se contó la cantidad de células extraídas en cámara de Neubauer y se sembraron 5.0×10^4 células por pocillo. Cada pocillo contiene un cubreobjeto que fue tratado *overnight* con una solución 1:200 de poli-D-lisina en agua. Se trato con el antimitótico citosina arabinosa (Ara C, 4µM) a las 24 hs para evitar el crecimiento de células gliales.

4- Tratamiento

A los 12 días *in vitro* se trató la mitad de los pocillos con una solución conteniendo TTX (1 µM) por 36 hs (Vitureira et al., 2012b).

5- Inmunocitoquímicas

Se realizaron ensayos de inmunocitoquímica para evaluar la inducción de plasticidad sináptica homeostática en ambos tipos de cultivo. Para esto, se fijaron los cultivos con una solución conteniendo 4% de paraformaldehído en PBS, luego de 36 hs de iniciado el tratamiento con TTX. Las células se lavaron dos veces con PBS y una vez con PBS-0.1% tritón. Se incubaron durante 30 min con solución conteniendo 10% de suero fetal bovino, 0.2M de glicina en PBS-0.1% triton a temperatura ambiente. Luego, se realizó un lavado con PBS-0.1% tritón y se incubó durante 2 hs con una solución de PBS conteniendo 5% de suero fetal bovino, 0.1% de tritón y los siguientes anticuerpos primarios: anti-MAP-2 producido en pollo (Abcam, 1:2000) para marcar el citoesqueleto de las neuronas, anti-Homer-1 producido en ratón (Synaptic Systems, 1:500), proteína presente en la post-sinapsis y anti-vGlut-1 producido en conejo (Synaptic Systems, 1:7000), proteína presente en la presinapsis. Posteriormente se lavó con PBS-0.1% tritón 3 veces por 5 minutos y se incubó durante

1 hr con anticuerpos secundarios conjugados a diferentes fluorocromos: anti-pollo cy5 Dylight 648 (Jackson, 1:200); anti-ratón alexa 568 (Molecular Probes, 1:500) y anti-conejo 488 (Molecular Probes, 1:500) Luego se lavó nuevamente con PBS-0.1% tritón 3 veces por 5 minutos y por último con PBS 2 veces por 5 minutos. Los cubreobjetos fueron montados en portaobjetos con glicerol. Las imágenes para evaluación de inducción de plasticidad sináptica homeostática fueron obtenidas mediante microscopia confocal (Microscopio confocal LEICA TCS-SP5-DMI6000, Software: Leica LAS AF Lite®).

Por otra parte, en el caso de los cultivos neuronales se evaluó la cantidad de células gliales existentes en los mismos. Para esto, habiendo fijado previamente los cultivos con una solución conteniendo 4% de paraformaldehído, se realizaron inmunocitoquímicas utilizando marcadores específicos para astrocitos, anti-GFAP (*Glial fibrillary acidic protein*) (1:5000, Dakopatts) el cual ya se encontraba conjugado a un fluorocromo, cy3; oligodendrocitos, anti-APC (*Adenomatous polyposis coli*) (producido en ratón, 1:500, EMD Bioscience-Calbiochem); microglía, anti-Iba1 (*Ionized calcium binding adaptor molecule 1*) (producido en conejo, 1:400, AbCam). Como anticuerpos secundarios utilizaron los anticuerpos anti-ratón alexa 568 (Molecular Probes, 1:500) y anti-conejo 488 (Molecular Probes, 1:500). Se realizó el marcaje de los núcleos celulares presentes con DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) (1:2000), incubándolo durante 5 minutos. Se siguió el mismo protocolo de lavados y tiempos de incubación que en el caso de las inmunocitoquímicas para evaluar plasticidad descritas en el párrafo anterior. Los cubreobjetos fueron montados en portaobjetos con glicerol. Las imágenes para evaluación de la cantidad de glía en cultivos neuronales fueron obtenidas mediante microscopia de epifluorescencia (OLYMPUS serie IX2, Software: Cell-F)

6- Procesamiento de imágenes

a) Evaluación de la inducción de plasticidad sináptica homeostática

Se obtuvieron imágenes mediante microscopía confocal correspondientes a neuronas individuales. El análisis de estas imágenes se realizó mediante la utilización del software Image J[®], para ello se identificaron sinapsis individuales aplicando el siguiente criterio:

1. Las coordenadas de la selección deben situarse en una dendrita perteneciente a la neurona a analizar (inmunoreactiva para MAP-2) (Figura 7a).
2. Existencia de colocalización parcial o completa entre los marcadores vGlut-1 y Homer-1 en las coordenadas seleccionadas (Figura 7b, 7c y 7d).

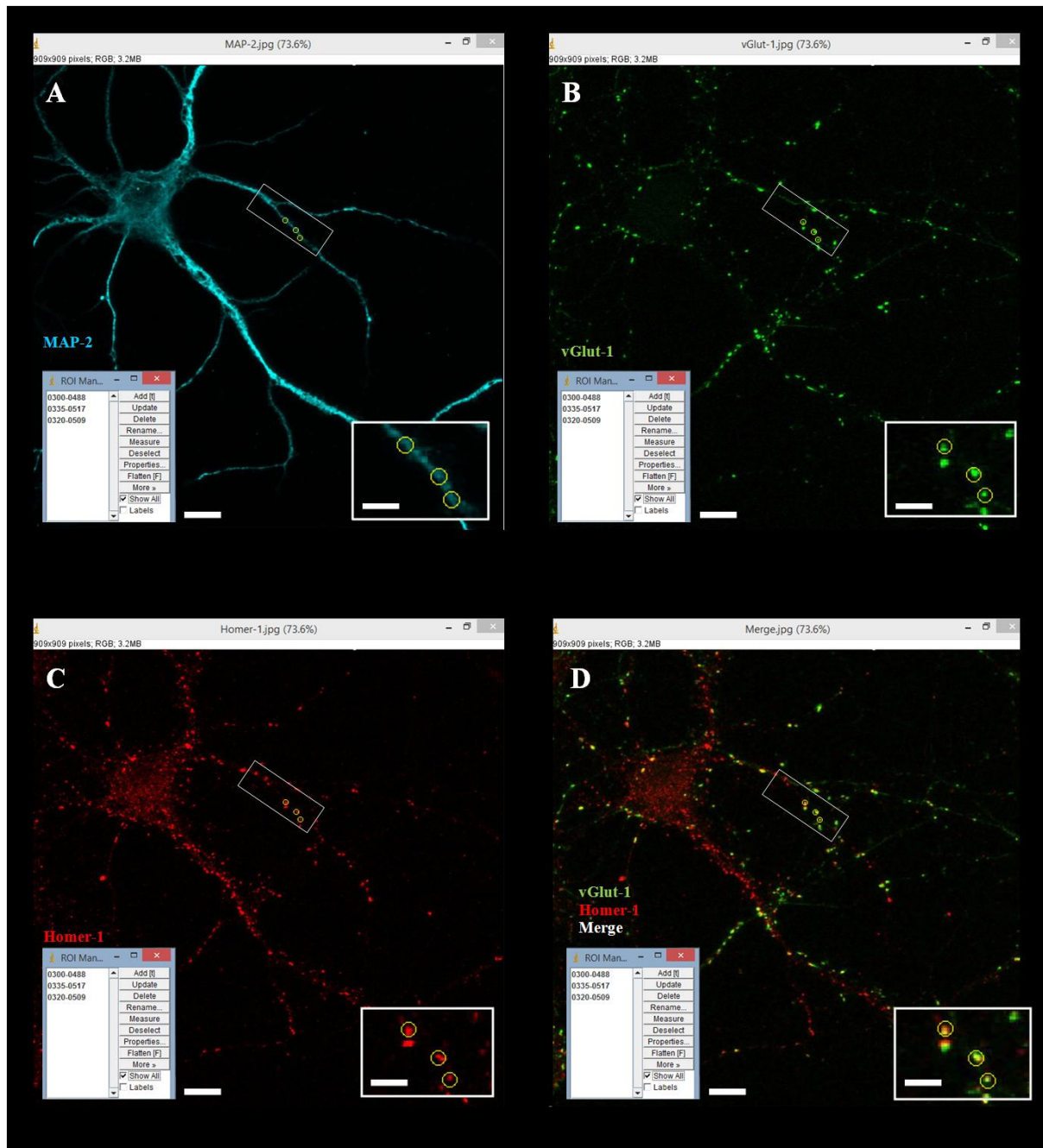


Figura 7: Análisis de imágenes para evaluación de cambios en la abundancia de vGlut-1 en software Image J®. Imágenes representativas. A-D) Cocultivo de hipocampo marcado con anti-vGlut-1, anti-MAP y anti-Homer1 donde se seleccionan tres sinapsis teniendo en cuenta los criterios mencionados. Escala: 24μm. Magnificación en ángulo inferior derecho de cada imagen. Escala: 5μm. Se muestra panel del software con coordenadas de selección.

Mediante este procedimiento se seleccionaron entre 30 y 170 sinapsis por neurona y se cuantificó la intensidad de fluorescencia de cada una de estas. Posteriormente, se realizó un promedio de intensidad de fluorescencia por neurona. Se realiza un *test t* no apareado debido a que se trata de una muestra pequeña de una población que se ajusta a una distribución normal y

contamos con dos grupos de muestras aleatorias e independientes. Los resultados son expresados como la media más menos el error estándar de la media.

b) Evaluación de la pureza de los cultivos neuronales

Se obtuvieron imágenes pertenecientes a los cultivos neuronales para cada marcaje de células gliales. Se contabilizó la cantidad de células por campo marcadas con anti-GFAP y DAPI (astrocitos); anti-APC y DAPI (oligodendrocitos); anti-Iba-1 y DAPI (microglía) y la cantidad de células totales mediante el conteo de los núcleos totales marcados con DAPI. Se estableció el porcentaje de células gliales en un total de entre 27 y 30 imágenes por marcaje en cada cultivo. Se calculó el promedio de células gliales presentes (astrocitos, oligodendrocitos y microglía) en cada cultivo. Los resultados son expresados como la media más menos el error estándar de la media.

