

Tesis Doctoral

Plasticidad de redes astrogliales en la corteza cerebral de la rata: respuesta al enriquecimiento ambiental y variables físico-químicas

Santacroce, Ignacio

2017-08-23

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Santacroce, Ignacio. (2017-08-23). Plasticidad de redes astrogliales en la corteza cerebral de la rata: respuesta al enriquecimiento ambiental y variables físico-químicas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Santacroce, Ignacio. "Plasticidad de redes astrogliales en la corteza cerebral de la rata: respuesta al enriquecimiento ambiental y variables físico-químicas". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2017-08-23.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Plasticidad de redes astrogliales en la corteza cerebral de la rata: respuesta al enriquecimiento ambiental y variables físico-químicas

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires
en el área: **CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Ignacio Santacroce

Directores de Tesis: Dr. Jorge Augusto Colombo
Dra. Lorena Rela

Consejero de estudios: Dr. Arturo Gabriel Romano

Lugar de trabajo: Unidad de Neurobiología Aplicada, Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas "Dr. Norberto Quirno" (UNA, CEMIC-CONICET)

Buenos Aires, 2017

Fecha de defensa: 23/08/2017

Plasticidad de redes astrogiales en la corteza cerebral de la rata: respuesta al enriquecimiento ambiental y variables físico-químicas

RESUMEN

El enriquecimiento ambiental favorece tanto el desempeño conductual en pruebas de aprendizaje motor como la recuperación de comportamientos motores afectados en modelos de injuria de la corteza motora. La mejoría ha sido generalmente asociada a plasticidad neuronal. Observaciones recientes han puesto de manifiesto el rol protagónico que llevan a cabo las redes astrogiales en la fisiología de la corteza cerebral y otras regiones cerebrales. En esta Tesis se analizan los efectos del enriquecimiento ambiental sobre la configuración de las redes astrogiales en la corteza motora, a los fines de ampliar el conocimiento de los mecanismos que subyacen a la neuroplasticidad, con potenciales implicancias en el diseño de abordajes terapéuticos. En ella se evalúa el impacto del enriquecimiento ambiental sobre los patrones de expresión de marcadores inmunohistoquímicos neuronales y astrogiales asociados a procesos de plasticidad en la corteza motora de la rata, así como sobre la configuración de las redes de acoplamiento astrogial, mediante experimentos de *dye-coupling* realizados en rebanadas frescas de cerebro. Los resultados obtenidos muestran que en condiciones control las redes de acoplamiento astrogial en la lámina I exhiben una mayor densidad celular que en la lámina II-III. Se describe, asimismo, la implementación de un modelo de enriquecimiento ambiental cuyo efecto es compatible con la inducción de una expansión selectiva del gliopilo cortical en las láminas II-III, acompañada de una reducción generalizada de la densidad de marca de conexina 30 en ambas láminas. Los hallazgos muestran que la plasticidad inducida en la corteza motora por exposición a enriquecimiento ambiental involucra cambios a nivel de las redes de acoplamiento astrogial, constituyendo un posible mecanismo mediante el cual el componente astrogial podría participar en la recuperación observada en patologías inducidas por injurias mecánicas, cerebrovasculares u otras.

Palabras clave: Plasticidad; Enriquecimiento ambiental; Corteza motora; Glía; Astrocitos; Redes astrogiales; Uniones *gap*; Conexina 43; Conexina 30.

Plasticity of astroglial networks in the cerebral cortex of the rat: response to environmental enrichment and physicochemical variables

ABSTRACT

Exposure to an enriched environment improves recovery of behavioral performance in motor learning and in motor function in animal models of motor cortex injury. This improvement has been generally associated with neuronal plasticity. Recent observations have revealed a crucial role of astrocyte networks in the physiology of central nervous system circuits. This Thesis presents a study of the effects of environmental enrichment on the structure and function of astroglial networks of the motor cortex, aiming at improving knowledge regarding possible mechanisms with potential therapeutic application. The effects of environmental enrichment on the patterns of neuronal and glial markers expression, associated with cortical plasticity, were analyzed using immunohistochemical labeling in fixed tissue and dye coupling procedures in acute, fresh, brain slices. The latter was applied in order to evaluate the effects of environmental enrichment on the connectivity and structure of astroglial networks. The results show that in control conditions astroglial networks have a higher cell density in layer I than in layers II-III. In addition, we present a model of environmental enrichment with effects compatible with a selective expansion of the cortical gliopil in layers II-III, associated with a generalized reduction in the expression of connexin 30 in both layers. These findings show that the neuroplasticity induced in the motor cortex by environmental enrichment involves changes at the level of astroglial networks, suggestive of the involvement of these networks in the recovery process following damage.

Key words: Plasticity; Environmental enrichment; Motor cortex; Glia; Astrocytes; Astroglial networks; Gap junctions; Connexin43; Connexin30.

Agradecimientos

Al Doctor Jorge Colombo, por abrirme las puertas de su laboratorio y por su generosidad, por confiar en mí, por todo lo aprendido.

A Lorena Rela por asumir el riesgo de incorporarse a un proyecto en marcha, y por su colaboración en la edición de esta Tesis.

A mis compañeros de la Unidad de Neurobiología Aplicada del CEMIC por su trabajo y su apoyo, por los momentos compartidos...fue un placer y un privilegio haber transitado estos años junto a ustedes: Cristina Juarez, Claudia Martínez, Sebastian Lipina, Soledad Segretín, Julia Hermida, Carolina Fracchia, Lucía Prats, Eliana Ruetti, a los antiguos miembros de la UNA, a María Romero, Ximena y Hernán.

Un agradecimiento especial a Beatriz Stuto Colombo, por su colaboración durante todos estos años.

A Sabina, por su apoyo incondicional.

a mis viejos...

INDICE

<u>INTRODUCCION</u>	8
1. Plasticidad cerebral y enriquecimiento ambiental	8
2. Funciones de los astrocitos protoplasmáticos	12
3. Redes astrogliales	18
4. Astrocitos y circuitos corticales	20
5. Hipótesis y objetivos específicos	24
<u>METODOLOGIA GENERAL</u>	26
1. Animales	26
2. Enriquecimiento ambiental	26
3. Electrofisiología y acoplamiento celular	27
a. Preparación de rebanadas de cerebro	27
b. Registros electrofisiológicos y <i>dye coupling</i>	28
c. Procesamiento y análisis de los registros electrofisiológicos	31
4. Inmunohistoquímica	32
5. Imágenes	34
a. Adquisición	34
b. Procesamiento	35
c. Análisis	36
6. Estadística	38
<u>RESULTADOS</u>	39
<u>CAPITULO I</u> : Caracterización de los astrocitos en láminas I y II-III de la corteza motora de la rata	39
1. Identificación electrofisiológica de los astrocitos de la corteza motora	39
2. Redes de acoplamiento astrogliales en las láminas I y II-III	42
3. Expresión de conexinas astrogliales en la corteza motora	47
<u>CAPITULO II</u> : Plasticidad de astrocitos de láminas I y II-III de la corteza motora en un modelo de enriquecimiento ambiental	50

1. Impacto del enriquecimiento ambiental sobre la configuración de las redes de acoplamiento astrogial	50
2. Modulación aguda de las redes de acoplamiento astrogial por exposición a variables fisicoquímicas	59
<u>DISCUSION</u>	63
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	72

INTRODUCCION

1. Plasticidad cerebral y enriquecimiento ambiental

La plasticidad es una propiedad del sistema nervioso, que consiste en su capacidad de remodelación durante todo el ciclo vital. Puede darse a múltiples niveles, desde la modificación de la excitabilidad neuronal en respuesta a la actividad previa [1], hasta la reorganización de las funciones de la corteza cerebral durante la recuperación posterior a un daño [2]. El estudio de la neuroplasticidad constituye un tema central en la neurobiología, ya que constituye, por ejemplo, la base del aprendizaje y formación de nuevas memorias [3], y de la recuperación luego de traumas severos [2].

