

**PLASTICIDAD DE MICROCIRCUITOS NEURONALES EN EL  
HIPOCAMPO-II  
RESPONSABLE: DR. RAFAEL GUTIERREZ AGUILAR**

**ANTECEDENTES**

El presente proyecto es continuación del proyecto con el mismo nombre, al que se le añade el numeral dos romano (II), y la solicitud de su continuidad en esta convocatoria CB-2015 se apega a lo marcado en los términos de referencia, a saber, que el proyecto del que se deriva no deberá tener una vigencia mayor a 90 días naturales después de la fecha comprometida de publicación de resultados de la convocatoria, fijada inicialmente para el 19 de agosto del 2015 y que recientemente se ha aplazado. El proyecto aprobado en 2012 tiene vigencia hasta el 16 de octubre del 2015, por lo que se encuentra dentro del tiempo especificado. El informe académico final de este proyecto será presentado en el mes de septiembre, así como el informe financiero.

El hipocampo es una estructura del lóbulo temporal involucrada en el aprendizaje y la memoria. Su integridad anatómica y funcional es alterada en pacientes que sufren de epilepsia, de enfermedad de Alzheimer y de esquizofrenia, y esto también se observa en modelos animales de estas patologías. El esclarecimiento de los patrones de comunicación anatómica y, más importante aún, la integración funcional entre las neuronas de las diferentes subregiones de esta estructura permitirá, eventualmente, contar con las herramientas necesarias para combatir el deterioro celular que subyace a las patologías mencionadas. Una segunda característica, que hace que el hipocampo sea tan estudiado, se debe a que es una preparación biológica muy poderosa como modelo experimental in vitro, en la que la preparación del mismo en rebanadas permite el estudio muy sistemático de la comunicación neuronal por tener una disposición laminada y, además, es una estructura conservada casi invariable a lo largo de la escala filogenética.

Para el presente proyecto, partimos de dos aportaciones originales que hemos hecho para el entendimiento de su fisiología, y que han sido vastamente reconocidas. 1) Describimos que las células granulares del giro dentado (GD) de la rata son capaces de cambiar de fenotipo de neurotransmisor, esto les permite, por tanto, coliberar transitoriamente glutamato y GABA (Beltrán y Gutiérrez, 2012; Münster-Wandowski et al., 2013). 2) Con experimentos electrofisiológicos y ultraestructurales describimos la presencia de sinapsis mixtas eléctricas-químicas de las células granulares con una población de células piramidales. Esta es la primera evidencia de sinapsis axo-dendríticas mixtas en el telencéfalo de mamíferos (Vivar y col., 2012; Hamzei-Sichani y col., 2012; Münster-Wandowski et al., 2013). Además del estudio de esta sinapsis a nivel celular, hemos abordado su estudio a nivel de microcircuitos; es decir, considerando su función y participación dentro de una red neuronal

delimitada. El enfoque experimental que la neurociencia ha tomado en los últimos años es el registro simultáneo de la actividad de docenas o cientos de neuronas, así como sus interacciones, para entender cómo los circuitos neuronales se forman e integran las diferentes funciones de control que lleva a cabo el sistema nervioso.

Los procesos fisiológicos y fisiopatológicos en los cuales la transmisión mixta pudiera estar involucrada están siendo activamente estudiados ya que la coliberación de neurotransmisores y la utilización de señalización mixta eléctrica-química por las neuronas tienen implicaciones importantes en la transmisión de información en sistema nervioso. Estos estudios de transmisión sináptica y su plasticidad han sido el principal objetivo de nuestro laboratorio en los últimos años y hemos hecho avances sustanciales que nos han llevado a empezar a explorar un segundo aspecto que, si bien está íntimamente relacionado con los aspectos celulares que hemos estado estudiando, implica un segundo nivel de complejidad. Este aspecto se refiere a la interacción de neuronas, capaces de comunicarse con una señal mixta, como parte de un microcircuito. Es decir, partimos del supuesto que los cambios plásticos en la comunicación entre “n” par de neuronas, que necesariamente forman parte de un circuito neuronal discreto, implica que la actividad del microcircuito se vea modificada también.

Es cada vez más evidente que los estudios que van teniendo mayor impacto en las neurociencias, y a los cuales se les ha invertido un gran capital, se han centrado en el análisis de grupos de neuronas, conformados en circuitos (microcircuitos), capaces de funcionar como una unidad o módulo. Por un lado, los estudios tradicionales de transmisión y plasticidad sináptica realizados en el hipocampo, que son muy abundantes, no dan cuenta de las interacciones entre las estructuras o entre grupos de células que las conforman. Por otro, la gran cantidad de refinados estudios conductuales que correlacionan la actividad neuronal, de una o varias neuronas, con procesos cognitivos, también dejan a un lado las interacciones entre las neuronas que pueden conformar “módulos”. De hecho, no ha sido sino hasta recientemente que se han retomado con gran ímpetu los estudios de oscilaciones neuronales con los que se ha supuesto la participación de módulos en la generación de actividad oscilatoria, sin embargo, apenas se comienza a analizar la participación de componentes neuronales específicos y sus interacciones en la generación de esta actividad. Más aún, la transmisión mixta, debido a lo reciente de su descripción, no ha sido estudiada en circuitos. Estudios en los ganglios basales han permitido observar microcircuitos “en acción” mediante la medición de la actividad de decenas de células con técnicas ópticas que pueden ser complementadas con registros electrofisiológicos (Carrillo-Reid et al., 2008). Gracias al uso de técnicas de imagenología es posible visualizar los componentes de los microcircuitos inmersos en una aparente disposición caótica de las células. En contraste, el hipocampo tiene un diseño anatómico laminar, con capas bien delimitadas en cuyas neuronas se disponen de manera regular (Andersen y col., 1971). Es claro que, independientemente de que existen conexiones entre ciertas interneuronas

y entre interneuronas y células principales dentro de cada región del hipocampo, se considera que el flujo de información en la formación hipocampal va de la corteza entorrinal, al giro dentado, a CA3, a CA1 y retorna a la corteza entorrinal. Más aún, se ha supuesto que las conexiones que existen, por ejemplo, entre el GD y la zona CA3 tienen una disposición tal que la hoja superior del GD contacta las regiones distales de CA3 mientras que la hoja inferior contacta regiones de CA3 próximas al hilus. Este arreglo y la baja conectividad de las células granulares con las piramidales de CA3 han sido considerados como una manera que tiene el sistema de delimitar patrones de actividad; más aún, recientemente hemos sugerido que la baja incidencia de conexiones eléctricas entre estas células (5%) parece responder a una selección de blancos postsinápticos que puedan conformar módulos (Vivar y col., 2012). Sin embargo, la existencia de estos módulos GD-CA3 no ha sido corroborada experimentalmente.