Resultados

La abundancia de vGlut-1 en las terminales presinápticas es sensible a cambios en la actividad sináptica

Con el fin de estimar cambios en la función presináptica en condiciones basales y luego de la inducción de plasticidad sináptica homeostática, realizamos ensayos de inmunocitoquímica marcando el transportador de glutamato vesicular 1 (*Vesicular glutamate transporter 1*, vGlut-1), el marcador postsináptico Homer-1 y la proteína asociada a microtúbulos (*Microtubule-associated protein 2*, MAP-2) en cocultivos control y tratados con TTX (1 μ M). La intensidad de fluorescencia asociada a vGlut-1 se cuantificó en sinapsis individuales que mostraban una completa o parcial colocación de este marcador presináptico y el postsináptico Homer-1 (Figuras 8 y 9). Estudios previos muestran que la abundancia de vGlut-1 por vesícula sináptica se encuentra altamente controlada (Mutch et al., 2011). Por lo tanto, el marcaje de vGlut-1 es una medida confiable de la cantidad relativa de vesículas sinápticas presentes en terminales presinápticas excitatorias (de Jong et al., 2012). Además, la abundancia de vGlut-1 en las vesículas sinápticas se correlaciona directamente con *pr* y esta última es ajustada de forma compensatoria al modificar los niveles de actividad del circuito (Wilson et al., 2005, Herman et al., 2014). Por otra parte, un gran número de estudios muestran que la plasticidad sináptica homeostática puede ser inducida a través del uso de TTX, la cual actúa como antagonista específico de los canales de sodio sensibles al voltaje inhibiendo así la generación de potenciales de acción presinápticos (Murthy et al., 2001; Thiagarajan et al., 2005; Vitureira et al., 2012b). Mediante la estrategia utilizada se detectó un aumento significativo en los niveles de fluorescencia asociados al marcador vGlut-1 en cultivos tratados con TTX en comparación con cultivos no tratados (en unidades arbitrarias (AU); cultivos tratados: 10.04 ± 1.12 , cultivos control: 5.69 ± 0.85 , $p < 0.01$) (Figura 10). Estos resultados sugieren que la técnica utilizada es lo suficientemente sensible como para registrar un aumento en la abundancia de vGlut-1 en sinapsis individuales en cultivos tratados con TTX en comparación con cultivos control siendo clave para los restantes experimentos de este trabajo. Así, la técnica utilizada resulta una herramienta confiable para estimar cambios en la función presináptica en cultivos disociados de hipocampo.

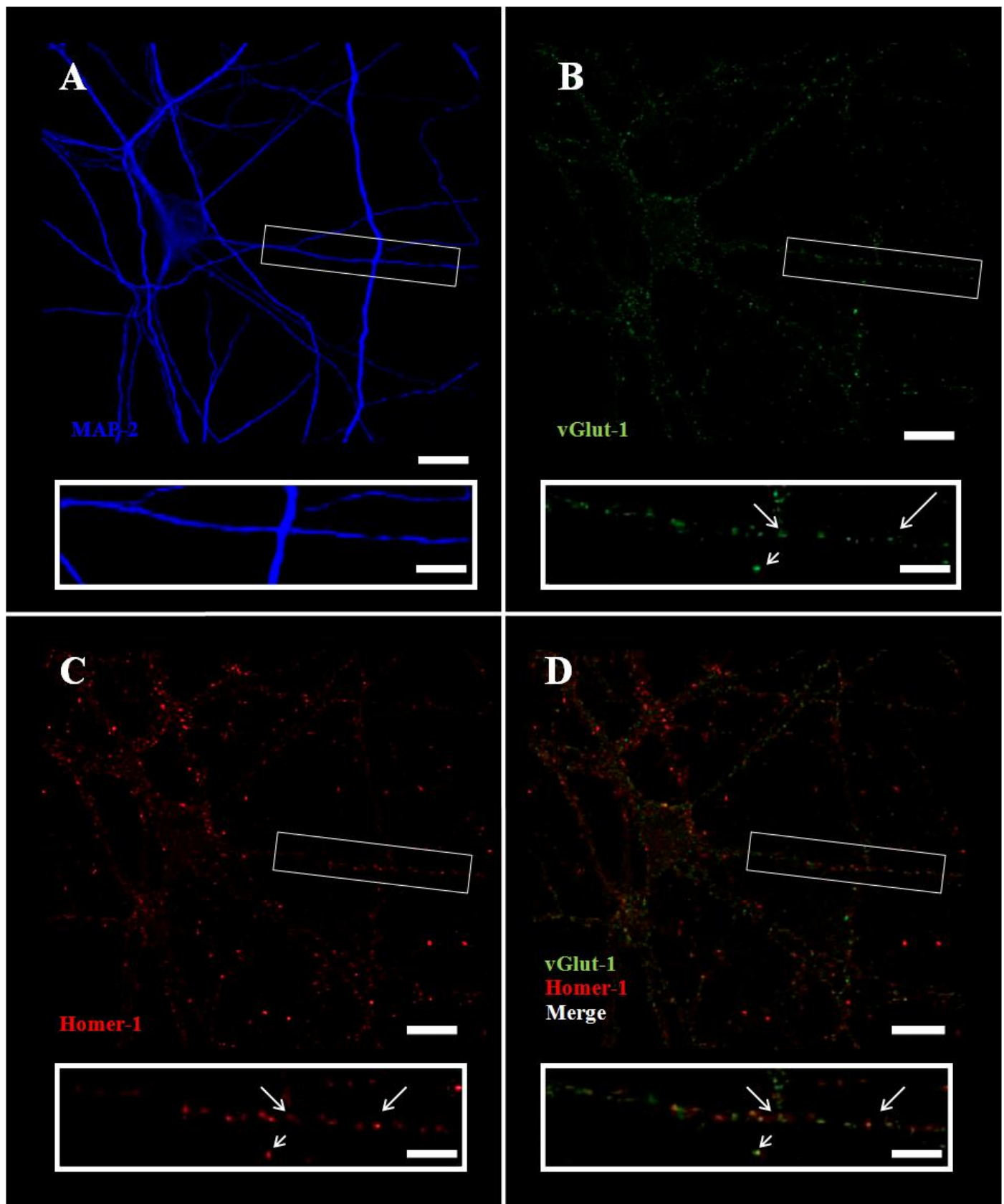


Figura 8: Imágenes representativas de un cocultivo de hipocampo control. Se realizó un triple marcaje contra vGlut-1 (A), Homer-1(B) y MAP-2 (C). Escala: 24μm. Se muestra una mayor magnificación de la región señalada con un rectángulo debajo de cada imagen. Escala: 4μm. Las flechas muestran botones sinápticos donde existe colocalización parcial o total del marcador vGlut-1 y Homer-1.

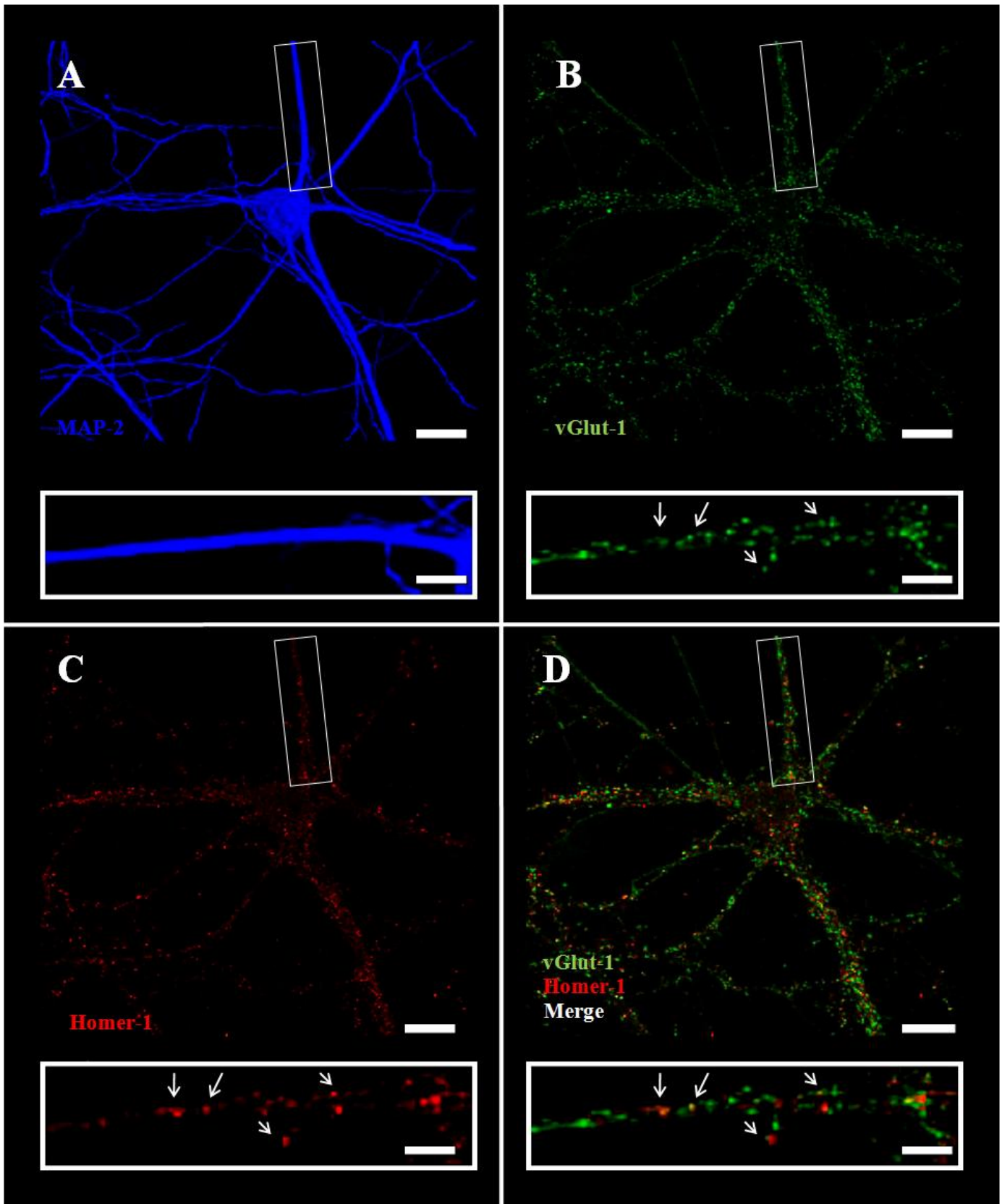


Figura 9: Imágenes representativas de un cocultivo de hipocampo tratado con TTX. Se realizó un triple marcaje contra vGlut-1 (A), Homer-1(B) y MAP-2 (C). Escala: 24 μ m. Se muestra una mayor magnificación de la región señalada con un rectángulo debajo de cada imagen. Escala: 4 μ m. Los círculos muestran botones sinápticos donde existe colocalización parcial o total del marcador vGlut-1 y Homer-1.