Uno de los paradigmas experimentales usados para comprender los mecanismos de neuroplasticidad es la exposición a ambientes enriquecidos o empobrecidos, que manipulan la diversidad e intensidad de los estímulos disponibles y las oportunidades de aprendizaje [4], [5]. En el campo experimental, un ambiente complejo o enriquecido lo es en relación a las condiciones de cuidado estándar en laboratorio, en tres aspectos básicos: sensorial, motriz y social, por lo que implica condiciones de estimulación tanto inanimada (o física) como social [5]. La aplicación de este paradigma ha permitido verificar, por una parte, que la exposición a condiciones de enriquecimiento ambiental se asocia a un conjunto significativo de cambios de diferentes parámetros estructurales y funcionales en el sistema nervioso central (SNC), tales como elaboración del árbol dendrítico y formación de nuevas sinapsis en neuronas corticales. Estos cambios tienen impacto potencial en el aprendizaje y resolución de problemas [6], [7], y en la reducción de deficiencias asociadas con ciertas enfermedades neurodegenerativas, como las enfermedades de Huntington, Parkinson y Alzheimer [5].

La literatura publicada hasta el presente ha enfatizado el análisis de la plasticidad estructural macroscópica cortical, así como de distintos componentes neuronales [6], [8]. Por ejemplo, se han informado incrementos en el peso [9] y grosor [10] en las áreas visual y somatosensorial de la corteza cerebral de ratas expuestas a enriquecimiento ambiental, así como incrementos en la densidad de espinas dendríticas [11] y en la cantidad de sinapsis por neurona [12], en la

corteza visual. También se han detectado incrementos en los niveles de expresión de marcadores neuronales sinápticos, como la proteína presináptica sinaptofisina (Syp) y la postsináptica PSD-95, en la región anterior del cerebro de ratones expuestos a enriquecimiento ambiental [13]. Por otro lado, se han detectado cambios en otras regiones cerebrales como el hipocampo, en donde la exposición a enriquecimiento ambiental provocó un aumento en la tasa de neurogénesis en el giro dentado [14]. Desde una perspectiva funcional, se han observado modificaciones en los patrones de actividad electrofisiológica neuronal en diversas áreas de la corteza sensorial de la rata, incluyendo la somatosensorial cutánea [15], o la asociada a la representación de las vibrisas [16], [17]. En este sentido, se ha observado un agrandamiento de la representación cutánea de la pata delantera en la corteza somatosensorial (lámina IV), así como un refinamiento de los campos receptivos de neuronas en las áreas correspondientes a la palma de la mano y extremos dactilares, en ratas expuestas a un paradigma de enriquecimiento ambiental que favorecía la manipulación de objetos [15]. Por otro lado, en los barriles de la corteza somatosensorial, otros autores observaron un refinamiento de los campos receptivos de las vibrisas en neuronas de láminas II-III, aunque no de lámina IV [16]. Estas observaciones se encuentran en sintonía con otro reporte indicando una potenciación generalizada multilaminar de la respuesta neuronal a la estimulación de las vibrisas en esa área cortical, mayor en láminas II-III [17].

Se han comunicado efectos del enriquecimiento ambiental sobre la microanatomía de la corteza cerebral de la rata en las regiones frontal y parietal [7], [18], [4], [6] que se encuentran asociadas principalmente a funciones de control motor y de procesamiento sensorial. Entre los efectos principales se destacan los ya mencionados aumentos en la densidad sináptica y en la complejidad de las ramificaciones dendríticas [7], [18]. Resulta destacable que, en la corteza parietal, el enriquecimiento ambiental produjo un incremento en la ramificación de dendritas y densidad de espinas en neuronas de la lámina III, pero no en las de la lámina V, indicando selectividad laminar de los efectos del enriquecimiento [18]. La selectividad observada a nivel de los cambios estructurales, se encuentra en sintonía con los efectos dependientes de lámina observados a nivel funcional en la corteza somatosensorial [16]. En conjunto,

estos cambios se correlacionan con las mejorías inducidas por el enriquecimiento ambiental sobre el desempeño motor en modelos de la enfermedad de Huntington, Parkinson y Alzheimer en roedores [4], [5]. También se ha observado que el enriquecimiento ambiental retrasa la aparición de síntomas motores comúnmente presentes en dichos modelos [5] y mejora la recuperación del desempeño motor en modelos de injuria por contusión [19] o isquemia [20], [21] en áreas motoras de la corteza cerebral.

Si bien la función del SNC no puede concebirse si no es considerando la totalidad de sus componentes celulares, la mayor parte de los análisis han sido enfocados al estudio de los efectos del enriquecimiento ambiental sobre los componentes neuronales del neuropilo en diversas regiones cerebrales, principalmente la neocorteza y el hipocampo [6]. La documentación de modificaciones estructurales y funcionales en las conexiones sinápticas, asociadas a procesos de aprendizaje o estimulación sensorial, ha permitido que la plasticidad neuronal adquiriera un rol central en la interpretación de la capacidad de adaptación manifestada por el sistema nervioso [3]. Sin embargo, el conocimiento generado en las últimas décadas ha permitido determinar que los astrocitos - células gliales-, se encuentran en estrecho vínculo estructural y funcional con las neuronas, específicamente en los sitios de comunicación sináptica [22], teniendo una participación activa en fenómenos de plasticidad cerebral [23]. En términos generales, la plasticidad astrogliar se entiende como una combinación de modificaciones, potencialmente reversibles, que pueden sufrir los astrocitos a nivel estructural o funcional, como parte de los cambios adaptativos que puede experimentar el SNC, por ejemplo, en un contexto de aprendizaje, o de recuperación luego de una injuria [24]. Dada su íntima vinculación con las sinapsis, los cambios plásticos sufridos por la astrogliar podrán estar involucrados en fenómenos de plasticidad sináptica [24], por ejemplo regulando la concentración extracelular de neurotransmisores y moduladores [24], [25]. Puede también mencionarse que una disminución de la actividad intracelular de calcio en los astrocitos produce potenciación sináptica en las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo, sugiriendo de este modo una relación entre la actividad astrogliar y la ocurrencia de cambios plásticos a nivel neuronal [26].