En el proyecto emprendido, desde su planteamiento inicial, nos propusimos **determinar “la electro-anatomía funcional” del giro dentado y del área CA3 del hipocampo, que ha sido sugerida por los anatomistas, pero nunca corroborada funcionalmente. Sabiendo el posible arreglo de las conexiones entre estas estructuras podríamos determinar si la generación de patrones de actividad de alta frecuencia responde a la activación de microcircuitos neuronales formados por células del GD y de CA3 actuando en concierto. La idea imperante es que el área CA3 tiene módulos intrínsecos independientes del GD, pero nuestros hallazgos nos han hecho plantear la hipótesis de la existencia de micromódulos trans-estructurales. Finalmente, queremos responder cómo el cambio de fenotipo de las células granulares y las sinapsis mixtas eléctricas-químicas modulan la actividad de estos microcircuitos.**

Para ello nos planteamos analizar la dinámica de los patrones de actividad generada por microcircuitos, en rebanadas de hipocampo, realizando registros con 4096 microelectrodos (en un área de 2x2 mm) de manera simultánea.

**Informe resumido del proyecto previo “Plasticidad de microcircuitos neuronales en el hipocampo” (I010/176/2012 clave: CB-2011-01; 166712)**

**Las actividades y resultados obtenidos del proyecto planteado y apoyado hace 3 años son los siguientes. Hago notar que parte de estos resultados también se mencionan más abajo como “resultados preliminares” para la ejecución del presente proyecto:**

1) El estudiante de doctorado, Franco Ortiz, responsable de la parte experimental del proyecto, hizo sendas estancias en Heidelberg, Alemania y Génova, Italia para entrenarse en el uso de la matriz de microelectrodos así como en el análisis de datos. La primera estancia la hizo en un laboratorio de la U. de Heidelberg que tiene experiencia en este tipo de análisis y que colabora con nosotros, y la segunda en el laboratorio de Italia

donde se desarrolló el equipo que adquirimos. Ahí recibió entrenamiento en el uso del equipo y programas de adquisición de actividad.

2) Durante 9 meses colaboró en nuestro proyecto Andrea Ibarra, estudiante graduada de la carrera de Matemáticas aplicadas del ITAM, quien actualmente realiza su maestría en Alemania. Andrea, junto con Franco Ortiz desarrollaron herramientas de cómputo para el análisis de la actividad de cientos de neuronas registradas simultáneamente. Mientras llegaba el equipo necesario para los registros (matriz de 4096 microelectrodos 3Brain), se desarrollaron estas herramientas que permiten filtrar e identificar actividad neuronal unitaria, digitalizarla y almacenarla con todas las etiquetas pertinentes para su posterior análisis. Todos estos desarrollos se realizaron a partir de registros eléctricos que Franco Ortiz realizó en Alemania e Italia debido a que el equipo que fue comprado con los fondos del proyecto aprobado no llegó y no fue instalado sino hasta febrero del 2014 (El atraso en la compra del equipo fue el principal “problema surgido”).

3) En paralelo al desarrollo de las herramientas computacionales mencionadas, durante este tiempo de espera del equipo, determinamos cómo las células del giro dentado y de CA3 transmiten información en función de la frecuencia y cómo pueden generar actividad de alta frecuencia. Era necesario contar con esta información antes del registro “masivo de células”. Estos resultados dieron origen a los siguientes artículos:

**Franco LM, Beltrán JQ, Tapia JA, Ortiz F, Manjarrez E, Gutiérrez R. Differential frequency-dependent antidromic resonance of the Schaffer collaterals and mossy fibers. Brain Struct Funct. 2015, DOI 10.1007/s00429-015-1003-1. (este trabajo derivó de las tesis de maestría de Luis Franco y Jesús Beltrán).**

**Ortiz F, Gutiérrez R. Entorhinal cortex lesions result in adenosine-sensitive high frequency oscillations in the hippocampus. Exp. Neurol. 271:319-328, 2015. (este trabajo derivó de la tesis de licenciatura de Francisco Ortiz)**

4) Asimismo, determinamos cómo integran los diferentes tipos de células de CA3, las piramidales y las interneuronas, la información que le llega del giro dentado. Analizamos las propiedades sinápticas e intrínsecas de las células antes y después del cambio de fenotipo y de la apertura de gap junctions. Estos trabajos se realizaron con la colaboración del Dr. Mario Treviño, Dra. Carmen Vivar (ambos ex-estudiantes de doctorado de mi laboratorio), Dr. Emilio Galván (ex-investigador postdoctoral de mi laboratorio) y de la Dra. Bianca Vizcarra (investigadora post-doctoral actualmente adscrita al laboratorio). Con estos datos, complementamos los reportados anteriormente (Treviño y col., 2011) y tenemos caracterizadas las propiedades de integración y de transmisión de información de cada una de las células del circuito. Lo que sigue es, pues, su estudio en conjunto (ver punto siguiente).

Con respecto a la caracterización de las propiedades de cada tipo neuronal, se realizaron los siguientes trabajos:

**Galván EJ, Pérez-Rosello T, Gómez-Lira G, Lara E, Gutiérrez R, Barrionuevo G. Synapse-specific compartmentalization of signaling cascades for LTP induction in CA3 interneurons. Neuroscience 290: 332-345, 2015.**

Terminamos el análisis de la entrada GABAérgica de las fibras musgosas sobre las diferentes poblaciones de interneuronas de CA3 (**Galván y Gutiérrez, en preparación**); estamos por terminar el manuscrito para enviarlo a su publicación en el mes de septiembre.

Terminamos la comparación entre las propiedades de integración de las células piramidales y las interneuronas (**Treviño, Vivar, Vizcarra y Gutiérrez, en preparación**); esperamos enviar el manuscrito para su publicación en el mes de septiembre.

Con respecto a la forma de transmisión utilizada por las fibras musgosas sobre las diferentes células blanco y su plasticidad, publicamos los siguientes trabajos:

**Münster-Wandowski A, Gómez-Lira G, Gutiérrez R. Mixed neurotransmission in the hippocampal mossy fibers. Front. Cell. Neurosci. 7:210, 2013. doi: 10.3389/fncel.2013.00210.**

**Osorio, B., León, U., Galván, E.J., Gutiérrez, R. Co-Cultures of GFP<sup>+</sup>-granule cells with GFP<sup>-</sup>-pyramidal cells and interneurons for the study of mossy fiber neurotransmission with paired recordings. Hippocampus 23: 247-252, 2013.**

5) El desarrollo del proyecto, en lo que respecta a los registros de alta densidad, constituye la tesis doctoral de Franco Ortiz, quien actualmente cursa el octavo semestre del doctorado. **Franco Ortiz y Andrea Ibarra desarrollaron métodos de correlación de la actividad del GD y de CA3 para determinar la arquitectura de sus conexiones.** Este análisis está siendo ampliado y optimizado con la ayuda de la Dra. Alicia Aviño (profesora del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey) y del Dr. Zapfe, investigador postdoctoral en nuestro laboratorio, ya que el tiempo de cómputo de los análisis planteados inicialmente era de varios días. Actualmente se ha reducido a unas horas, pero se está optimizando al tiempo que se está escalando para analizar un mayor número de células y de sus interacciones de manera simultánea. Esto permitió generar resultados que fueron presentados en tres seminarios y dos simposios en Alemania. Ver sección de “resultados preliminares”.