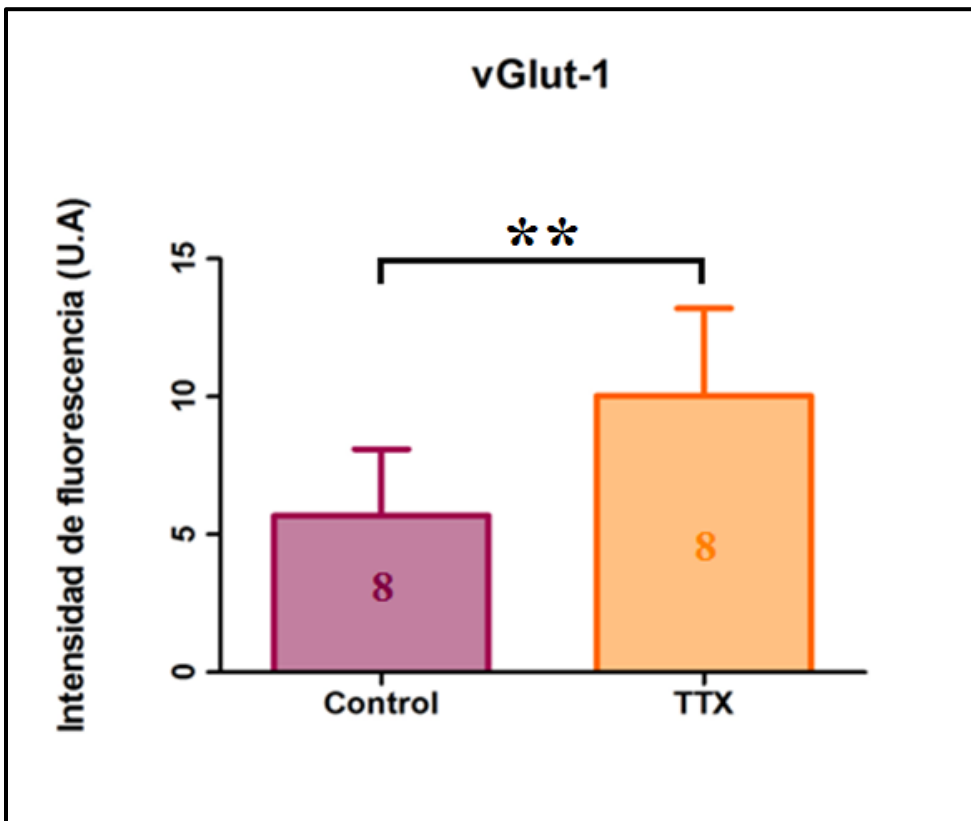


Figura 10: La abundancia de vGlut-1 es sensible a cambios en la actividad sináptica. Resumen de la intensidad de fluorescencia asociada vGlut-1 sináptico en cultivos control sin tratamiento y tratados con TTX. El número de neuronas analizadas se muestra cada columna de la gráfica. Los datos son expresados como media $\pm$ error estándar. $**p < 0.01$.

Los cultivos neuronales poseen un bajo porcentaje de glía

En los denominados “cultivos neuronales” realizamos ensayos de inmunocitoquímica para determinar el porcentaje de células gliales presentes, marcando en astrocitos la proteína ácida fibrilar glial (*Glial fibrillary acidic protein*, GFAP), en oligodendrocitos la proteína *Adenomatous polyposis coli* (APC) y en microglía la molécula adaptadora de unión a calcio ionizado 1 (*Ionized calcium binding adaptor molecule 1*, Iba-1). Además se marcaron los núcleos de todas las células presentes con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) (Figura 11). Los resultados en cuanto a porcentaje de pureza de los cultivos neuronales indican que los mismos presentan un $2.6\% \pm 0.7$ de astrocitos, un $0.9\% \pm 0.3$ de oligodendrocitos y un $2.7\% \pm 0.6$ de microglía. Estos resultados sugieren que los cultivos neuronales realizados tienen un alto nivel de pureza.

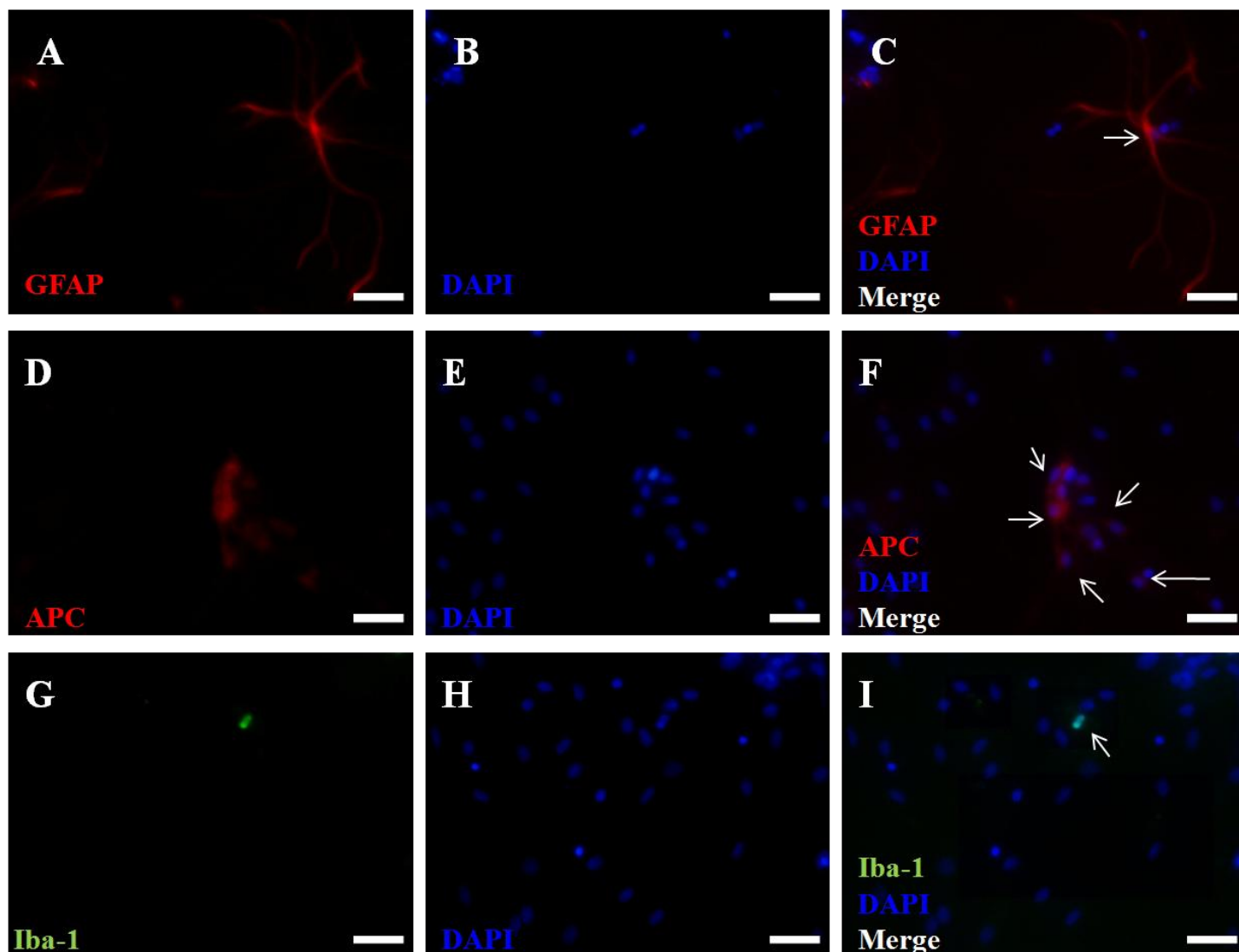


Figura 11: Imágenes representativas de cultivos neuronales para el análisis de presencia de glía. A-C) Presencia de astrocitos en cultivos neuronales. Se realizó un doble marcaje con anti-GFAP y DAPI. D-F) Presencia de oligodendrocitos en cultivos neuronales. Se realizó un doble marcaje con anti-APC y DAPI. G-I) Presencia de microglía en cultivos neuronales. Se realizó un doble marcaje con anti-Iba-1 y DAPI. Escala: 50 μ m