Hasta el presente, la mayoría de los estudios de la plasticidad astrogliol por exposición a enriquecimiento ambiental se han abocado al estudio de cambios en la estructura del citoesqueleto, principalmente mediante el análisis de inmunomarcaciones de la proteína glial fibrilar ácida (GFAP, [27], [28], [29]–[33]). En este sentido, se han informado fenómenos de hipertrofia astrogliol, asociados a un aumento de la densidad de marca de los procesos celulares inmunoreactivos [30], [31], así como del tamaño del núcleo celular [29], en la corteza visual de la rata. A su vez se ha observado una mayor complejidad de las ramificaciones astrocíticas en el hipocampo de la rata y el ratón [32], [33]. Resulta interesante que, en la corteza cerebral, la respuesta de los astrocitos al enriquecimiento ambiental expresó un efecto dependiente de lámina, ya que un estudio ha indicado un aumento en la densidad superficial de GFAP, específicamente en las láminas II-III de la corteza visual de la rata [31]. Asimismo, mediante un análisis ultraestructural, se demostró un incremento en la superficie de contacto de los procesos astrogliol con estructuras sinápticas en las láminas superiores de la corteza visual de ratas expuestas a enriquecimiento ambiental [34], sugiriendo que al menos parte de los cambios estructurales manifestados por la astrogliol podrían tener un impacto sobre la función sináptica [34].

A su vez, los astrocitos se encuentran en íntimo contacto con la pared vascular mediante especializaciones estructurales de los procesos con proyección vascular, denominadas “pies terminales”, en las que se ha detectado la expresión de proteínas mediadoras del transporte de sustancias de relevancia metabólica como la glucosa (GLUT 1 [35]), o implicadas en el balance hídrico cerebral (acuaporina-4 [36]), así como receptores purinérgicos vinculados a la propagación de señales de calcio intracelular [36]. Dado que se ha comunicado un incremento en la densidad de capilares sanguíneos en la corteza cerebral de ratas expuestas a enriquecimiento ambiental [37]–[39], así como luego de una estimulación sensorial [40], la interfase glío-vascular constituye un componente potencialmente significativo en la adaptación cerebral a demandas ambientales. En este sentido, un análisis del impacto del enriquecimiento ambiental sobre los patrones de expresión de marcadores de la interfase gliovascular, por ejemplo acuaporina-4, permitirá estudiar su participación en fenómenos de plasticidad cerebral.

En la figura i1 se presenta un resumen de los efectos del enriquecimiento ambiental sobre la estructura macroscópica cortical, así como sobre componentes estructurales neuronales, astrogliales y vasculares en el cerebro de la rata y el ratón, que resultan de interés en el contexto de esta Tesis.

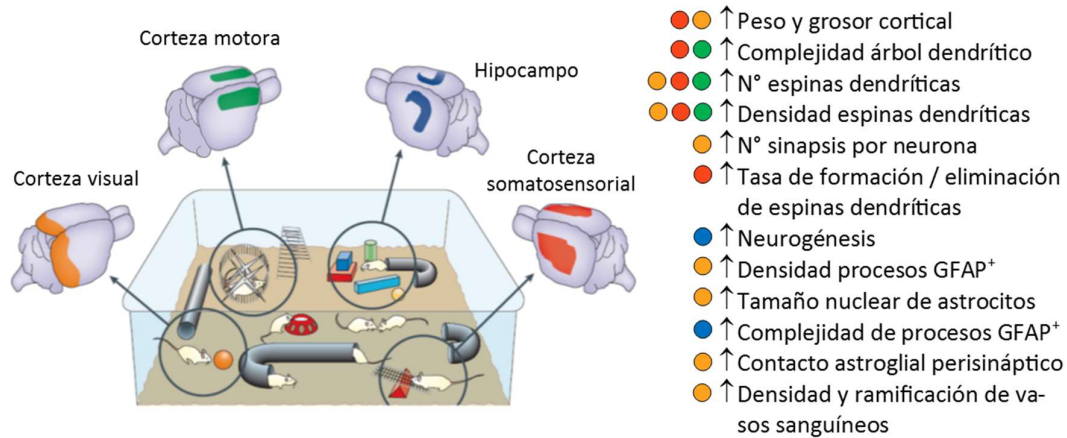


Figura i1. Resumen de efectos del enriquecimiento ambiental sobre componentes estructurales macroscópicos, neuronales, astrogliales, y vasculares, en tres áreas de la corteza cerebral e hipocampo de roedores. Los círculos coloreados guardan referencia con los colores de las áreas cerebrales. Imagen adaptada de Hannan *et al.*, 2006 [5].

2. Funciones de los astrocitos protoplasmáticos

La visión clásica de las células gliales como soporte secundario de la función neuronal fue reemplazada en los últimos años por una que las concibe como participantes centrales en la integración de señales en el sistema nervioso, con participación tan importante como la neuronal [23]. En contraste con el rol de soporte estructural y metabólico que tradicionalmente se les atribuyó, experimentos recientes han mostrado su participación, por ejemplo, en fenómenos de formación y eliminación de sinapsis. En este sentido, se ha reportado que la proteína de secreción astrogliol hevína, participa en la generación de las sinapsis retino-coliculares [41], así como para la estabilización de las conexiones sinápticas tálamo-corticales en la corteza visual del ratón [42], [43]. Los astrocitos expresan otra proteína de la misma familia (SPARC), que produce un efecto antagónico al de hevína *in vitro* e *in vivo* [41]. Estos resultados sugieren que mediante la modulación de los niveles de expresión de hevína y SPARC, los astrocitos podrían regular la formación, maduración y plasticidad de

las sinapsis excitatorias en el SNC [41]. Por otro lado, mediante la expresión de las variantes tipo 1 y tipo 2 del transportador de aminoácidos excitatorios (GLAST, y Glt-1, en roedores), los astrocitos son los principales responsables del mantenimiento de los bajos niveles extracelulares de glutamato en el neuropilo [44], [45], y también modulan la dinámica de la respuesta post-sináptica, al ser responsables de su captación del espacio perisináptico [46]. Resulta interesante que luego de una estimulación mecánica sobre vibrisas individuales en el ratón, los niveles de expresión de Glt-1 y GLAST aumentaron en el barril cortical correspondiente a la vibrisa estimulada, lo cual fue acompañado de un aumento de la cobertura perisináptica astrogliar [47], indicando la participación de los transportadores de glutamato astrogliar en fenómenos de plasticidad. Por otra parte, mediante la expresión de receptores de glutamato metabotrópicos, los astrocitos responden a la actividad sináptica glutamatérgica por medio de aumentos intracelulares de calcio, que provocan la liberación de sustancias neuroactivas (gliotransmisores) hacia el espacio extracelular, y de esta manera modulan la actividad sináptica [48] (Figura i2).

Como alternativa a la visión tradicional de la sinapsis con componentes neuronales pre- y post- sinápticos, se introdujo el concepto de sinapsis tripartita, que contempla la participación de los procesos perisinápticos astrogliar como esenciales para la función sináptica [48], [49] (Figura i2). En este contexto, la detección de cambios en la densidad y distribución de moléculas astrogliar involucradas en la dinámica de la neurotransmisión, tales como Glt-1, en paralelo con el análisis de marcadores sinápticos neuronales, constituye una dimensión útil para comprender el impacto del enriquecimiento ambiental sobre componentes sinápticos neuronales y astrogliar del neuropilo cortical.