6) **El Dr. Zapfe implementó el análisis de densidad de fuentes de corriente con alta definición espacio-temporal, así como sus características dinámicas.** Este estudio será publicado en forma de resumen en un congreso internacional en diciembre de este año (Zapfe, Ortiz y Gutiérrez,

2015) y actualmente preparamos un manuscrito para ser enviado a publicación a una revista.

**Zapfe, W.K., Ortiz, F., Gutiérrez, R. Computation of center of mass from voltage and current source density of epileptiform activity in the hippocampus. Annual Meeting of the American Epilepsy Society, Philadelphia USA. 2015.**

7) Se desarrolló una herramienta de cómputo, que está siendo completada y probada, para el reconocimiento de “motifs” (formas de onda con características en amplitud y frecuencia definidas). Este trabajo fue comenzado con la participación del Dr. Mario Treviño y recientemente se unió a nuestro grupo de trabajo la Cand. Dra. Janet Barroso, quienes siguen desarrollando esta herramienta. Cabe mencionar que, en parte de este trabajo, también colabora con nosotros un grupo de la Universidad de Heidelberg (ver más adelante).

8) Se impartieron conferencias, en las que se presentaron los avances en sendos Congresos de la Academia Mexicana de Neurología 2012, 2014, 2015; Impartí 5 conferencias en el Instituto de Neurociencias de la U. de Guadalajara durante 2013-2015; Universidad Iberoamericana 2014; ITAM, 2014; Simposio sobre Microcircuitos en la Universidad de Heidelberg, 2013, 2015; Simposio “Hipocampo, fisiología y fisiopatología”, Universidad Humboldt de Berlín 2013. Se me otorgó la cátedra “Mercator” en la Universidad de Heidelberg, con la que se oficializa una colaboración sobre el estudio de microcircuitos con el grupo del Prof. Andreas Draguhn, experto en el campo.

9) Obtención de grado:

Diana Ribera, Maestría en Farmacología y Terapéutica Experimental. Tesis: Acoplamiento metabólico entre células de hipocampo en cultivos como evidencia de sinapsis eléctricas. Enero 2014.

Otros estudiantes que participaron con sendas estancias de investigación, apoyados por el proyecto fueron:

Andrea Ibarra (nivel maestría), Bianca Vizcarra (postdoctoral), Karel Zapfe (postdoctoral)

### **Plan de trabajo para el periodo de esta solicitud**

**A partir de las herramientas desarrolladas y los resultados obtenidos al momento, proponemos para el período de los siguientes 3 años el siguiente plan de trabajo.**

#### **Antecedentes**

Como mencioné al introducir el proyecto, los estudios anatómicos sobre el hipocampo (Claiborne et al., 1986; Andersen y col. 1971; Galimberti et al., 2010) han propuesto una estructura anatómica laminar y un circuito de flujo de información básico en la estructura. Este consta de una primera sinapsis hecha por la corteza entorrinal que excita al giro dentado y área CA3. El



giro dentado, a su vez, activa al área CA3 y ésta al área CA1. De CA1 sale la información de regreso a la corteza entorrinal.

Sin embargo, si bien se ha comprobado que el flujo de información sigue esa secuencia, eso no quiere decir que éste se restrinja a ese modelo simplificado; se sabe que hay interconexiones que no necesariamente siguen ese modelo. Sin embargo lo más importante a destacar aquí es que no se sabe cómo se constituyen las interacciones funcionales de las neuronas que forman parte de la estructura que proyecta y la que la recibe, es decir, lo que se conoce ahora como el “conectoma” y, menos aún, la efectividad o funcionalidad de tales conexiones. Remarco: 1) el trazado de tales conexiones es muy parcial e inexacta por haber sido trazadas a partir de cortes histológicos y 2) las conexiones anatómicas no necesariamente reflejan el estado funcional, incluyendo las interacciones de los diferentes componentes.

**La meta del presente proyecto es la descripción de las conexiones funcionales, y sus interacciones, de la proyección del giro dentado al área CA3. Debido a la gran cantidad de experimentación que se lleva a cabo en el hipocampo, por numerosos grupos de investigación en todo el mundo, realizaremos este “trazado funcional” en hipocampo de rata y de ratón.**

Las herramientas matemáticas y computacionales previamente descritas (ver también resultados preliminares) están siendo probadas y continuamente actualizadas con registros de grandes números de neuronas. Los algoritmos que determinen causalidad de interacciones entre neuronas o grupos de ellas, así como el “objetivo final”, el trazado de la electro-anatomía, es ambicioso y creemos que lo completaremos en los siguientes 3 años. Más aún, prevemos identificar también el tipo de neuronas activas, ya que se sabe que la morfología de los potenciales de acción sirve para discriminar entre neuronas piramidales e interneuronas. Cabe mencionar que el planteamiento inicial era desarrollar este mapa para el hipocampo de rata y hemos empezado a hacerlo en paralelo en hipocampo de ratón.

Debido a nuestros avances y por las presentaciones de nuestros resultados en foros internacionales, el grupo del Prof. Andreas Draguhn, de la Universidad de Heidelberg, nos ha incluido como parte de un proyecto de alto alcance en un esfuerzo de varios grupos en Alemania por entender el flujo de información en el hipocampo. En el proyecto que llevamos a cabo con ellos abordaremos el análisis de este flujo con alta resolución espacio-temporal. Este análisis solo puede ser realizado con el equipo con el que nosotros contamos, ya que ellos usan matrices de 64 electrodos. Así, debido a que el proyecto de nuestro laboratorio plantea entender el arreglo funcional entre el giro dentado-CA3, que es la entrada de información en el hipocampo, la salida de información, del área CA1 a la corteza entorrinal es el interés del grupo Alemán, por lo que se complementan (ver Keller et al., 2015). En el transcurso del último año, hemos formalizado la ejecución del proyecto conjunto con intercambio de estudiantes. El estudiante de

doctorado Franco Ortiz ha ido un par de veces a Heidelberg y durante septiembre de este año un estudiante de doctorado del grupo del Prof. Draguhn trabajará en nuestro laboratorio.