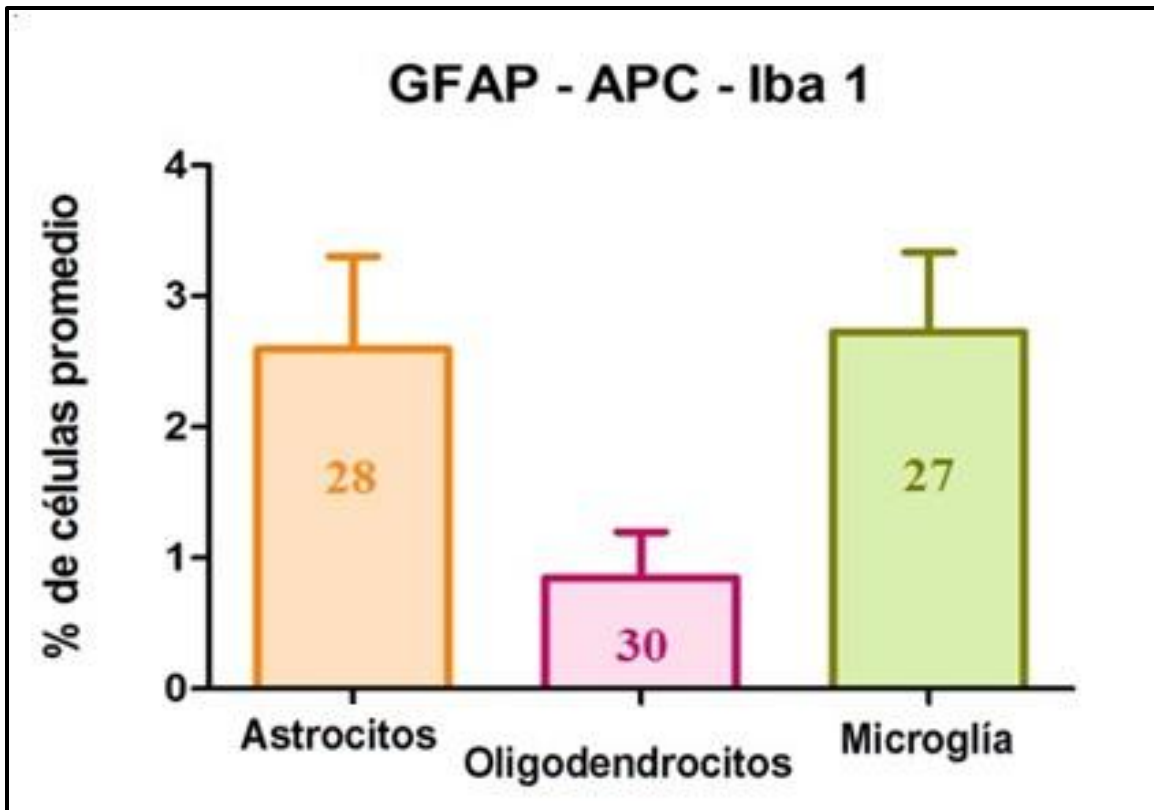


Figura 11: Los cultivos neuronales poseen una escasa presencia de glía. Resumen del porcentaje promedio de células gliales presentes en los cultivos neuronales analizados. El procedimiento de cálculo de porcentaje se detalla en materiales y métodos. El número de campos analizados se muestra en el gráfico. Los datos son expresados como media $\pm$ error estándar.

Inducción de plasticidad sináptica homeostática en cocultivos de neuronas y células gliales y en cultivos neuronales.

Con el fin de evaluar si las células gliales cumplen un rol importante en la inducción de plasticidad sináptica homeostática, realizamos ensayos de inmunocitoquímica marcando el transportador de glutamato 1 (vGlut-1), el marcador postsináptico Homer-1 y la proteína asociada a microtúbulos (MAP-2) en cocultivos y cultivos neuronales control y tratados (TTX, 1 μ M). La intensidad de fluorescencia asociada a vGlut-1 se cuantificó en sinapsis individuales que mostraban una completa o parcial colocalización de este marcador presináptico y el postsináptico Homer-1 (Figuras 12, 13, 14 y 15).

Mediante la técnica utilizada se detectó un aumento estadísticamente significativo en los niveles de fluorescencia asociados al marcador vGlut-1 en cocultivos tratados con TTX en comparación con cocultivos no tratados [en unidades arbitrarias (U.A., normalizado al control sin tratamiento);

cocultivos tratados con TTX: 1.75 ± 0.20 , cocultivos control: 0.96 ± 0.09 , $p < 0.01$] (Figura 16a). Sin embargo, no se detectaron cambios significativos en los niveles de fluorescencia asociados al marcador vGlut-1 en cultivos neuronales tratados con TTX en comparación con cultivos neuronales sin tratamiento [en unidades arbitrarias (U.A., normalizado al control sin tratamiento)]; cultivos neuronales tratados con TTX: 1.14 ± 0.05 , cultivos neuronales control: 1.01 ± 0.06 , $p > 0.05$] (Figura 16b). En conjunto, estos resultados sugieran que las células gliales cumplen una función esencial en la inducción y/o mantenimiento de la plasticidad sináptica homeostática en el hipocampo.

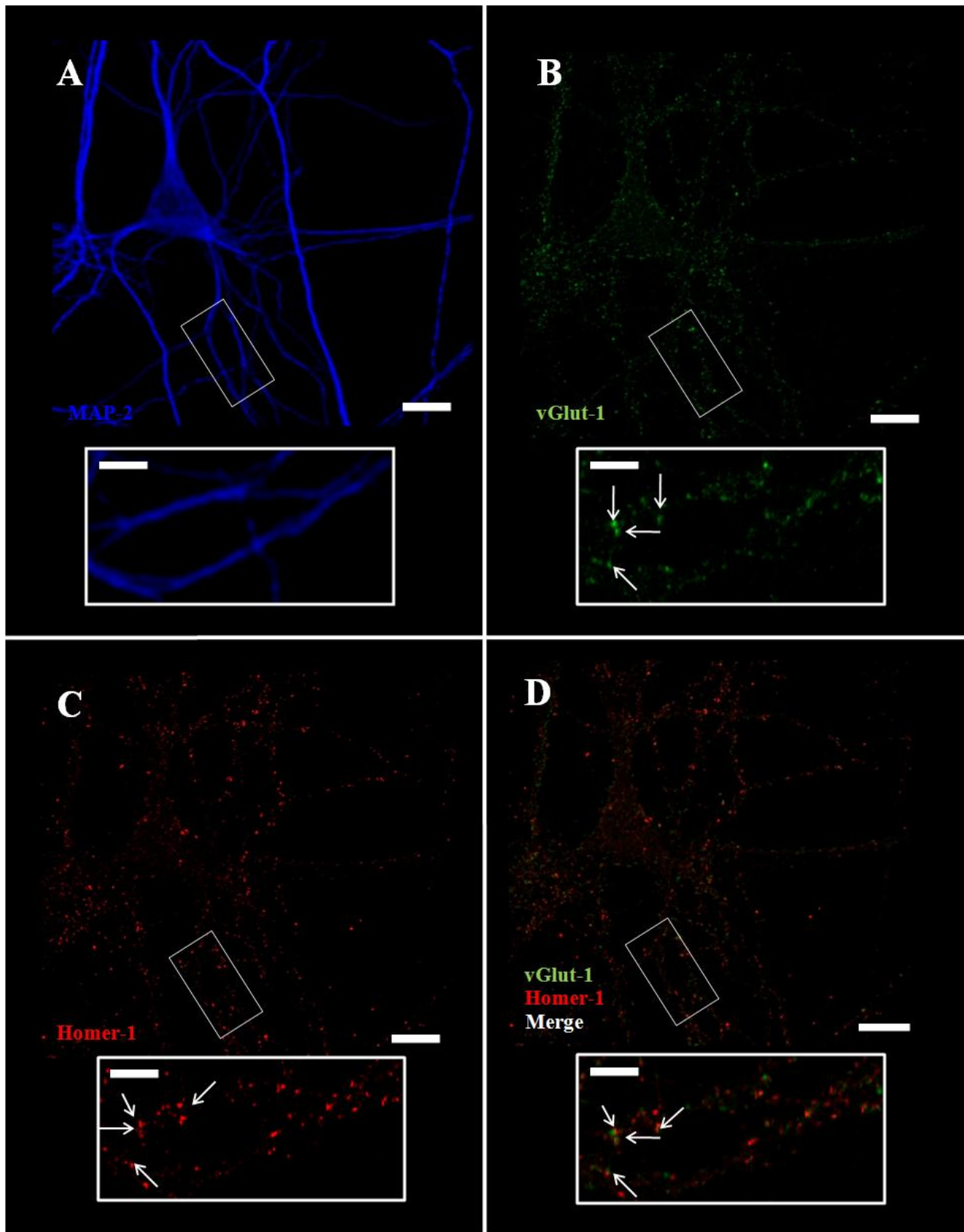


Figura 12: Imágenes representativas de un cocultivo de hipocampo control. A-D: Cocultivo de hipocampo control donde se realizó un triple marcaje contra MAP-2 (A), vGlut-1 (B) y Homer-1(C). Escala: 24µm. Mayor magnificación de la región señalada debajo de cada imagen. Escala: 4µm. Los círculos muestran botones sinápticos donde existe colocalización parcial o total del marcador vGlut-1 y Homer-1.