Los astrocitos han sido clasificados siguiendo criterios morfológicos en dos tipos principales: mientras que los astrocitos protoplasmáticos son el tipo predominante en la sustancia gris del SNC, los astrocitos fibrosos predominan en los tractos de sustancia blanca [50]. Los astrocitos protoplasmáticos presentan un cuerpo celular ovoide con múltiples prolongaciones radiales ramificadas, las cuales proyectan estructuras de tipo lamelar o filopodeo, que constituyen la mayor parte de la extensión superficial del astrocito, y presentan un grado variable

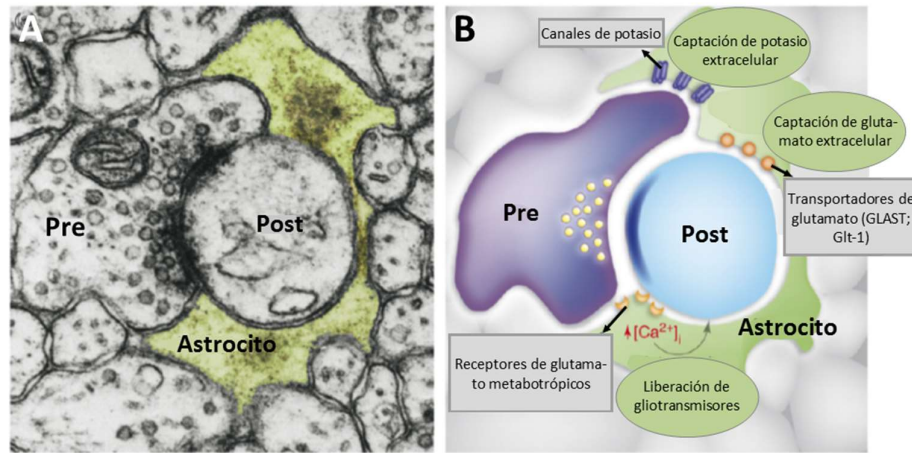


Figura i2. Sinapsis tripartita. **(A)** Imagen de microscopía electrónica en donde se resaltan los componentes pre- y post- sinápticos neuronales, así como los procesos astrogliales perisinápticos. **(B)** Esquema de los elementos visualizados en el panel A. Los recuadros con fondo gris hacen referencia a las estructuras, mientras que los óvalos con fondo verde indican su función principal. Paneles A y B adaptados de Halassa *et al.*, 2007 [49].

de asociación a las sinapsis. Por otro lado, los procesos celulares de los astrocitos fibrosos son más largos y presentan un menor nivel de ramificación, mientras que suelen correr en sentido paralelo al de los axones en los tractos mielinizados [50].

Si bien los astrocitos protoplasmáticos constituyen el tipo astroglial predominante en el neuropilo de la corteza cerebral de los mamíferos, en la corteza de los primates se han descrito tipos de células astrogliales adicionales con características particulares, entre los que se destaca, por ejemplo, el astrocito interlaminar [51], [52]. Estas células se encuentran exclusivamente en la corteza cerebral de primates, incluyendo al humano, y presentan un cuerpo celular próximo a la superficie cortical, desde el cual se originan prolongaciones celulares que atraviesan varias láminas corticales hasta terminar en las proximidades de la lámina IV, que en conjunto conforman una especie de “empalizada” [52]. Estudios en nuestro laboratorio han demostrado alteraciones en los atributos morfológicos de estos procesos tanto en un contexto de injuria como de neuropatología; por ejemplo, se ha demostrado un mayor grado de penetración de la empalizada, así como una mayor tortuosidad de los procesos interlaminares en la corteza somatosensorial de primates con lesiones en la medula espinal [53]. A su vez, la corteza cerebral de individuos con Síndrome de Down mostró abundantes zonas

desprovistas de procesos astrogiales interlaminares, mientras que también se observó una menor penetración de la empalizada en el área prefrontal dorsolateral [54]. Según el estadio de la Enfermedad de Alzheimer, estos procesos se encuentran desorganizados o ausentes [55].

En la neocorteza [56] y el hipocampo [57], los astrocitos protoplasmáticos presentan una distribución espacial caracterizada por un nivel muy bajo de superposición volumétrica, que se encuentra restringida a la porción periférica de sus procesos celulares. Este fenómeno resulta de relevancia para la interpretación de la relación funcional con las neuronas, ya que la actividad sináptica en un determinado volumen del neuropilo quedará bajo la influencia del dominio espacial de un solo astrocito. Esto llevó a introducir la noción de “islas sinápticas”, asociadas al “territorio” de astrocitos individuales [56]. Esta disposición espacial fue descrita inicialmente en roedores [56], [57], aunque estudios posteriores han demostrado un patrón similar en la corteza cerebral de otros mamíferos [58], incluso en humanos [59].

Una aproximación experimental utilizada con cierta frecuencia para abordar la descripción de la fisiología astrogial es el uso de registros electrofisiológicos de astrocitos en rebanadas frescas de cerebro de rata y ratón [60]. Los trabajos pioneros caracterizaron inicialmente las propiedades eléctricas de membrana de células gliales mediante la obtención de registros electrofisiológicos que permitieron medir los perfiles de la corriente macroscópica de la membrana, evocada por pulsos de voltaje (registros en modo de fijación de voltaje y configuración *whole-cell*) [60], [61]. Por un lado se describió a un tipo de astrocito denominado “pasivo”, caracterizado por un fenotipo eléctrico lineal, y por el otro, a uno “complejo”, presentando un amplio repertorio de conductancias de potasio dependientes de voltaje [60], [61]. Esta caracterización inicial se vio limitada por los métodos de identificación celular con los que se contaba en ese entonces, que se basaban en criterios morfológicos y de expresión de la proteína astrogial GFAP [60]–[62]. Sin embargo, las semejanzas estructurales que presentan los astrocitos y las células gliales NG2 (células precursoras de oligodendrocitos que expresan el proteoglicano NG2 [63]), y el hecho de que no todos los astrocitos protoplasmáticos expresan niveles detectables de GFAP en la sustancia gris [64], tornó complicada la asignación de correspondencia entre los

fenotipos electrofisiológicos observados y los subtipos de células gliales presentes en la sustancia gris del SNC [65], [66]. El refinamiento de los métodos de identificación celular, entre los que se destacó la inmunomarcación post-registro del transportador de glutamato astroglial GLAST y NG2 [67], así como la marcación vital con sulforodamina-101 (SR-101) [68], [69], permitió una clasificación de los subtipos de células gliales y agregó información acerca del proceso madurativo de las propiedades eléctricas de la membrana astroglial durante el desarrollo postnatal hasta el estadio maduro. Se observó que durante las primeras tres semanas de vida, tanto las células NG2+ como las GLAST+ se encontraron asociadas a un patrón electrofisiológico de tipo complejo, caracterizado por la presencia de conductancias de potasio dependientes de voltaje. Por otro lado, se observó que luego de la tercera semana de vida, los astrocitos protoplasmáticos GLAST+ se encontraban asociados exclusivamente al fenotipo lineal o pasivo, mientras que la mayoría de las células NG2+ siguieron presentando un fenotipo electrofisiológico de tipo complejo [67]. Los estudios que informan conductancias dependientes de voltaje en células identificadas como astrocitos maduros siguiendo un criterio morfológico o dependiente de la expresión de GFAP [60]–[62] deben ser interpretados con precaución considerando las metodologías de identificación celular implementadas con posterioridad [67], ya que podrían estar atribuyéndole a los astrocitos protoplasmáticos propiedades electrofisiológicas propias de las células NG2 [67]. El solapamiento de las propiedades eléctricas de membrana entre las células NG2 y los astrocitos durante las primeras semanas de vida [67], así como la detección de actividad del promotor del gen de la proteína astroglial GFAP en células NG2 utilizando una línea transgénica reportera de ratones expresando la proteína fluorescente verde (eGFP) bajo el control de un fragmento del promotor del gen de la proteína GFAP humana (hGFAP/eGFP) [70]–[72], contribuyeron a que se confundieran los atributos de ambos tipos celulares [66], [73], [74].