Para abordar un objetivo tan ambicioso, partimos del conocimiento anatómico que gran cantidad de estudios morfológicos ha generado en cuanto a la organización de las conexiones entre estas dos estructuras y de estudios recientes en los que hemos ya obtenido suficiente información que nos permite plantear las siguientes hipótesis en esta propuesta de investigación.

**HIPOTESIS 1.** El tipo e incidencia de conexiones entre las células granulares del GD y la zona CA3 del hipocampo sugiere la existencia de ensambles de neuronas, o microcircuitos formados por células del GD y de CA3 que podrán ser discernibles electrofisiológicamente, por medio de registros de sitios múltiples en rebanadas de hipocampo, in vitro.

**HIPOTESIS 2.** Los patrones de actividad generados por los microcircuitos GD-CA3 en rebanadas de hipocampo serán modificados por i) cambios en la expresión del fenotipo de neurotransmisor en las células granulares (que dependen del desarrollo) y ii) por la apertura o cierre de conexiones eléctricas entre éstas y las células piramidales de CA3.

**OBJETIVO GENERAL 1.** Identificar electrofisiológicamente en rebanadas de hipocampo los microcircuitos que establecen las células granulares del GD con las piramidales de CA3 [GD-CA3]<sub>n</sub>, así como determinar los patrones de actividad que éstos generan.

**OBJETIVO GENERAL 2.** Determinar el efecto que el cambio de fenotipo de las células granulares (dependiente de desarrollo) y la apertura y cierre de conexiones eléctricas tiene en los patrones de actividad generados por los ensambles neuronales o microcircuitos caracterizados.

### OBJETIVOS PARTICULARES

1. Realizaremos registros múltiples simultáneos con arreglos de microelectrodos de alta densidad (4096 canales) en rebanadas transversales y coronales de hipocampo de rata y ratón. Para identificar los microcircuitos, correlacionaremos la actividad evocada y espontánea de campo y multiunitaria registrada con los electrodos del GD con la actividad de campo y multiunitaria registrada con los electrodos de CA3. La adición en este estudio de rebanadas de hipocampo de ratón tiene como fin: primero, correlacionar nuestros resultados con los que obtienen nuestros colaboradores en Alemania y segundo, y muy importante, es que cada vez más se usan roedores transgénicos, y la primera opción para su desarrollo es el ratón, antes que la rata.

2. Determinaremos los patrones de actividad generados por dichos microcircuitos y los compararemos en dos tipos de preparaciones: i) rebanadas de ratas/ratones adultos (>25 días de edad) y ii) en rebanadas



de ratas/ratones antes del cambio de fenotipo de neurotransmisor (<20 días de edad) (Gómez-Lira y col., 2005).

3. Determinaremos los patrones de actividad generados por dichos microcircuitos antes y después del bloqueo de receptores a glutamato y GABA (Treviño y col., 2007; Franco et al., 2014) y antes y después del bloqueo de conexiones eléctricas por fármacos o cambios de pH (Vivar y col., 2012; González-Nieto et al., 2008).

4. Correlacionaremos la actividad de campo registrada con la actividad multiunitaria obtenida de la misma señal con los filtros apropiados.

4. Seguiremos desarrollando herramientas matemáticas y de computación para optimizar la obtención y tratamiento de los datos.

6. Meta final: trazar la electro-anatomía funcional de la proyección GD-CA3 y cómo es el paso de información entre ellas.

## **METODOLOGÍA CIENTÍFICA**

### Infraestructura disponible

Nuestro laboratorio cuenta con espacio suficiente y equipo necesario para la realización de este proyecto. La pieza fundamental, la matriz de 4096 electrodos fue ya adquirida y está en funcionamiento.

Asimismo, se ha adquirido equipo de cómputo de alto poder para poder analizar la gran cantidad de información derivada de los experimentos. Para la adquisición de este equipo de cómputo fue destinado íntegramente el monto que con motivo de un premio en el área de investigación médica nos otorgó la Fundación Miguel Alemán a mediados del 2015.

### Rebanadas de hipocampo-corteza entorrinal

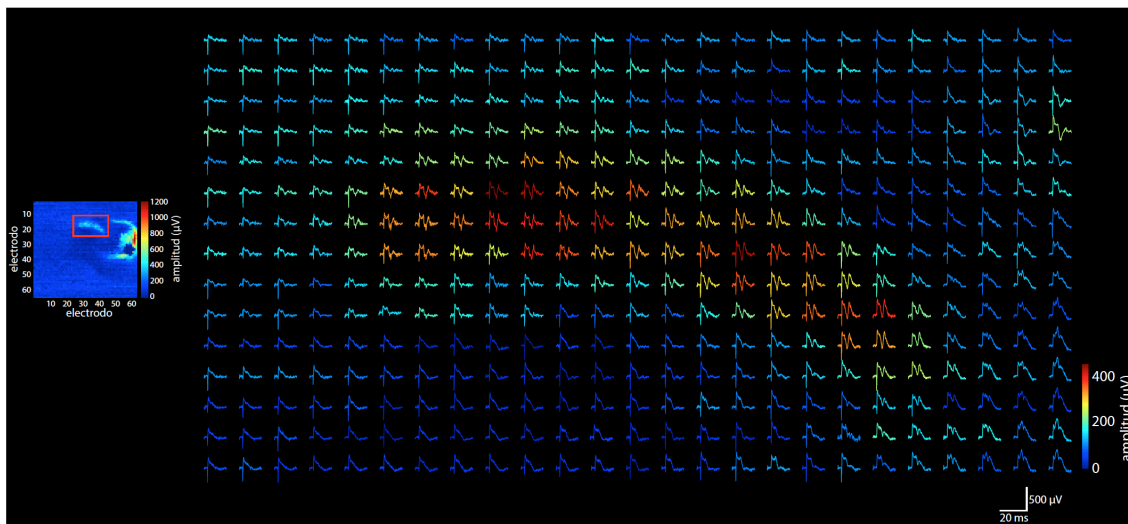
Se prepararán a partir de cerebros de ratas Sprague Dawley y de ratones C57Bl6-J de 15 y 20 días de edad. Se cortarán en sentido transversal y en sentido coronal para inferir las posibles orientaciones que las proyecciones del GD tengan hacia CA3. Los cortes tendrán 350  $\mu\text{m}$  de espesor y su preparación se realiza de manera rutinaria en nuestro laboratorio, según ha sido descrito (Gutiérrez, 2000). Las rebanadas se mantendrán sumergidas en un vaso de precipitado con líquido cefalorraquídeo artificial (LCRA) oxigenado a temperatura ambiente por lo menos durante dos horas antes de su uso. La composición del LCRA (en mM) es: 129 NaCl, 3 KCl, 1.25  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1.8  $\text{MgSO}_4$ , 1.6  $\text{CaCl}_2$ , 20  $\text{NaHCO}_3$  y 10 glucosa, pH de 7.4 (y variaciones de 7.2 a 7.8) a  $\sim 25^\circ\text{C}$  y se mantiene gaseado continuamente con 95 %  $\text{O}_2$ -5%  $\text{CO}_2$ . Para su registro, las rebanadas se transferirán a una matriz de multielectrodos (MEA) de 4096 canales (sistema BioCAM 4096 de 3Brain) continuamente perfundidas con LCRA.