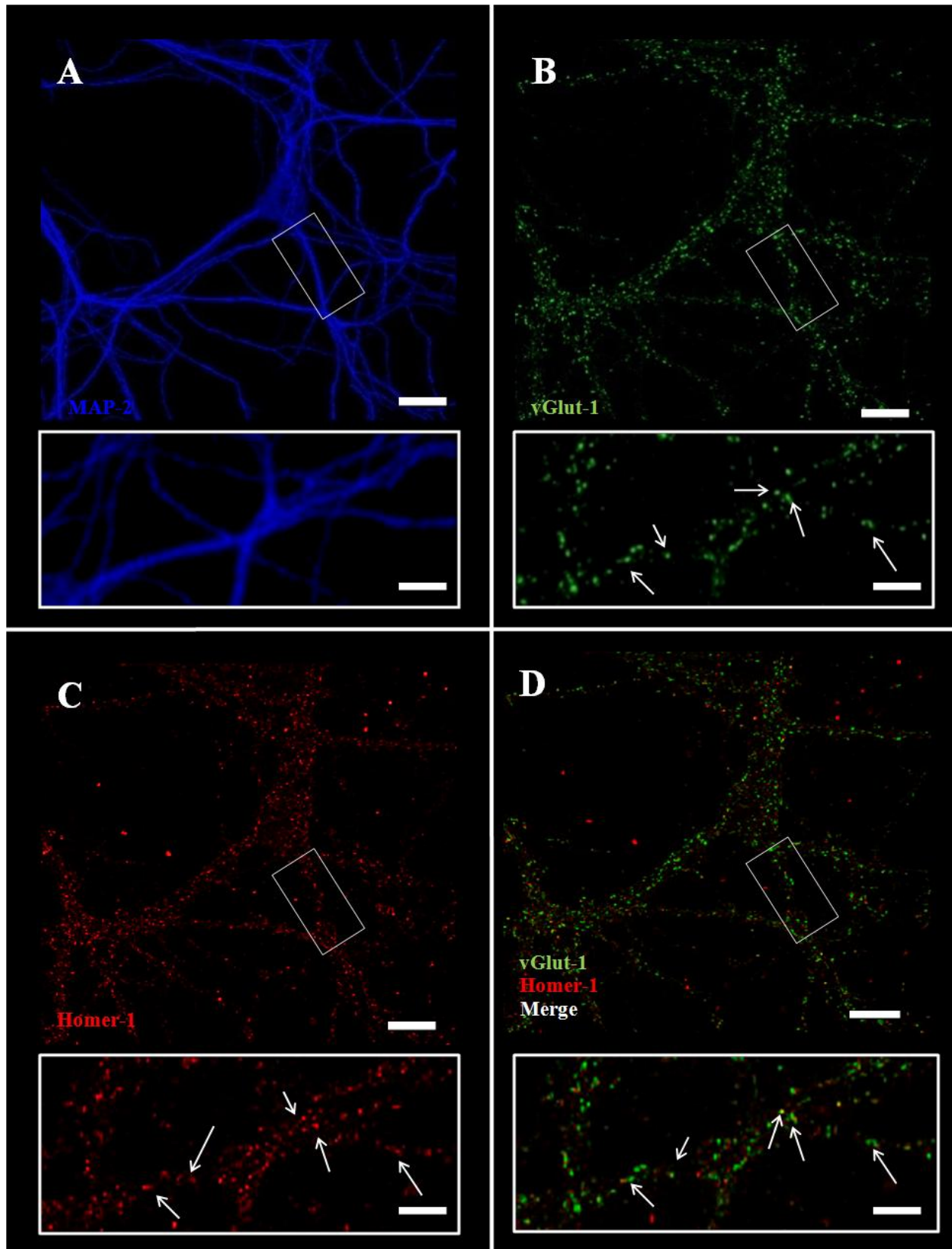


Figura 13: Imágenes representativas de un cocultivo de hipocampo tratado con TTX. A-D: Cocultivo de hipocampo tratado donde se realizó un triple marcaje contra MAP-2 (A), vGlut-1 (B) y Homer-1 (C). Escala: 24μM. Mayor magnificación de la región señalada debajo de cada imagen. Escala: 4μm. Los círculos muestran botones sinápticos donde existe colocalización parcial o total del marcador vGlut-1 y Homer-1.

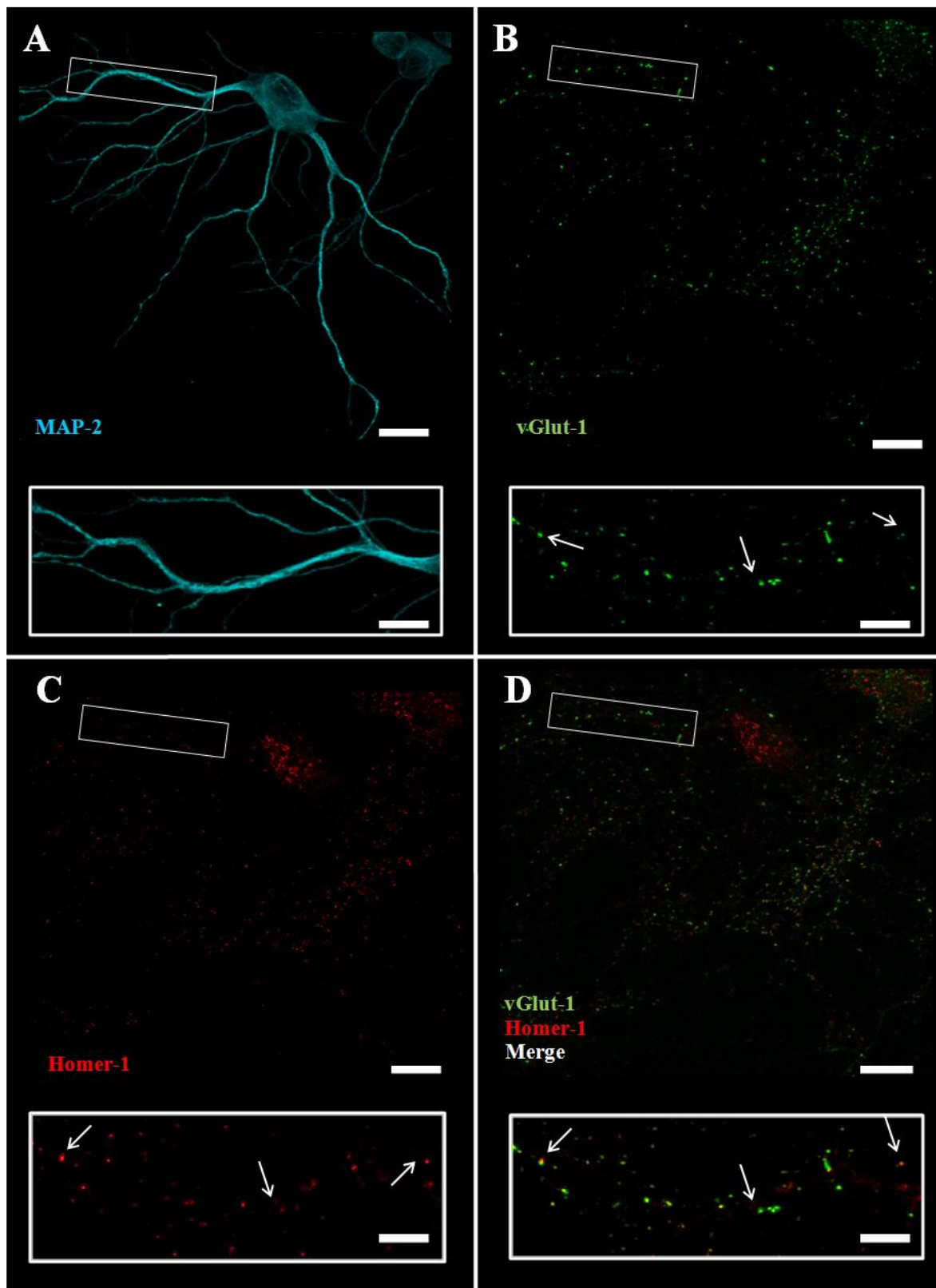


Figura 14: Imágenes representativas de un cultivo neuronal de hipocampo control. A-D: Cultivo neuronal de hipocampo control donde se realizó un triple marcaje contra MAP-2 (A), vGlut-1 (B) y Homer-1 (C). Escala: 24µm. Mayor magnificación de la región señalada debajo de cada imagen. Escala: 4µm. Los círculos muestran botones sinápticos donde existe colocalización parcial o total del marcador vGlut-1 y Homer-1.

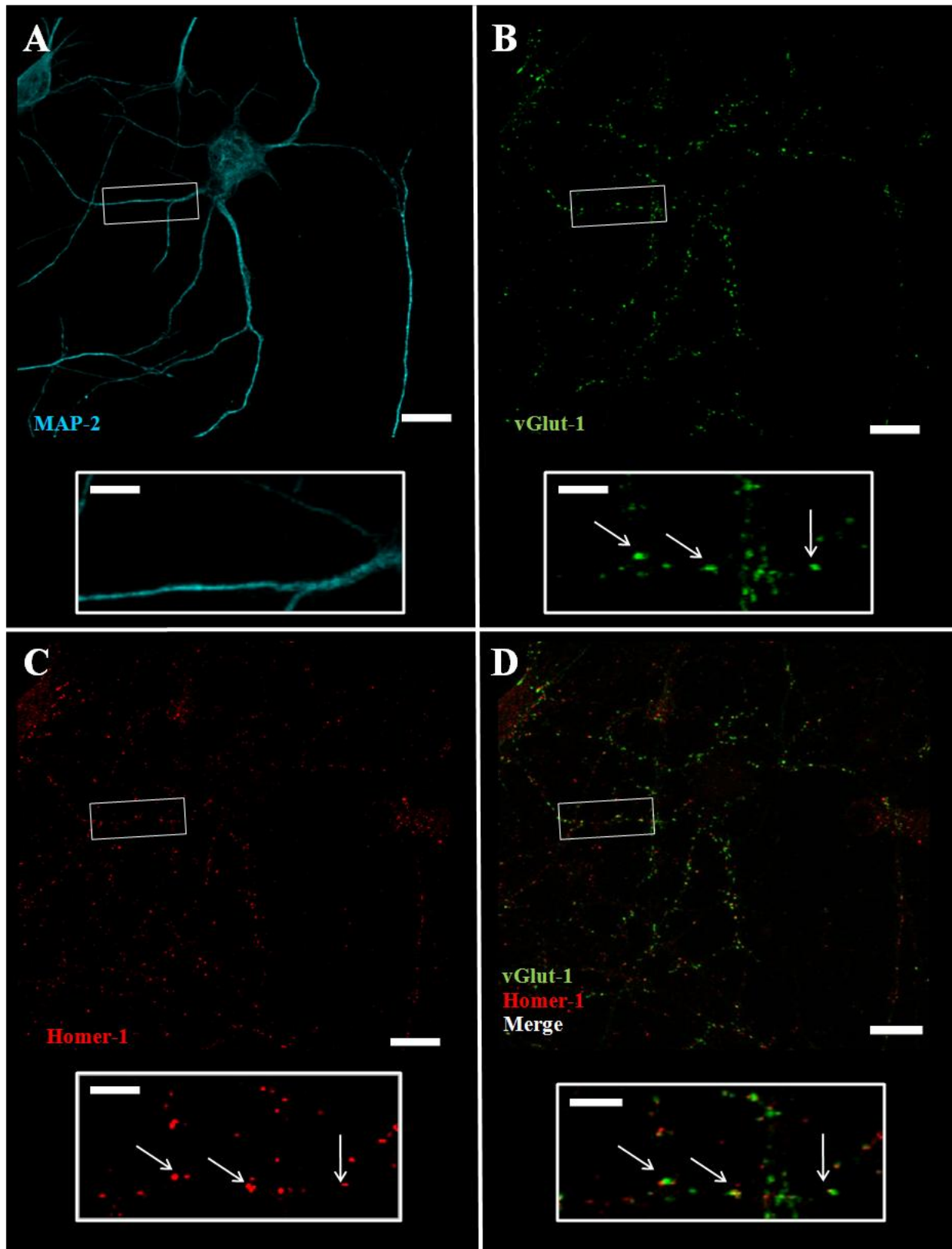


Figura 15: Imágenes representativas de un cultivo neuronal de hipocampo tratado con TTX. A-D: Cultivo neuronal de hipocampo tratado donde se realizó un triple marcaje contra MAP-2 (A), vGlut-1 (B) y Homer-1 (C). Escala: 24μm. Mayor magnificación de la región señalada debajo de cada imagen. Escala: 4μm. Los círculos muestran botones sinápticos donde existe colocalización parcial o total del marcador vGlut-1 y Homer-1.