Los astrocitos protoplasmáticos maduros presentan un fenotipo electrofisiológico lineal, caracterizado por un potencial de membrana hiperpolarizado en relación al de las neuronas vecinas, así como por valores de resistencia de membrana extremadamente bajos [67]. La adquisición de estas características durante el desarrollo postnatal se encuentra vinculada al aumento

en los niveles de expresión de los canales de potasio Kir4.1, miembros de la familia de los rectificadores entrantes (*inwardly rectifying*) [75], [76], así como a los de la familia *KCNK (two-pore domain)* [76], [77], entre otros aún no identificados [78]. Los astrocitos muestran una marcada depolarización, así como un aumento significativo de la resistencia de membrana, en registros *in situ* obtenidos de ratones con una ablación genética condicional del canal Kir4.1 dirigida a células astrogliales [75]. A su vez, mostraron una disminución en su capacidad de captación de glutamato y potasio extracelular en rebanadas de cerebro [75]. Estos resultados se encuentran en sintonía con los obtenidos luego de suprimir la expresión de Kir4.1 empleando la técnica de ARN de interferencia (ARNi) en cultivos de células astrogliales [79]. Dado que los transportadores de glutamato astrogliales han evidenciado una merma en su capacidad de funcionamiento a potenciales de membrana (V_m) depolarizados [80], existe la posibilidad de que la disminución en la eficiencia de captación de glutamato extracelular en los experimentos mencionados se deba a la depolarización de membrana presentada por los astrocitos en ambas preparaciones [75], [79]. Se desprende de estas observaciones que la expresión de Kir4.1, inherente al proceso madurativo de los astrocitos [76], guarda estrecha relación con dos de las principales funciones que desarrollan estas células en el cerebro maduro, como son la captación de glutamato y potasio del espacio extracelular que normalmente se liberan en el contexto de la actividad neuronal [81], [75]. Por otro lado, la deficiencia de Kir4.1 se asoció con un aumento de la respuesta post-tetánica y de la plasticidad de corto término luego de una estimulación de alta frecuencia en las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo *in situ*, sugiriendo un papel de Kir4.1 astrogliar en fenómenos de neuroplasticidad [75].

Contrastando con su manifiesta pasividad eléctrica, los astrocitos responden a la actividad neuronal circundante con elevaciones transitorias en la concentración intracelular de iones como calcio o sodio que, por ejemplo, luego de propagarse hacia las terminaciones perivasculares de los procesos astrogliales, tienen la capacidad de desencadenar respuestas vasomotoras en concordancia con las demandas energéticas relacionadas con la actividad neuronal [82], [83]. Estas señales tienen la capacidad de propagarse hacia los astrocitos vecinos abarcando amplias regiones de la corteza cerebral [84] o el

hipocampo [85], lo cual ha contribuido, en parte, a la génesis del concepto de redes astrogliales.

3. *Redes astrogliales*

Una característica distintiva de los astrocitos maduros es la conformación de redes de acoplamiento mediante uniones *gap* [86]. La unidad básica de estas uniones consiste en un canal formado por la yuxtaposición de dos hexámeros proteicos (hemicanales o conexones), aportados por cada una de las células involucradas [87]. Estos canales forman agregados denominados “placas de uniones *gap*”, cuyo tamaño es variable en función del número de canales participantes [87]. Las proteínas que conforman estos canales pertenecen a la familia de las conexinas (Cx), siendo Cx43 y Cx30 las variantes distintivas de las uniones *gap* astrogliales en la corteza cerebral y el hipocampo [88]–[90]. El ensamble de células gliales conectadas mediante uniones *gap* constituye una plataforma para la propagación de señales, tales como ondas de calcio intercelulares [91], y para la distribución de metabolitos, como por ejemplo, la glucosa [92], [93].

La caracterización del tamaño y selectividad de las redes astrogliales se ha llevado a cabo en rebanadas frescas de cerebro evaluando la dispersión de trazadores fluorescentes, luego de su administración intracelular a astrocitos individuales, y ha permitido apreciar que su configuración presenta particularidades dependientes de la región y/o sub-área analizada [94]. En regiones con una clara delimitación de unidades funcionales, como es el caso de los barriles de la corteza somatosensorial, o los glomérulos del bulbo olfatorio, los astrocitos conforman redes de comunicación acotadas espacialmente, con un área de influencia semejante a la de cada una de estas unidades funcionales [95], [96]. Se desprende de estos reportes que la configuración de las redes de acoplamiento astrogliar puede guardar estrecha relación con la estructura y función de las redes neuronales subyacentes.

Las neuronas tienen la capacidad de inducir aumento en la expresión funcional de las Cx43 y Cx30 en cultivos primarios astrogliales obtenidos de la neocorteza del ratón [97]. A su vez, la conductancia de las uniones *gap* puede ser modulada por factores neuroactivos, tales como el neurotransmisor glutamato [98]

y el potasio extracelular [95], [98], [99], lo cual proporcionaría un vínculo funcional entre la actividad sináptica y la propagación de señales a través de la red astrogliol regulada en forma espacio-temporal. En este sentido, el empleo de técnicas de monitoreo por imágenes *in vivo* ha permitido detectar la ocurrencia de ondas de calcio intercelulares en astrocitos del hipocampo del ratón, que muestran sensibilidad al bloqueo farmacológico de la actividad neuronal, así como de la conductancia de las uniones gap [85]. Por su parte, otro estudio reciente ha demostrado que la red de acoplamiento astrogliol constituye un medio para la redistribución de análogos fluorescentes de la glucosa hacia sitios con elevada actividad sináptica, permitiendo la continuidad de la actividad sináptica glutamatérgica, en ausencia de glucosa extracelular, en rebanadas de hipocampo [92].