### Registros electrofisiológicos

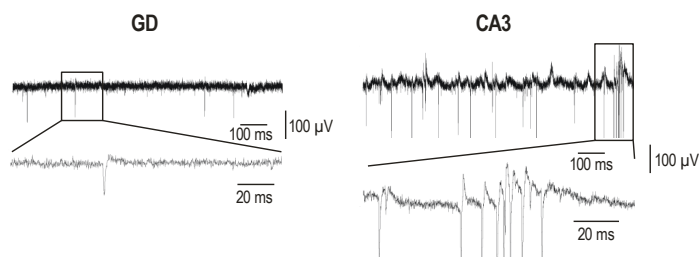
Para el registro se utilizarán matrices de multielectrodos de 4096 canales (sistema BioCAM 4096 de 3Brain). Los electrodos de esta matriz permiten el registro de actividad de campo y de actividad multiunitaria (ver resultados

preliminares). Se obtendrán registros de actividad de campo y multiunitaria tanto evocada como espontánea y se adquirirán en una PC con el software propio del sistema.

Con esta nueva metodología, no solo es posible detectar la actividad de campo (Fig. 1), sino que además es posible registrar células aisladas (Fig. 2). De hecho, hemos podido registrar más de 2000 neuronas simultáneamente e identificarlas espacial y funcionalmente. Una vez adquirida la información analógica, se digitalizan los potenciales de acción y, finalmente, son generadas diversas representaciones de su actividad y su interrelación (Fig. 3).



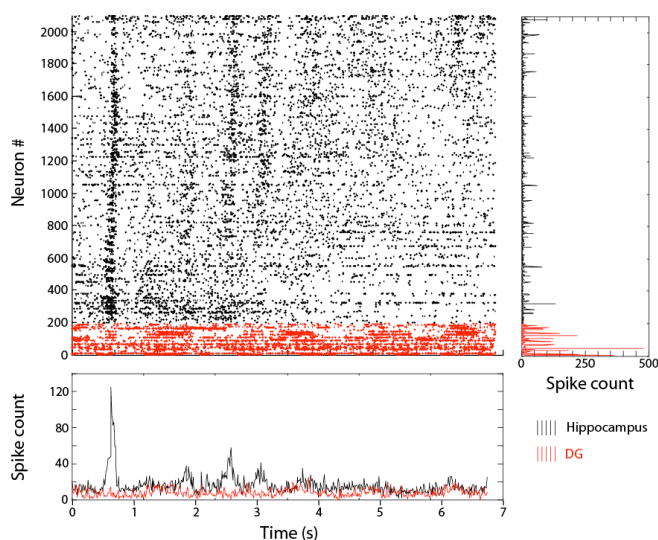
**Figura 1.** Respuestas evocadas en el área CA3 (recuadro rojo en la matriz de colores) a la estimulación de la capa molecular del GD (extrema derecha de la matriz de colores). La amplitud de la respuesta evocada es codificada en un gradiente de color. Los trazos, en voltaje, recogidos de la región de interés (recuadro en la matriz de colores) se muestran a la derecha. Los electrodos con respuestas de mayor amplitud corresponden a la capa piramidal, con la morfología característica de una espiga poblacional, mientras que las respuestas correspondientes al stratum lucidum presentan la morfología de un potencial post-sináptico excitador.



**Figura 2.** Actividad multiunitaria registrada con la matriz durante eventos de alta frecuencia. Los potenciales de acción extracelulares que pertenecen a células únicas son clasificados mediante el análisis de componentes principales.

Haciendo uso de esta técnica de mapeo eléctrico con una matriz de microelectrodos de alta densidad, **el presente proyecto busca determinar**

el patrón de conexiones monosinápticas que las células granulares del giro dentado establece con las células piramidales e interneuronas de la región CA3 en rebanadas de hipocampo de rata y ratón. Para ello determinaremos la correlación espacio-temporal de la actividad de miles de neuronas de ambas estructuras. Con esta información, podremos realizar un segundo tipo de experimentos, en los que determinaremos los cambios en la dinámica de comunicación entre las neuronas que conforman los microcircuitos 1) cuando las células granulares liberan glutamato y GABA y cuando solo liberan glutamato y 2) en diferentes pH o en presencia de bloqueadores de la transmisión eléctrica. Sobra decir que esta metodología permite realizar estudios farmacológicos de fármacos antiepilépticos y neurolépticos de gran alcance. Más aún, es importante mencionar que la regulación de las sinapsis eléctricas está íntimamente relacionada con la aparición y mantenimiento de la actividad epileptiforme. Actualmente colaboramos en un esfuerzo internacional en el estudio de los cambios de pH (mediante administración de diferentes cantidades de CO<sub>2</sub>) y su efecto en crisis epilépticas en pacientes.



**Figura 3.** Potenciales de acción digitalizados de más de 2000 neuronas del giro dentado (en rojo) y del área CA3 (en negro). Nótese un patrón temporal de disparo altamente sincronizado en cientos de neuronas. Se determinará la correlación entre la actividad de ambas estructuras y, con pruebas farmacológicas, determinaremos si se trata de actividad propagada mediada por sinapsis eléctricas.

Los programas de análisis se han escrito en diferentes plataformas, dependiendo de los análisis particulares: MatLab; Julia; C<sup>++</sup>. Los programas se han desarrollado de tal forma que puedan ser complementados por subrutinas programadas en cualquiera de los lenguajes de programación.

### Fármacos

Antagonista de los receptores NMDA, ácido (DL)-2-amino-5-fosfonovalérico (APV, 30  $\mu$ M, Tocris Cookson); antagonista de los receptores no-NMDA, 6-nitro-7-sulfamoyl-benzo(f)quinoxalina-2,3-diona (NBQX, 10  $\mu$ M, Tocris Cookson); antagonistas de receptores GABA<sub>A</sub>: bicuculina y gabazina (20  $\mu$ M, Sigma). Desacopladores de uniones comunicantes: carbenoxolona (1  $\mu$ M, Sigma), mefluoquina (1  $\mu$ M, Roche). Abridor de uniones comunicantes: Trimetilamina (TMA; 40  $\mu$ g/  $\mu$ l; Sigma). El agonista glutamatérgico ácido kaínico (1  $\mu$ M; Sigma) y el factor trófico BDNF (100 ng/ml; Sigma), que inducen la expresión del fenotipo GABAérgico de las c. granulares.