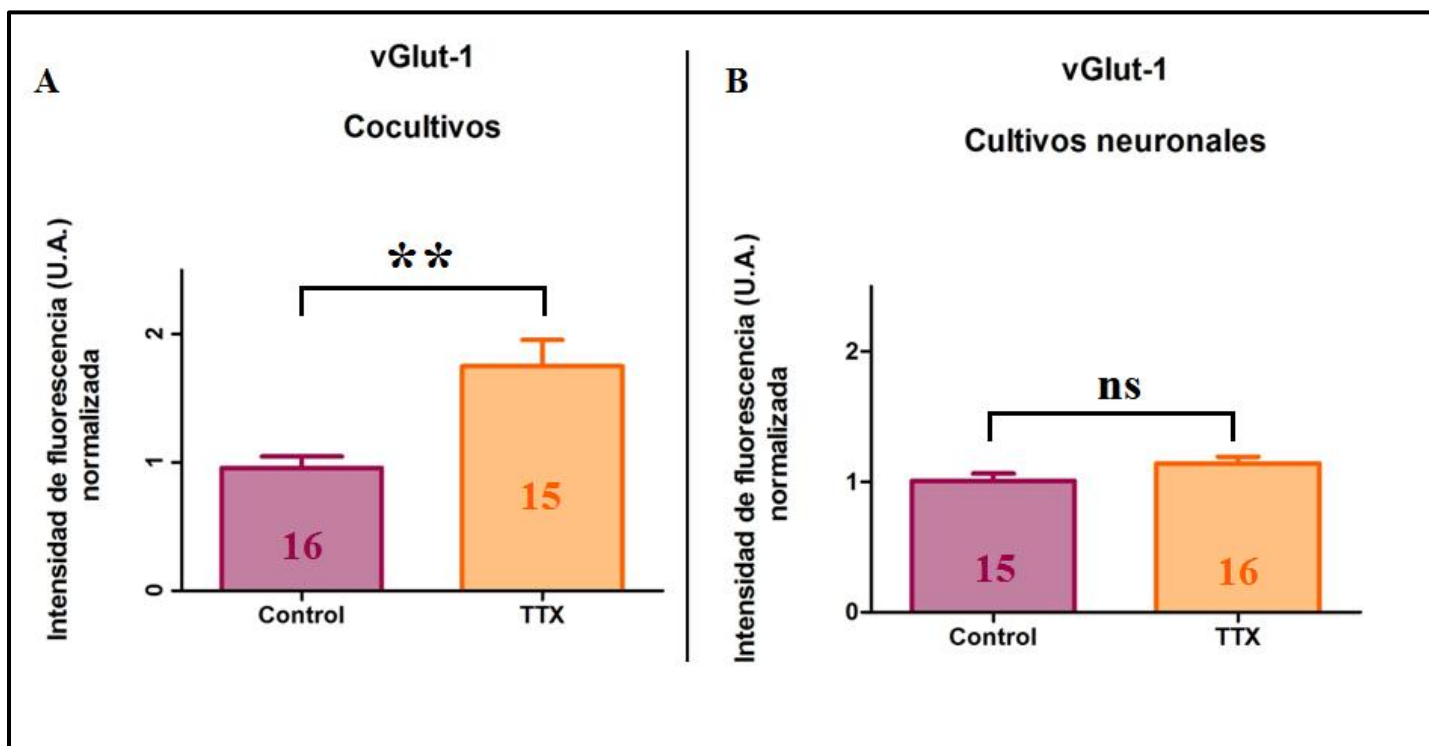


Figura 16: Cambios en la actividad sináptica provocan un aumento significativo de la cantidad de vGlut-1 en cocultivos y no así en cultivos neuronales. A) Resumen de la intensidad de fluorescencia normalizada respecto al control (sin tratamiento) de vGlut-1 sináptico en cocultivos control y tratados con TTX. El número de neuronas analizadas se muestra en la gráfica. Los datos son expresados como media $\pm$ error estándar. $**p < 0,01$. B) Resumen de la intensidad de fluorescencia normalizada respecto al control (sin tratamiento) de vGlut-1 sináptico en cultivos neuronales control y tratados con TTX. El número de neuronas analizadas se muestra en la gráfica. Los datos son expresados como media $\pm$ error estándar. $p = 0,080$.

Discusión

Este trabajo tiene como objetivo principal estudiar la importancia de las células gliales en la inducción y/o mantenimiento de plasticidad sináptica homeostática presináptica. Para esto, se validó una técnica de imagenología que resultó lo suficientemente sensible como para estimar cambios en la función presináptica. Así, teniendo en cuenta que la plasticidad sináptica homeostática pudo ser inducida mediante el uso de TTX coincidiendo con otros reportes (Murthy et al., 2001; Thiagarajan et al., 2005; Vitureira et al., 2012b) y que la abundancia de vGlut-1 sináptico es una medida confiable para estimar la función presináptica (de Jong et al., 2012), sugerimos que la técnica empleada es una herramienta confiable y por lo tanto, procedimos a utilizarla para analizar si las células gliales representan un factor relevante en los procesos de plasticidad sináptica homeostática presináptica. Por otra parte es importante contar con cultivos neuronales con ausencia o presencia limitada de células gliales para poder evaluar la posibilidad de inducir en los mismos plasticidad sináptica homeostática. Para validar el protocolo de realización de estos cultivos es necesario evaluar la cantidad de células gliales presentes en los mismos. Los resultados obtenidos en cuanto a la evaluación de la cantidad de glía presente indican porcentajes bajos de estas células. Si bien estos cultivos no son puros, creemos que la cantidad de glía presente no es suficiente para desempeñar un rol importante en la inducción y/o mantenimiento de la plasticidad sináptica homeostática por razones que se discutirán más adelante en esta sección.

Para inducir plasticidad sináptica homeostática es necesario que existan uno o varios componentes que censen el nivel de actividad, la integren en el lapso de tiempo correcto y la ajusten y mantengan en torno a un valor de referencia (Turrigiano, 2008). La imposibilidad de inducir plasticidad sináptica homeostática en cultivos neuronales con baja presencia de glía plantea la interrogante de que rol o roles cumple la glía en ese proceso, es decir, si dicha imposibilidad se da debido a carecer o tener una cantidad insuficiente del “sensor de actividad”, de quién integra la información sensada o de quien ajusta el nivel de actividad. Ya sea que las células gliales cumplan una o varias de estas funciones es claro que la ausencia de las mismas determina la imposibilidad de que se lleve a cabo la inducción y/o mantenimiento de plasticidad sináptica homeostática. Si bien este trabajo arroja resultados concretos en cuanto a que alguna de estas funciones (sensar actividad, integrar la información y/o ajustar los niveles de actividad) pueden ser llevadas a cabo por las células gliales en general, los grandes candidatos para desempeñar dichas funciones son los astrocitos. Características de este tipo de célula glial en particular y evidencias de estudios anteriores

que se expondrán a continuación explican la razón por la cual una baja proporción de los mismos no sería suficiente para la inducción de plasticidad sináptica homeostática.

Los astrocitos se encuentran en estrecho contacto y comunicación con las neuronas (Araque and Navarrete, 2010) por lo que puede plantearse la posibilidad de que sean capaces de sensor los niveles de actividad, siendo los responsables de detectar los cambios que desencadenan los procesos de plasticidad sináptica homeostática. La manera mediante la cual se produce la detección de los cambios en los niveles de actividad por parte de los astrocitos no se conoce aunque su proximidad con las neuronas y la presencia de transportadores y receptores para neurotransmisores en la superficie del astrocito son dos características interesantes que pueden estar involucradas. Estudios recientes determinaron que los astrocitos son capaces de responder a la frecuencia de la estimulación neuronal. Dicha respuesta consta de señales transitorias de calcio, no lineales, característica que indica que existe procesamiento de la información en estas células (Wallach et al., 2014). El procesamiento de información por parte de los astrocitos puede ser la clave para interpretar los cambios de actividad y desencadenar mecanismos que lleven a cambios compensatorios. Esta respuesta por parte de los astrocitos a la frecuencia de estimulación neuronal es abolida ante la aplicación de antagonistas de los receptores de glutamato, demostrando que dicha respuesta es mediada por este neurotransmisor (Wallach et al., 2014). Por lo tanto, puede sugerirse que los niveles de neurotransmisor podrían ser la clave para el establecimiento de un nivel de actividad umbral, que desencadenaría procesos de plasticidad sináptica homeostática. Sin embargo, consideramos esta hipótesis demasiado simple para los niveles de complejidad involucrados en estos procesos biológicos y creemos más probable la existencia de multifactorialidad para el desarrollo de este tipo de plasticidad. Otra característica de estas células gliales que ya fue mencionada en la introducción es la capacidad de liberar gliotransmisores (Araque and Navarrete, 2010). Esta característica junto con el hecho de que los astrocitos sean capaces de procesar información acerca de la actividad neural sugiere que los gliotransmisores pueden ser la respuesta de los astrocitos a cambios en dicha actividad. Una de estas sustancias, el $\text{TNF}\alpha$, liberado por la glía ya ha sido estudiado y se conoce que afecta la función sináptica provocando aumentos en la acumulación de receptores de glutamato (Turrigiano, 2006), es decir, se libera en procesos de plasticidad sináptica homeostática de tipo postsináptico. Resta investigar, si existen otros gliotransmisores capaces de afectar tanto la acumulación de receptores de glutamato como la probabilidad de liberación del neurotransmisor.

El vínculo entre la detección de las alteraciones en los niveles de actividad y la liberación de gliotransmisores podría ser la señalización mediante calcio. Los astrocitos utilizan el calcio del

retículo endoplasmático para mecanismos de señalización que pueden ser incluso propagados entre estas células gliales debido a la presencia de uniones gap (Araque and Navarrete, 2010). Estas uniones de tipo gap conectan los citoplasmas de los astrocitos que se encuentran en contacto y coordinan tanto la actividad eléctrica como metabólica del conjunto de astrocitos (Orellana et al., 2013). Podría proponerse la idea de que alteraciones en la actividad de la red podrían generar variaciones en la concentración de calcio que señalizan mecanismos de respuesta (liberación de gliotransmisores) a lo largo de toda la red.