La capacidad de establecer redes de células gliales conectadas por uniones *gap* es esencial para regular funciones neuronales como la neurotransmisión [100]. En este sentido se ha comunicado [100] que la ablación genética de las conexinas astrogliales (Cx43 y Cx30) provoca un aumento de la excitabilidad, así como de la probabilidad de liberación de neurotransmisor en las sinapsis de la región CA1 del hipocampo del ratón. Este efecto estaría mediado por cambios en la redistribución de potasio y glutamato a través de las redes de acoplamiento astrogliales, ya que se observó que sus concentraciones extracelulares permanecieron elevadas por más tiempo luego de una estimulación de las colaterales de Schaffer [100] en animales deficientes en Cx43 y Cx30. Estos resultados indican que el funcionamiento de las redes astrogliales es necesario para limitar los niveles de actividad sináptica basal en el hipocampo [100]. Otro estudio reciente [101] demostró que las redes astrogliales formadas por Cx43 y Cx30 tienen la capacidad de coordinar la actividad de ensambles neuronales en el hipocampo del ratón, con potencial impacto en la propagación de actividad epileptiforme y de aparición de síntomas convulsivos *in vivo*, sugiriendo que las redes astrogliales pueden ser un blanco para el tratamiento de la epilepsia [101]. Por otro lado, se han descrito neuropatologías asociadas a la deficiencia funcional de las conexinas que constituyen las uniones *gap*. Por ejemplo, se ha informado que la eliminación de Cx43 y Cx30 produce déficits severos en el desempeño sensorial y motriz, así como en la memoria espacial del ratón, lo cual

se correlacionó con la formación de edema mielínico y vacuolización de astrocitos y oligodendrocitos en el hipocampo [102]. También se han detectado alteraciones en la conectividad mediada por uniones *gap* asociadas a condiciones patológicas, como un aumento del acoplamiento astrogliol cortical en un modelo murino de la Enfermedad de Alzheimer [103]. Esta es una observación interesante, dado el aumento de la inmunomarcación de Cx43 en los astrocitos cercanos a las placas amiloides en muestras de corteza cerebral de pacientes con dicha enfermedad [104]. El aumento del acoplamiento astrogliol podría estar desempeñando un rol compensatorio, destinado a contrarrestar los elevados niveles de glutamato extracelular que se han postulado asociados a la Enfermedad de Alzheimer [103].

Considerando la relevancia que presentan las redes de acoplamiento astrogliales en la fisiología del SNC, el estudio de los cambios en su configuración inducidos por una exposición a enriquecimiento ambiental, ya sea mediante el análisis de inmunomarcaciones de las principales conexinas astrogliales Cx43 y Cx30, o mediante experimentos de *dye-coupling* en rebanadas de cerebro, contribuirá a evaluar su grado de participación en los fenómenos de plasticidad astrogliol.

4. *Astrocitos y circuitos corticales*

A pesar de la amplia variedad de funciones que cumplen las diferentes áreas de la corteza cerebral, las similitudes encontradas en los tipos de neuronas, así como en sus patrones de distribución y de conexiones sinápticas a lo largo de toda la neocorteza, han consolidado la idea de la existencia de módulos corticales funcionales, que responderían a un patrón de conectividad de tipo canónico [105]. En este sentido, una característica prominente de toda la neocorteza de los mamíferos es su patrón de laminación compuesto de seis láminas corticales, que se debe a las diferencias que presenta la densidad de distribución de los distintos tipos celulares en cada lámina (Figura i3). A su vez, el patrón de laminación cortical guarda estrecha vinculación con su conectividad [106] (Figura i3).

Las láminas corticales superiores (I, II, y III) se encuentran principalmente vinculadas a funciones de asociación, ya que principalmente integran señales provenientes de la misma área, así como de otras áreas corticales mientras que sus axones proyectan principalmente dentro de la

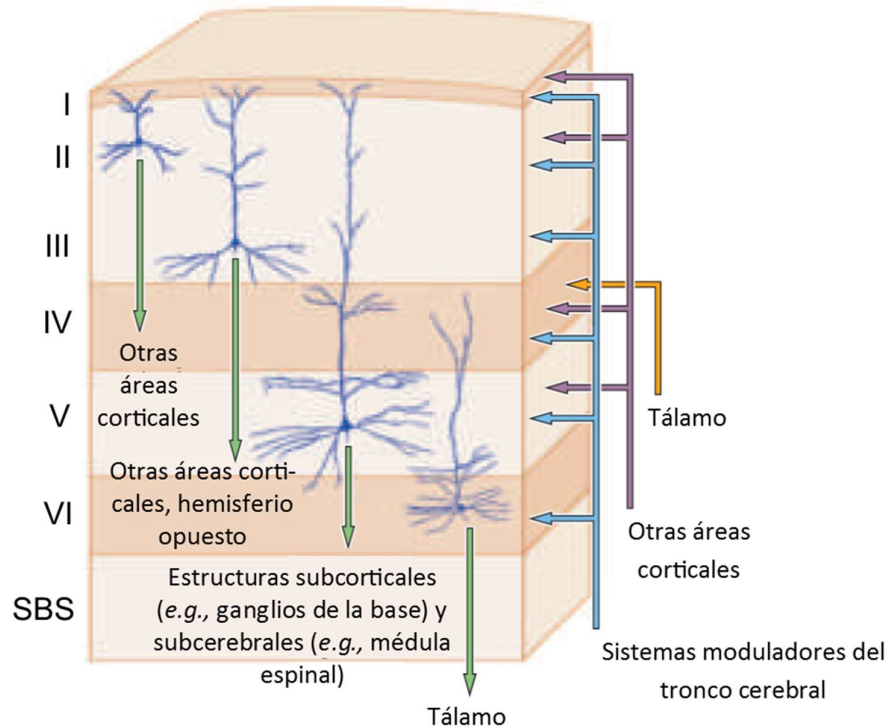


Figura i.3. Circuitos corticales canónicos. Esquema de un bloque representativo de neocorteza cerebral en el que se indican los principales tipos de neurona excitatoria presentes en cada lámina cortical, así como los principales destinos de sus eferencias (flechas verdes) y orígenes de sus aferencias (flechas azules, púrpura y naranja). Figura adaptada de Purves et al., 2004 [107].

neocorteza (Figura i3). Por otra parte, las neuronas de las láminas inferiores, especialmente las grandes neuronas piramidales de lámina V, constituyen un sitio de convergencia para la información procesada en las láminas superiores y dan origen a las principales salidas de información de la corteza. En la región frontal estarán vinculadas a la ejecución de respuestas motoras, al proyectar hacia estructuras subcorticales como los ganglios de la base, o la médula espinal [106] (Figura i3). Las dendritas apicales de las neuronas piramidales de la lámina V (extendidas en las láminas I y II) cuentan con una variedad de mecanismos activos de propagación de potenciales post-sinápticos hacia los somas. La actividad de estas neuronas resulta de la integración de una amplia variedad de estímulos provenientes de otras regiones corticales, así como de estructuras subcorticales, que hacen blanco en las láminas superiores [108], [109], [110]. Estas señales en la corteza frontal están vinculadas a la formación de circuitos que participan del control motor [110], [111].