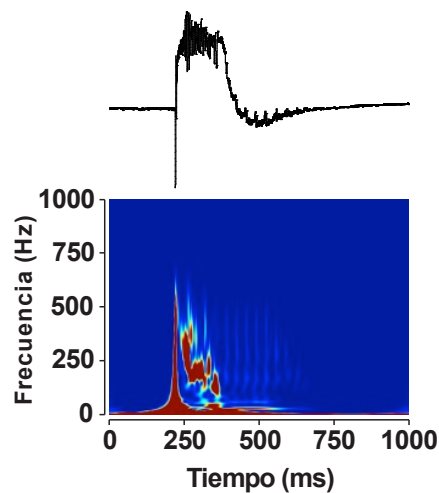
## **Análisis de datos y resultados preliminares**

En rebanadas de hipocampo se registrará actividad evocada y espontánea del GD y de CA3. Inicialmente se estimularán diferentes sitios del GD (ver figura 1) para que, a partir del análisis de las respuestas evocadas, encontremos su zona de proyección. Comprobaremos si la estimulación produce respuestas mediadas por conexiones eléctricas, como lo hemos descrito con registros intracelulares (Vivar y col., 2012). Esto implica análisis de latencias (cortas y sin variación) y confirmar su bloqueo farmacológico con desacopladores de uniones comunicantes. Se inducirá actividad de alta frecuencia sostenida por medio de una lesión in vivo en la corteza parietal (Ortiz y Gutiérrez, 2015) o se registrará actividad fisiológica de alta frecuencia que se presenta de forma espontánea, especialmente en el ratón (ripples y high ripples; Keller y col., 2015). Estas manipulaciones generan eventos de alta frecuencia, usualmente en CA3 que se propagan al GD (Figs. 4-5). Otra forma de generar actividad de alto voltaje y frecuencia es usando fármacos que produzcan actividad epileptiforme. Esto asegura que las neuronas “se prendan”, lo que permite identificar sus conexiones y el flujo de las oscilaciones de forma más simple, aunque en condiciones patológicas. Este tipo de análisis ha sido implementado y ya se preparan dos manuscritos para su publicación. Un ejemplo de registro de actividad epileptiforme que realizamos en una rebanada de hipocampo puede ser encontrado en la siguiente dirección de internet, bajo el rubro “rat cortico-hippocampal” e identificada con el logotipo del CINVESTAV del lado derecho:

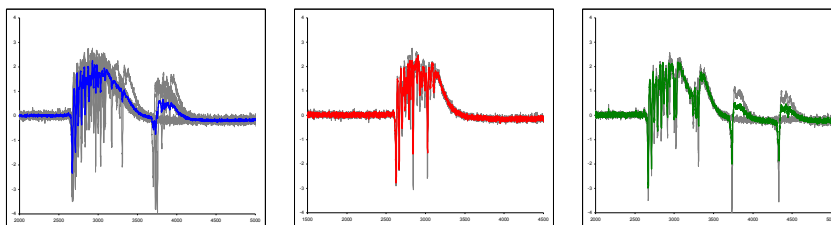
<http://www.3brain.com/index.php/29/VideoSamples - BrainTissues>

Se determinará la sincronía, dependencia de la transmisión sináptica glutamatérgica, GABAérgica y por contactos eléctricos de estos eventos entre ambas estructuras. Para ello realizaremos un análisis de latencias, correlaciones cruzadas y coherencia parcial dirigida a partir de  $n$  neuronas registradas simultáneamente en el hipocampo (Fig. 3 y 6). Estos análisis se harán con programas escritos en MatLab. Asimismo, determinaremos el patrón de propagación de los eventos mediante el análisis de transferencia de masa (Manjarrez y col., 2007; Zapfe, Ortiz y Gutiérrez, 2015). Para ello, el Dr. Karel Zapfe ha desarrollado una metodología novedosa para el análisis de la densidad de fuentes de corriente que requirió la introducción de conceptos matemáticos que no se habían usado antes en este tipo de análisis. En particular, se realizaron dos avances significativos a este respecto. El desarrollo de este análisis considera una muy alta densidad de electrodos que adquieren a muy alta velocidad (7 KHz), lo que permite un análisis espacio-temporal muy fino sin precedentes. Un segundo aspecto, es que la geometría del hipocampo es cóncava, lo que planteaba resolver cómo determinar la distribución de las corrientes en toda la estructura y su flujo. La solución matemática fue aplicar el concepto de “componentes disjuntos” y esto permite determinar con gran precisión las fuentes de corriente a lo largo de toda la estructura y, sobre todo, el flujo de éstas con muy alta resolución espacio-temporal. Este desarrollo está siendo preparado para comunicarse en una publicación y será presentado en un congreso internacional este año (Figura 7).

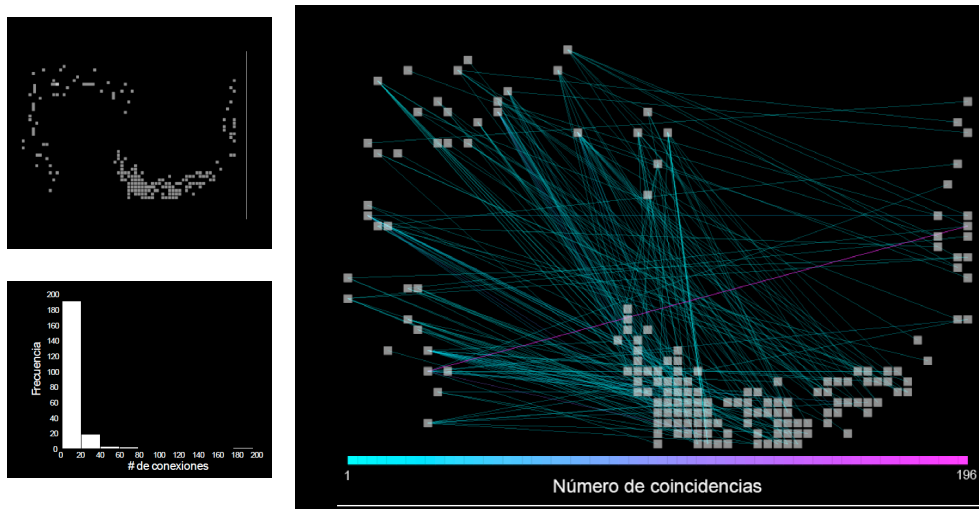
Para el análisis de conectividad por uniones comunicantes, realizaremos el análisis de propagación y correlación de actividad multiunitaria y manipulaciones farmacológicas y de pH para abrir o cerrar uniones comunicantes (“gap junctions”). Datos preliminares nos han mostrado que existe una red GD-CA3 que es activa en presencia de bloqueadores de la transmisión sináptica química. Necesitamos continuar estos estudios para encontrar cómo los cambios de pH modifican la integración de estos ensambles y si hay un mayor reclutamiento de neuronas a tales ensambles, como podría predecirse de un arreglo de comunicación por sinapsis eléctricas.