La liberación de un gliotransmisor que desencadene los procesos de plasticidad sináptica homeostática es una hipótesis atractiva. Diversos estudios sugieren la presencia de varias sustancias que podrían estar involucradas (Turrigiano, 2006) por lo que consideramos que la inducción de este tipo de plasticidad puede depender de varios factores solubles. Los niveles de concentración de dichos factores pueden ser claves para la inducción de este tipo de plasticidad siendo quizás la combinación de estas concentraciones la que genere el ambiente propicio para la inducción. No se descarta también que se encuentren involucrados factores de origen neuronal ya que se conoce que el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), el cual es liberado por las neuronas de manera actividad dependiente, es capaz de reversar los efectos de TTX en cuanto a la inducción de “synaptic scaling”. Además, el bloqueo de BDNF con un receptor soluble provoca efectos similares a los que se producen con TTX (Rutherford et al., 1998). Sin embargo, los resultados de este trabajo determinan que de existir factores liberados por las neuronas que afecten la inducción y/o mantenimiento de la plasticidad sináptica homeostática, su sola presencia no es suficiente o su liberación depende de la presencia de glía.

Otra razón por la cual la hipótesis de la participación de gliotransmisores en plasticidad sináptica homeostática es atractiva, es el hecho de que este tipo de plasticidad tiene como resultado el cambio compensatorio de todas las sinapsis de manera de que se conserven las diferencias relativas de fuerzas sináptica, es decir, se aumenta o disminuye la fuerza sináptica de cada sinapsis de una red por un mismo factor. Esto es consistente con la liberación de gliotransmisores por parte de los astrocitos, ya que estos se encuentran comunicados por uniones gap, que como se expuso anteriormente, les proporcionan la posibilidad de responder de forma coordinada (Orellana et al., 2013). Dicha respuesta uniforme a lo largo de una red, podría explicar la capacidad de este tipo de plasticidad de conservar las diferencias relativas, aumentando o disminuyendo la fuerza sináptica por un mismo factor.

Todas las características mencionadas de los astrocitos sugieren la razón por la cual un bajo nivel de estos, no sería suficiente para cumplir la función que estas células tienen en los procesos de

plasticidad sináptica homeostática. Suponiendo que los astrocitos presentes puedan ser capaces de sensar la actividad neural o parte de ella y procesarla, creemos que específicamente hay dos factores que podrían imposibilitar la inducción de este tipo de plasticidad cuando estas células se encuentran en baja cantidad. Por un lado, imposibilidad de liberar una cantidad suficiente de gliotransmisores y establecer la concentración adecuada de los mismos para la inducción y/o mantenimiento de la plasticidad sináptica homeostática de toda la red neural. Por otra parte, la incapacidad de formar una correcta red de astrocitos (con uniones comunicantes de tipo gap) debido a la escasez de estas células, lo que impide una estrecha comunicación entre astrocitos y entre estos y las neuronas de toda la red. Por otra parte, se ha establecido que moléculas de adhesión de la postsinápsis controlan la eficacia de la presinapsis (Vitureira et al., 2012b) por lo que no descartamos la posibilidad de que la interacción, entre astrocitos y neuronas (o al menos, parte de ella) se establezca por medio de moléculas de adhesión. Lo expuesto acerca de los astrocitos y su posible rol en la plasticidad sináptica homeostática se enmarca en el concepto de sinapsis tripartita, el cual plantea que los astrocitos son parte esencial de la comunicación entre neuronas. Si bien lo planteado constituye una hipótesis atractiva, esta debe abordarse en futuras investigaciones.

Lo expuesto hasta el momento se resume en la figura 17 donde se establece de manera esquemática los distintos pasos que llevan a los ajustes compensatorios propios del tipo de plasticidad en la que se centra este trabajo. Ante la adición de TTX, se bloquean los canales de sodio (1) lo que produce una disminución de la actividad (2) la cual es sensada de alguna manera por los astrocitos (3) provocando variaciones en los niveles de calcio citoplasmático (4). Ante alteraciones en la concentración de calcio podría producirse una cascada de señalización que involucraría distintos intermediarios (5) la cual culmina con la liberación de gliotransmisores (6), los cuales se unen a sus receptores específicos en las neuronas (7). Esto podría desencadenar nuevas cascadas con distintos intermediarios (8) que promueven un aumento de la probabilidad de liberación del neurotransmisor y/o la acumulación de receptores de glutamato (9).

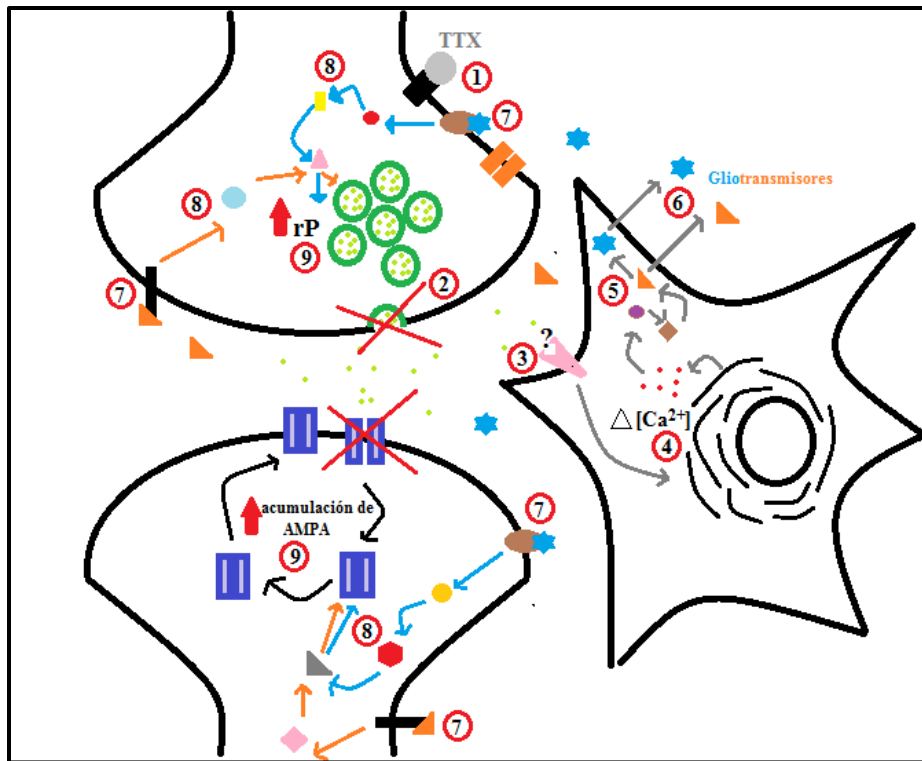


Figura 17: Modelo de gliotransmisión en plasticidad sináptica homeostática. (1) Bloqueo de canales de sodio con TTX (2) Disminución de la actividad (3) sentido por los astrocitos (4). Variaciones en los niveles de calcio citoplasmático (5) cascada de con varios intermediarios (6) la liberación de gliotransmisores (7) unión de gliotransmisores a sus receptores en las neuronas (8) nuevas cascadas con distintos intermediarios (9) Aumento de la probabilidad de liberación del neurotransmisor y/o la acumulación de receptores de glutamato

Los resultados de este trabajo son consistentes con un papel fundamental de la glía en la inducción y/o mantenimiento de la plasticidad sináptica homeostática. Sin embargo, el detalle de los mecanismos moleculares involucrados en este proceso son aún desconocidos. En este trabajo se hace especial énfasis en la posibilidad de que los astrocitos y gliotransmisores liberados por estos sean cruciales debido a la evidencia constatada en la bibliografía, por lo tanto, sería interesante abordar experimentalmente dicha posibilidad como una perspectiva a futuro. Para esto, sería interesante, diseñar estrategias experimentales que aborden aspectos específicos de la comunicación entre astrocitos y la gliotransmisión. Particularmente sería de nuestro interés estudiar el efecto de un bloqueo a nivel de las uniones gap de los astrocitos, de manera de establecer el rol de la comunicación vía estos canales en la plasticidad sináptica homeostática.

Conclusiones

De acuerdo con los objetivos establecidos podemos concluir lo siguiente:

1. La detección de los cambios en la abundancia de vGlut-1 a nivel de sinapsis individuales mediante inmunocitoquímica permite estimar cambios en la función presináptica de manera confiable.
2. Los cultivos neuronales realizados poseen una baja proporción de glía.
3. La plasticidad sináptica homeostática puede ser inducida en cocultivos mediante el bloqueo crónico de la actividad del circuito con TTX, no así en cultivos neuronales con escasa proporción de glía.

Bibliografía

- Abbott, L.F., and Nelson, S.B. (2000). *Synaptic plasticity : taming the beast*. Nat. Neurosci. 3, 1178–1183.
- Abbott, L.F., and Regehr, W.G. (2004). *Synaptic computation*. Nature 431, 796–803.
- Abraham, W.C., and Bear, M.F. (1996). *Metaplasticity : plasticity of synaptic plasticity*. Trends Neurosci. 19, 126–130.
- Araque, A., and Navarrete, M. (2010). *Glial cells in neuronal network function*. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 365, 2375–2381.
- Araque, A., Carmignoto, G., Haydon, P.G., Oliet, S.H.R., Robitaille, R., and Volterra, A. (2014). *Gliotransmitters Travel in Time and Space*. Neuron 81, 728–739.
- Bacci, A., Coco, S., Pravettoni, E., Schenk, U., Armano, S., Frassoni, C., Verderio, C., Camilli, P. De, and Matteoli, M. (2001). *Chronic Blockade of Glutamate Receptors Enhances Presynaptic Release and Downregulates the Interaction between Synaptophysin- Synaptobrevin – Vesicle-Associated Membrane Protein 2*. J. Neurosci. 21, 6588–6596.
- Beattie, M.S., Malenka, R.C., Beattie, E.C., Stellwagen, D., Morishita, W., Bresnahan, J.C., Ha, B.K., and Zastrow, M. Von (2002). *Control of Synaptic Strength by Glial TNF α* . Science. 295, 2282–2285.
- Branco, T., Staras, K., Darcy, K.J., and Goda, Y. (2008). *Local dendritic activity sets release probability at hippocampal synapses*. Neuron 59, 475–485.
- Burrone, J., O’Byrne, M., and Murthy, V.N. (2002). *Multiple forms of synaptic plasticity triggered by selective suppression of activity in individual neurons*. Nature 420, 414–418.
- Del Castillo, J., and Katz, B. (1954). *Quantal Components Of The End-Plate Potential*. J. Physiol. 124, 560–573.
- Custer, K.L., Austin, N.S., Sullivan, J.M., and Bajjalieh, S.M. (2006). *Synaptic vesicle protein 2 enhances release probability at quiescent synapses*. J. Neurosci. 26, 1303–1313.
- D. Purves (2007). *Neurociencia*, 3ª edición, Buenos Aires, Editorial Panamericana.
- Desai, N.S. (2004). *Homeostatic plasticity in the CNS: synaptic and intrinsic forms*. J. Physiol. Paris 97, 391–402.
- Han, E.B., and Stevens, C.F. (2009). *Development regulates a switch between post and presynaptic strengthening in response to activity deprivation*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106, 10817–10822.
- Harris, K.M., and Weinberg (2012). *Ultrastructure of Synapses in the Mammalian Brain*. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 4, 1–30.
- Henneberger, C., Papouin, T., Oliet, S.H.R., and Dmitri, A. (2010). *Long term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes*. Nature 463, 232–236.