En sintonía con el concepto de una segregación interlaminar de la actividad neuronal, se ha demostrado que, en la corteza motora y somatosensorial de la rata y el ratón, la densidad de cuerpos celulares astrogiales es mayor en la lámina I con respecto a las láminas II-III, utilizando el marcador de células gliales SR-101 *in vivo* [68], [112]–[114]. En relación a diferencias funcionales, en un estudio desarrollado en la corteza somatosensorial de ratas anestesiadas se observó que la probabilidad de encontrar astrocitos con actividad intracelular de calcio espontánea fue mayor en lamina I respecto a las láminas II-III, aun considerando las diferencias en su densidad interlaminar [112]. Además, los astrocitos activos de lámina I mostraron incrementos de calcio más frecuentes que los de las láminas II-III. Por otro lado, la actividad de calcio medida en los procesos astrogiales de astrocitos individuales mostró un patrón de actividad desincronizada en lámina I, mientras que en los astrocitos de láminas II-III la actividad de los procesos fue sincrónica [112]. Los autores sugieren que estas diferencias podrían ser el reflejo de los distintos tipos de señales reguladas por los procesos astrogiales en ambas láminas. En este sentido, la actividad sincrónica de los procesos astrogiales en las láminas II-III podría deberse a que en la corteza somatosensorial estas láminas reciben aferencias de la lámina IV, principal receptora de las sinapsis tálamo-corticales, las cuales presentan actividad sincronizada [112]. En otro estudio, realizado en rebanadas de cerebro de ratón, se ha observado que en los barriles de la corteza somatosensorial, los astrocitos residentes en las láminas II-III responden de manera selectiva a la estimulación eléctrica de las neuronas de la lámina IV pero no a las de las láminas II-III [115]. Por otro lado, mediante el monitoreo visual de las concentraciones intracelulares de calcio en astrocitos y neuronas *in vivo*, un estudio realizado en la corteza visual del hurón [116] ha demostrado que los astrocitos corticales presentan la capacidad de responder selectivamente a diferentes estímulos visuales, incluso con mayor selectividad respecto a su orientación y frecuencia que las neuronas. A su vez, mediante el empleo de una técnica similar, otro estudio reciente [117] ha demostrado una correspondencia entre los mapas de actividad astrogial y neuronal evocada por estímulos cutáneos en las patas delanteras y traseras, en la corteza somatosensorial de la rata.

Estos trabajos han servido para demostrar el íntimo grado de asociación funcional que muestran los astrocitos y las neuronas en la corteza cerebral, así como la selectividad de la activación de estas células gliales en función de patrones de actividad neuronal específicos. Además, demuestran la existencia de mapas de actividad astrogliar estrechamente vinculados a los mapas de actividad neuronal [118], sobre los que tradicionalmente se han basado los modelos que describen el funcionamiento de los módulos de procesamiento cortical [119].

Existen informes indicando que en las áreas motora y somatosensorial de la corteza cerebral de roedores, las estructuras sinápticas de las láminas corticales superiores presentan una marcada respuesta plástica, tanto en el contexto de una exposición a enriquecimiento ambiental, como a consecuencia de un aprendizaje motor. Por ejemplo, un estudio ha demostrado aumento en el grado de ramificación de las dendritas, así como en el número de espinas sinápticas, en neuronas piramidales de la lámina III en la corteza motora de ratas expuestas a enriquecimiento ambiental [120]. Por otra parte, mediante el monitoreo visual *in vivo* de las dendritas apicales de las piramidales de la lámina V, y de las dendritas basales de las neuronas piramidales de las láminas II-III en la corteza somatosensorial del ratón, se han demostrado aumentos en la densidad de espinas dendríticas, así como en su tasa de formación y eliminación, durante una exposición a enriquecimiento ambiental, tanto en animales jóvenes como adultos [121]. En conjunto, estos resultados permiten suponer que el impacto favorable de la exposición a enriquecimiento ambiental sobre el desempeño en pruebas de aprendizaje [7], la recuperación post-traumática [19], y el retraso de la progresión de síntomas en modelos de enfermedades neurodegenerativas [5], podrían ser consecuencia tanto de una mayor conectividad de la red neuronal relacionada al establecimiento de una mayor cantidad de sinapsis, así como a un aumento de la “flexibilidad” debido a la ocurrencia de una mayor cantidad de espinas transitorias [121].

Considerando el estrecho vínculo funcional presentado por las redes neuronales y astrogliales en la corteza cerebral, esta Tesis explora la posibilidad de que la configuración de las redes astrocíticas corticales constituyan un *locus* de potencial plasticidad en respuesta al enriquecimiento ambiental. Con ello se

espera contribuir a establecer una base para estudios futuros que exploren la posible relación causal de los eventos en astrocitos con los fenómenos de plasticidad cortical que se observan en los paradigmas de enriquecimiento. Asimismo, se espera contribuir en la construcción de una visión integrada de la naturaleza de los fenómenos plásticos que se registran, y a una mejor comprensión del rol potencial de las redes astrogliales en los procesos de recuperación subsiguientes a injurias o enfermedades neurodegenerativas.

5. Hipótesis y objetivos específicos

Observaciones recientes han puesto de manifiesto el rol protagónico que llevan a cabo las redes astrogliales en la fisiología de la corteza cerebral. En este contexto resulta importante destacar que los beneficios observados luego de una exposición a enriquecimiento ambiental sobre el desempeño en pruebas de comportamiento y memoria, sobre la recuperación de comportamientos motores afectados en modelos de injuria por contusión en la corteza frontal, así como en el contexto de enfermedades neurodegenerativas, han sido generalmente asociados a los cambios detectados en componentes neuronales del neuropilo involucrado, sin contemplar los posibles efectos a nivel de la red astrogliar. Se desprende de estas observaciones la importancia de proponer un estudio de los efectos del enriquecimiento ambiental sobre la configuración de las redes astrogliales, a los fines de ampliar el conocimiento de los mecanismos que subyacen a la neuroplasticidad, con potenciales implicancias en el diseño de abordajes terapéuticos.

En tal sentido, la hipótesis central de esta tesis afirma que **la exposición a un ambiente enriquecido en estímulos físicos y sociales, durante el periodo de desarrollo, promueve en la corteza cerebral de la rata cambios en la configuración de las redes astrogliales, que acompañan a los inducidos en componentes neuronales.** Esta hipótesis se afirma en la noción de un rol integrado de la díada neurona-glia y, por extensión, propone un rol significativo de las redes astrogliales en los procesos de organización durante la maduración cortical, así como durante la recuperación en un contexto patológico.

Objetivos específicos

Analizar el impacto del enriquecimiento ambiental (EA) temprano –administrado en crías de rata luego del destete–, sobre parámetros morfológicos y funcionales del componente astrogliial del neuropilo, en las láminas I y II-III de la corteza motora de la rata, como indicadores de procesos de plasticidad astrogliial.

1. Analizar el efecto del EA sobre la expresión –densidad y distribución– de los marcadores: sinaptofisina (neuronal presináptico), Glt-1 (astrocítico perisináptico) y acuaporina-4 (astrocítico perivascular).
2. Analizar el efecto del EA sobre la configuración de redes de acoplamiento astrogliial en la corteza motora de la rata, mediante experimentos de *dye-coupling* en rebanadas frescas de cerebro.
3. Analizar el efecto del EA sobre los patrones de expresión de las conexinas astrogliiales: conexina 43 y conexina 30.

METODOLOGIA GENERAL

1. *Animales*

Los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética Institucional del CEMIC (Protocolo N°: 384/2007) y llevados a cabo respetando los lineamientos de la Guía para el Cuidado y Empleo de Animales de Laboratorio del Consejo Nacional de Investigación de la Academia Nacional de Ciencias (8^{va} edición, 2011, Washington DC, EEUU). Se trabajó con Ratas *Sprague-Dawley* macho, que fueron destetadas a los 21 días de edad (p21) y albergadas en jaulas estándar o de enriquecimiento dependiendo del grupo experimental asignado. La alimentación consistió en alimento balanceado sólido (Cooperación, Asociación de Cooperativas Argentinas, Buenos Aires, Argentina) y agua para bebida, suministrados *ad libitum*. El fotoperiodo de la sala fue controlado automáticamente (luz/oscuridad 12h/12h) y la temperatura ambiente se mantuvo en el rango de los 20-24°C.