**Figura 4.** Análisis de los eventos de alta frecuencia con la función wavelet (de Ortiz y Gutiérrez, 2015). Esta actividad de alta frecuencia (fast ripples) usualmente se genera en CA3 y, eventualmente, se propaga al GD. Nuestra hipótesis es que esta propagación puede ser mediada por comunicaciones eléctricas ya que no existen proyecciones de CA3 al GD. En ciertas condiciones (en animales epilépticos, por ejemplo) esta actividad de alta frecuencia puede generarse también en el GD (de Ortiz y Gutiérrez, 2015).



**Figura 5.** Los eventos de alta frecuencia pueden diferenciarse por medio de “templates”. Un objetivo de nuestro proyecto es determinar los ensambles neuronales que conforman cada tipo de “template” y determinar su trayectoria en el circuito hipocampal.



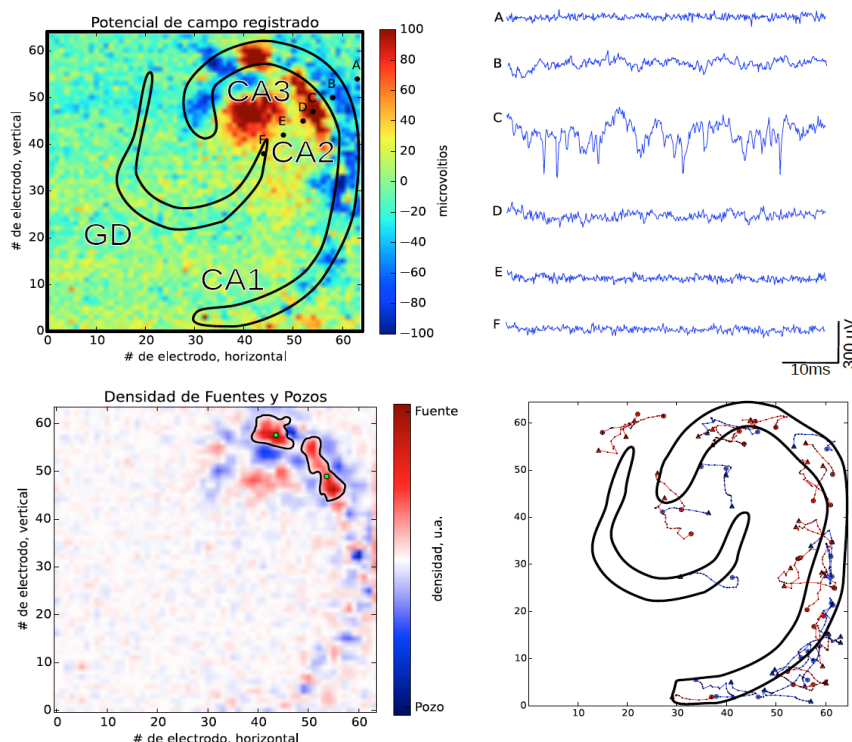
**Figura 6. Conexiones funcionales entre el giro dentado y CA3, determinados por actividad unitaria, filtrada de la actividad de campo.**

La actividad unitaria registrada por todos los electrodos del GD se correlacionará con la registrada por los del área CA3 para determinar las conexiones funcionales. Las líneas que conectan electrodos del GD con electrodos de CA3 representan las conexiones cuyo contraste estadístico califica como significativas, usando el método de Montecarlo. Para ello, se toman en cuenta los intervalos inter-espiga de cada par de electrodos GD – CA3 para hacer 1000 permutaciones y en cada una determinar el número total de espigas coincidentes en una ventana de 2 a 5 milisegundos a partir de un disparo detectado en el GD. Con los números totales de espigas coincidentes de todas las permutaciones por cada par de electrodos se construyó una matriz de probabilidad a partir de la cual se descartó que el número de coincidencias observadas originalmente fuera azaroso ( $p = 0.05$ ). El gradiente de color de las líneas indica el número de conexiones observadas en cada par de electrodos, mientras que los cuadros blancos representan electrodos tanto del GD como de CA3 en la disposición en la que se encuentran en la matriz de registro. El histograma indica el número de coincidencias y la frecuencia en la que fue observado entre todos los pares de electrodos. En total, hubo 248 electrodos que registraron actividad eléctrica, ya fuera del GD o de CA3 y hubo 218 pares de electrodos GD – CA3 conectados funcionalmente. El recuadro de la esquina superior izquierda muestra la disposición del GD y de CA3.

En resumen, de los registros electrofisiológicos se obtiene actividad de campo y, con filtros de altas frecuencias se puede determinar la actividad unicelular o multicelular detectada por cada electrodo. Se analizará la generación y recorrido de la actividad de campo de alta frecuencia, así como la cantidad de células implicadas en su generación para una región determinada. Por otro lado, con el análisis celular podremos identificar las conexiones funcionales que se establecen entre neuronas identificadas (Fig. 6).

Finalmente, uno de los análisis de actividad de campo que realizamos permite obtener las fuentes y sumideros de corrientes evocadas y espontáneas, así como el trazado de su recorrido. Esta metodología, desarrollada en nuestro laboratorio, está siendo preparada en un manuscrito para su publicación. Ahora, nuestro objetivo es determinar el flujo de información en la sinapsis GD-CA3, así como, en colaboración con el grupo del Prof. Draguhn, la salida de CA1 hacia la corteza entorrinal.





**Figura 7.** Arriba, izquierda, representación del potencial eléctrico local (PEL) a través del arreglo de 4096 microelectrodos, 15 minutos después de la aplicación de 4-AP. Los contornos en líneas negras muestran la posición aproximada de las subestructuras del hipocampo. Los puntos negros, con letras, son electrodos selectos a lo largo de una línea que atraviesa CA en la dirección somato-endrítica. Arriba, a la derecha, se muestran los trazos del potencial correspondiente a cada punto mencionado. Abajo, izquierda, mapa de la densidad de fuentes y pozos de corriente (CSDA) correspondiente a la imagen superior. Se marcan dos componentes disjuntos del conjunto de todas las fuentes con contorno negro y su centro de masa en punto verde. La escala de color es cualitativa. Abajo, derecha, se muestran las trayectorias de algunos centros de masa para pozos y fuentes, en un intervalo de 720 ms. Los círculos indican comienzo, los triángulos final, azul pozo y rojo fuentes. Por claridad se escogieron trayectorias largas y de masa promedio sobre un umbral estricto (de Zapfe, Ortiz y Gutiérrez, en preparación).