- Herman, M. a, Ackermann, F., Trimbuch, T., and Rosenmund, C. (2014). ***Vesicular glutamate transporter expression level affects synaptic vesicle release probability at hippocampal synapses in culture.*** J. Neurosci. 34, 11781–11791.
- Ibata, K., Sun, Q., and Turrigiano, G.G. (2008). ***Rapid synaptic scaling induced by changes in postsynaptic firing.*** Neuron 57, 819–826.
- De Jong, A.P.H., Schmitz, S.K., Toonen, R.F.G., and Verhage, M. (2012). ***Dendritic position is a major determinant of presynaptic strength.*** J. Cell Biol. 197, 327–337.
- Jourdain, P., Bergersen, L.H., Bhaukaurally, K., Bezzi, P., Santello, M., Domercq, M., Matute, C., Tonello, F., Gundersen, V., and Volterra, A. (2007). ***Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength.*** Nat. Neurosci. 10, 331–339.
- Kilman, V., Rossum, M.C.W. Van, and Turrigiano, G.G. (2002). ***Activity Deprivation Reduces Miniature IPSC Amplitude by Decreasing the Number of Postsynaptic GABA A Receptors Clustered at Neocortical Synapses.*** J. Neurosci. 22, 1328–1337.
- Kirov, S. a, Goddard, C.A., and Harris, K.M. (2004). ***Age-dependence in the homeostatic upregulation of hippocampal dendritic spine number during blocked synaptic transmission.*** Neuropharmacology 47, 640–648.
- Lazarevic, V., Schöne, C., Heine, M., Gundelfinger, E.D., and Fejtova, A. (2011). ***Extensive remodeling of the presynaptic cytomatrix upon homeostatic adaptation to network activity silencing.*** J. Neurosci. 31, 10189–10200.
- Lisman, J.E., Raghavachari, S., and Tsien, R.W. (2007). ***The sequence of events that underlie quantal transmission at central glutamatergic synapses.*** Nat. Rev. Neurosci. 8, 597–609.
- Lissin, D., Gomperts, S., and Reed, C. (1998). ***Activity differentially regulates the surface expression of synaptic AMPA and NMDA glutamate receptors.*** Proc. Nat. Acad. Sci. USA 95, 7097–7102.
- Liu, Z. (2005). ***Molecular mechanism of TNF signaling and beyond.*** Nature 15, 24–27.
- Mammen, A.L., Hugarir, R.L., and Brien, R.J.O. (1997). ***Redistribution and Stabilization of Cell Surface Glutamate Receptors during Synapse Formation.*** J. Neurosci. 17, 7351–7358.
- Marder, E., and Goaillard, J.-M. (2006). ***Variability, compensation and homeostasis in neuron and network function.*** Nat. Rev. Neurosci. 7, 563–574.
- Moulder, K.L., Jiang, X., Taylor, A.A., Olney, J.W., and Mennerick, S. (2006). ***Physiological activity depresses synaptic function through an effect on vesicle priming.*** J. Neurosci. 26, 6618–6626.
- Murthy, V.N., Schikorski, T., Stevens, C.F., Zhu, Y., and Jolla, L. (2001). ***Inactivity Produces Increases in Neurotransmitter Release and Synapse Size.*** Neuron 32, 673–682.
- Mutch, S.A., Kensel-hammes, P., Gadd, J.C., Fujimoto, B.S., Allen, R.W., Schiro, P.G., Lorenz, R.M., Kuyper, C.L., Jason, S., Bajjalieh, S.M., et al. (2011). ***Protein quantification at the single vesicle level reveals that a subset of synaptic vesicle proteins are trafficked with high precision.*** J. Neurosci. 31, 1461–1470.

- Navarrete, M., and Araque, A. (2010). ***Endocannabinoids potentiate synaptic transmission through stimulation of astrocytes.*** *Neuron* 68, 113–126.
- Navarrete, M., Perea, G., Fernandez de Sevilla, D., Gómez-Gonzalo, M., Núñez, A., Martín, E.D., and Araque, A. (2012). ***Astrocytes mediate in vivo cholinergic-induced synaptic plasticity.*** *PLoS Biol.* 10, e1001259.
- O'Brien, R., Kamboj, S., and Ehlers, M. (1998). ***Activity-dependent modulation of synaptic AMPA receptor accumulation.*** *Neuron* 21, 1067–1078.
- Orellana, J.A., Martinez, A.D., and Retamal, M.A. (2013). ***Gap junction channels and hemichannels in the CNS: regulation by signaling molecules.*** *Neuropharmacology* 75, 567–582.
- Perea, G., and Araque, A. (2005). ***Properties of synaptically evoked astrocyte calcium signal reveal synaptic information processing by astrocytes.*** *J. Neurosci.* 25, 2192–2203.
- Pozo, K., and Goda, Y. (2010). ***Unraveling mechanisms of homeostatic synaptic plasticity.*** *Neuron* 66, 337–351.
- Rutherford, L.C., Nelson, S.B., and Turrigiano, G.G. (1998). ***BDNF Has Opposite Effects on the Quantal Amplitude of Pyramidal Neuron and Interneuron Excitatory Synapses.*** *Neuron* 21, 521–530.
- Sheng, M., and Kim, E. (2011). ***The postsynaptic organization of synapses.*** *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, 1–20.
- Shiraishi-Yamaguchi, Y., and Furuichi, T. (2007). ***The Homer family proteins.*** *Genome Biol.* 8, 206.
- Stellwagen, D., and Malenka, R.C. (2006). ***Synaptic scaling mediated by glial TNF-alpha.*** *Nature* 440, 1054–1059.
- Stellwagen, D., Beattie, E.C., Seo, J.Y., and Malenka, R.C. (2005). ***Differential regulation of AMPA receptor and GABA receptor trafficking by tumor necrosis factor-alpha.*** *J. Neurosci.* 25, 3219–3228.
- Südhof, T.C. (2013a). ***The Presynaptic Active Zone.*** *Neuron* 75, 11–25.
- Südhof, T.C. (2013b). ***Neurotransmitter Release: The Last Millisecond in the Life of a Synaptic Vesicle.*** *Neuron* 80, 675–690.
- Sutton, M. a, Ito, H.T., Cressy, P., Kempf, C., Woo, J.C., and Schuman, E.M. (2006). ***Miniature neurotransmission stabilizes synaptic function via tonic suppression of local dendritic protein synthesis.*** *Cell* 125, 785–799.
- Thiagarajan, T.C., Lindskog, M., and Tsien, R.W. (2005). ***Adaptation to synaptic inactivity in hippocampal neurons.*** *Neuron* 47, 725–737.
- Tokuoka, H., and 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.
- Turrigiano, G.G (1999). ***Homeostatic plasticity in neuronal networks: the more things change, the more they stay the same.*** *Trends Neurosci.* 22, 221–227.

- Turrigiano, G.G. (2000). ***AMPA receptors unbound: membrane cycling and synaptic plasticity***. Neuron 26, 5–8.
- Turrigiano, G.G. (2006). ***More than a sidekick: glia and homeostatic synaptic plasticity***. Trends Mol. Med. 12, 455–458.
- Turrigiano, G.G. (2008). ***The self-tuning neuron: synaptic scaling of excitatory synapses***. Cell 135, 422–435.
- Turrigiano, G.G., and Nelson, S.B. (1998). ***Thinking Globally , Acting Locally : AMPA Receptor Turnover What determines the strength of a synapse , and how***. Neuron 21, 1997–1999.
- Turrigiano, G.G., and Nelson, S.B. (2004). ***Homeostatic plasticity in the developing nervous system***. Nat. Rev. Neurosci. 5, 97–107.
- Vitureira, N., and Goda, Y. (2013). ***The interplay between Hebbian and homeostatic synaptic plasticity***. J. Cell Biol. 203, 175–186.
- Vitureira, N., Letellier, M., and Goda, Y. (2012a). ***Homeostatic synaptic plasticity: from single synapses to neural circuits***. Curr. Opin. Neurobiol. 22, 516–521.
- Vitureira, N., Letellier, M., White, I.J., and Goda, Y. (2012b). ***Differential control of presynaptic efficacy by postsynaptic N-cadherin and β -catenin***. Nat. Neurosci. 15, 81–89.
- Wallach, G., Lallouette, J., Herzog, N., De Pittà, M., Ben Jacob, E., Berry, H., and Hanein, Y. (2014). ***Glutamate mediated astrocytic filtering of neuronal activity***. PLoS Comput. Biol. 10, e1003964.
- Wilson, N.R., Kang, J., Hueske, E. V, Leung, T., Varoqui, H., Murnick, J.G., Erickson, J.D., and Liu, G. (2005). ***Presynaptic Regulation of Quantal Size by the Vesicular Glutamate Transporter VGLUT1***. 25, 6221–6234.
- Zhang, Z., Gong, N., Wang, W., Xu, L., and Xu, T.-L. (2008). ***Bell-shaped D-serine actions on hippocampal long-term depression and spatial memory retrieval***. Cereb. Cortex 18, 2391–2401.
- Zhao, C., Dreosti, E., and Lagnado, L. (2011). ***Homeostatic synaptic plasticity through changes in presynaptic calcium influx***. J. Neurosci. 31, 7492–7496.
- Zhuang, Z., Yang, B., Theus, M.H., Sick, J.T., Bethea, J.R., and Thomas, J. (2011). ***EphrinBs regulate D-serine synthesis and release in astro- cytes***. J. Neurosci. 30, 16015–16024.