Finalmente, queremos resaltar que además de determinar los patrones de conexión de esta estructura, nuestros estudios están ligados estrechamente a la determinación de actividad aberrante, así como de fármacos con posible acción “regularizadora” de esta actividad. Sus implicaciones en la fisiopatología de la epilepsia y otras enfermedades neurodegenerativas son relevantes, de largo alcance y de aplicación inmediata. En este punto resalto las colaboraciones que hemos comenzado con laboratorios que desarrollan productos neuroactivos como antiepilépticos y neurolépticos. De manera importante, el estudio de los cambios de pH en la conformación del circuito y de su plasticidad es de importancia inmediata ya que estos cambios modifican las uniones comunicantes (que subyacen a las sinapsis eléctricas) y estamos empezando un estudio en el que el Prof. Kai Kaila y yo coordinamos varios grupos clínicos en Finlandia, Hungría, Australia y en la Ciudad de México y Guadalajara sobre la regulación del pH por inspiración de CO<sub>2</sub> y la supresión de crisis epilépticas en una población de pacientes adultos (ver

Kaila, Nat. Rev. Neurology 6: 644, 2010; Tolner et al., 2010; Helmi et al., 2011); nuestros resultados in vitro permiten poner a prueba en condiciones controladas de laboratorio los efectos de diferencias de oxigenación en la actividad epileptiforme. Esto es, estamos “yendo y viniendo” del laboratorio a la práctica clínica (“translational medicine”).

## REFERENCIAS

J.Q. Beltrán, R. Gutiérrez, R. Co-release of glutamate and GABA from single, identified mossy fibre giant boutons. *J. Physiol.* 590.19 (2012) 4789–4800.

Carrillo-Reid, L., Tecuapetla, F., Tapia, D., Hernández-Cruz, A., Galarraga, E., Drucker-Colin, R., Bargas, J. Encoding network states by striatal cell assemblies. *J. Neurophysiol.* 99:1435-1450, 2008.

Claiborne B., Amaral D.G., and Cowan M.W. (1986) A light and electron microscopic analysis of the mossy fibers of the rat dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* 246, 435–458.

Franco, L.M., Beltrán, J.Q., Tapia, J.A., Ortiz, F., Manjarrez, E., Gutiérrez, R. Differential frequency-dependent antidromic resonance of the Schaffer collaterals and mossy fibers. *Brain Struct. Funct.* DOI 10.1007/s00429-015-1003-1, 2015.

Galimberti I, Bednarek E, Donato F, Caroni P. EphA4 signaling in juveniles establishes topographic specificity of structural plasticity in the hippocampus. *Neuron* 65: 627-642, 2010.

Galván EJ, Pérez-Rosello T, Gómez-Lira G, Lara E, Gutiérrez R, Barrionuevo G. Synapse-specific compartmentalization of signaling cascades for LTP induction in CA3 interneurons. *Neuroscience* 290: 332-345, 2015.

Gómez-Lira, G., Lamas, M., Romo-Parra, H., Gutiérrez, R. Programmed and induced phenotype of the hippocampal granule cells. *J. Neurosci.* 25: 6939-6946, 2005.

González-Nieto D, Gómez-Hernández JM, Larrosa B, Gutiérrez C, Muñoz MD, Fasciani I, O'Brien J, Zappalà A, Cicirata F, Barrio LC. Regulation of neuronal connexin-36 channels by pH. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105: 17169-17174, 2008.

Gutiérrez, R. Co-Existence and Co-Release of Classical Neurotransmitters: Ex uno plures. Springer Verlag, 2009.

Gutiérrez, R. Seizures induce simultaneous GABAergic and glutamatergic neurotransmission in the dentate gyrus-CA3 system. *J Neurophysiol* 84: 3088-3090, 2000.

Hamzei-Sichani, F., Davidson, K. G. V., Yasumura, T, Janssen, W. G. M., Wearne, S. L., Hof, P. R., Traub, R. D., Gutiérrez, R., Ottersen, O. P., and Rash, J. E. (2012). Mixed electrical–chemical synapses in adult rat hippocampus are primarily glutamatergic and coupled by connexin-36. *Front. Neuroanat.* 6:13. doi:10.3389/fnana.2012.00013

Keller MK, Draguhn A, Both M and Reichinnek S (2015) Activity-dependent plasticity of mouse hippocampal assemblies *in vitro*. *Front. Neural Circuits* 9:21. doi: 10.3389/fncir.2015.00021

Manjarrez E, Vázquez M, Flores A. Computing the center of mass for traveling alpha waves in the human brain. *Brain Res.* 1145: 239-247, 2007.

A. Münster-Wandowski, G. Gómez-Lira, R. Gutiérrez Mixed neurotransmission in the hippocampal mossy fibers. 7 (2013) doi: 10.3389/fncel.2013.00210

Ortiz F, Gutiérrez R. Entorhinal cortex lesions result in adenosine-sensitive high frequency oscillations in the hippocampus. *Exp. Neurol.* 271:319-328, 2015.

Osorio, B., León, U., Galván, E.J., Gutiérrez, R. Co-Cultures of GFP<sup>+</sup>-granule cells with GFP<sup>-</sup>-pyramidal cells and interneurons for the study of mossy fiber neurotransmission with paired recordings. *Hippocampus* 23: 247-252, 2013.

Sun, J.-J. Kilb, W., Luhmann, H.J. Self-organization of repetitive spike patterns in developing neuronal networks in vitro. *Eur. J. Neurosci.* 32: 1289–1299, 2010.

Treviño, M., Vivar, C., Gutiérrez, R.  $\beta/\gamma$  Oscillatory activity in the CA3 hippocampal area is depressed by aberrant GABAergic transmission from the dentate gyrus after seizures. *J. Neurosci.* 27: 251-259, 2007.

Treviño, M., Vivar, C., Gutiérrez, R. Excitation-inhibition balance in the CA3 network - neuronal specificity and activity-dependent plasticity. *Eur. J. Neurosci.* 33: 1771-1785, 2011.

Vivar, C., Traub, R. D., and Gutiérrez, R. (2012). Mixed electrical–chemical transmission between hippocampal mossy fibers and pyramidal cells. *Eur. J. Neurosci.* 35, 76–82.

Zapfe, W.K., Ortiz, F., Gutiérrez, R. Computation of center of mass from voltage and current source density of epileptiform activity in the hippocampus. Annual Meeting of the American Epilepsy Society, Philadelphia USA. 2015.