2. *Enriquecimiento Ambiental*

Los animales fueron destetados (p21) y asignados de manera aleatoria a cada grupo experimental. A los fines de minimizar las diferencias de desarrollo entre los sujetos, el número de crías se redujo a los 3 días de edad (p3) a 8 individuos por camada. Los grupos experimentales se determinaron en base a las condiciones del entorno (enriquecimiento ambiental: EA; y condición estándar: CE) y al tiempo de permanencia en cada condición (diez o treinta días), que fueron rotulados de la siguiente manera: EA₁₀, CE₁₀, EA₃₀, y CE₃₀ (el número de réplicas se indica en la figura correspondiente a cada experimento). El modelo de enriquecimiento ambiental empleado fue similar al previamente utilizado [122] y consistió en la inclusión de 8 animales en una jaula de 77 x 30 x 45 centímetros (longitud x altura x profundidad), provista de una serie de tubos y accesorios plásticos (para exploración y anidado), varillas de madera (senderos) y múltiples fuentes de alimento y agua (figura M.1A). A su vez, con la intención de que se mantuvieran elevados los niveles de novedad, la disposición de los elementos fue reconfigurada dos veces por semana. La condición estándar consistió en el

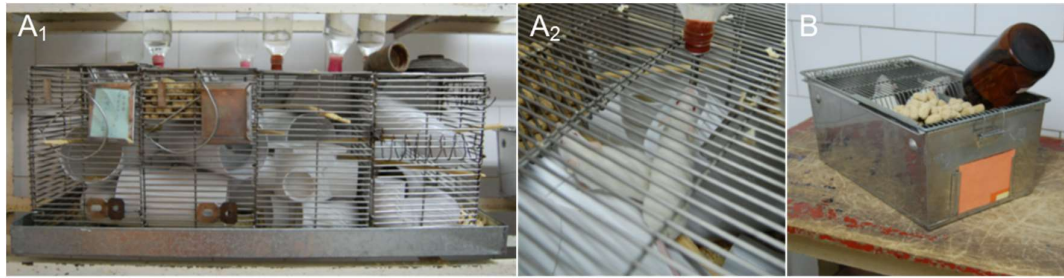


Figura M.1. Modelo de enriquecimiento ambiental. **(A)** Vista panorámica de una jaula de enriquecimiento (A₁) y detalle de animales accediendo a fuentes de alimento y agua (A₂). **(B)** Vista panorámica de jaula estándar.

alojamiento de 2 o 3 animales en jaulas estándar de laboratorio (longitud x altura x profundidad, en centímetros: 30 x 18 x 15), provistas de fuentes de agua y comida únicas, en posiciones fijas, sin el agregado de elementos de estimulación adicionales (figura M.1B).

3. *Electrofisiología y acoplamiento celular*

a. *Preparación de rebanadas de cerebro*

Los animales pertenecientes a los grupos experimentales EA₁₀ y CE₁₀ fueron utilizados en el rango etario p31-p51, mientras que los pertenecientes a los grupos EA₃₀ y CE₃₀ se usaron en el rango p51-p80. Al concluir el periodo de exposición ambiental, los animales fueron rápidamente decapitados empleando una guillotina (Harvard Apparatus, Massachusetts, EEUU). El cerebro fue disecado de inmediato y sumergido en la solución de corte (SC) (composición en mM: NaCl 87, KCl 2.5, CaCl₂ 0.5, MgCl₂ 7, NaH₂PO₄ 1.25, NaHCO₃ 26, glucosa 25, sacarosa 50; osmolaridad: 305 mOsm), enfriada previamente por inmersión del recipiente en agua con hielo. A continuación se obtuvieron bloques coronales de cerebro de 2 mm de espesor, incluyendo la región motora (Figura M2), que fueron adheridos por su superficie caudal -utilizando pegamento a base de cianoacrilato-, a la platina de un vibrátomo (Vibratome® 1000 plus series, Technical Products International, EEUU). La cuba de corte fue inmediatamente llenada con SC fría y el seccionamiento de los bloques se produjo cortando en sentido dorso-ventral. Las rebanadas coronales obtenidas, de 250 µm de espesor, fueron recolectadas en una cámara de incubación con SC a temperatura

ambiente (TA: 20-24°C). Luego de un paso de incubación con sulforrodamina-101 (SR-101, Sigma-Aldrich, #S7635) en la misma solución (1 μ M; 20 min. a 32-34°C)[68], [69], las rebanadas fueron incubadas en líquido cefalorraquídeo artificial (ACSF, por su sigla en inglés, *artificial cerebrospinal fluid*), de composición en mM: NaCl 125, KCl 2.5, CaCl₂ 2, MgCl₂ 1, NaH₂PO₄ 1.25, NaHCO₃ 26, glucosa 11 (osmolaridad: 295 mOsm) por 10 minutos a 32-34°C. Antes de su utilización, las rebanadas permanecieron en esa misma solución por al menos 60 minutos a TA. Todas las soluciones fueron permanentemente burbujeadas con gas carbógeno (95% O₂/5% CO₂, pH 7.4).

b. *Registros electrofisiológicos y dye-coupling*

Las rebanadas fueron transferidas a la cámara de registro de un microscopio de platina fija diseñado para aplicaciones electrofisiológicas (DM-LFS, Leica Microsystems), sujetas con un “arpa” (red de hilos de nylon pegados a un alambre de platino doblado en “U”) y continuamente bañadas con ACSF a TA burbujeado con carbógeno con un caudal aproximado de 2ml/min. Se analizaron las siguientes variables en las condiciones de perfusión, además de la condición basal descrita: 1). En los experimentos con potasio extracelular elevado (10 ó 20 mM), la composición del ACSF fue modificada de manera isoosmótica, aumentándose la concentración de KCl en detrimento de la de NaCl. 2). En los experimentos con baño extracelular termostatzado (32 - 34 °C), el control de temperatura en la cámara de registro se llevó a cabo mediante un dispositivo de calentamiento eléctrico en línea, provisto de un microcontrolador electrónico. 3). El bloqueo farmacológico de las uniones *gap* se realizó agregando carbenoxolona (100 μ M) al ACSF antes del experimento, e incubando durante al menos 30 minutos en la cámara antes de tomar el registro. Los cambios agudos de solución en la cámara de registro se implementaron mediante un sistema de abastecimiento múltiple asistido por gravedad y una llave reguladora de paso en la entrada de la cámara. Las células fueron visualizadas en las láminas I y II/III de la corteza motora utilizando primero un objetivo de bajo aumento (PL FLUOTAR10X / AN: 0.3, Leica Microsystems, #11506505) para situarse en el área de interés (~100 y ~350 μ m desde la superficie pial respectivamente) y posteriormente uno de inmersión en agua, de mayor aumento y larga distancia de

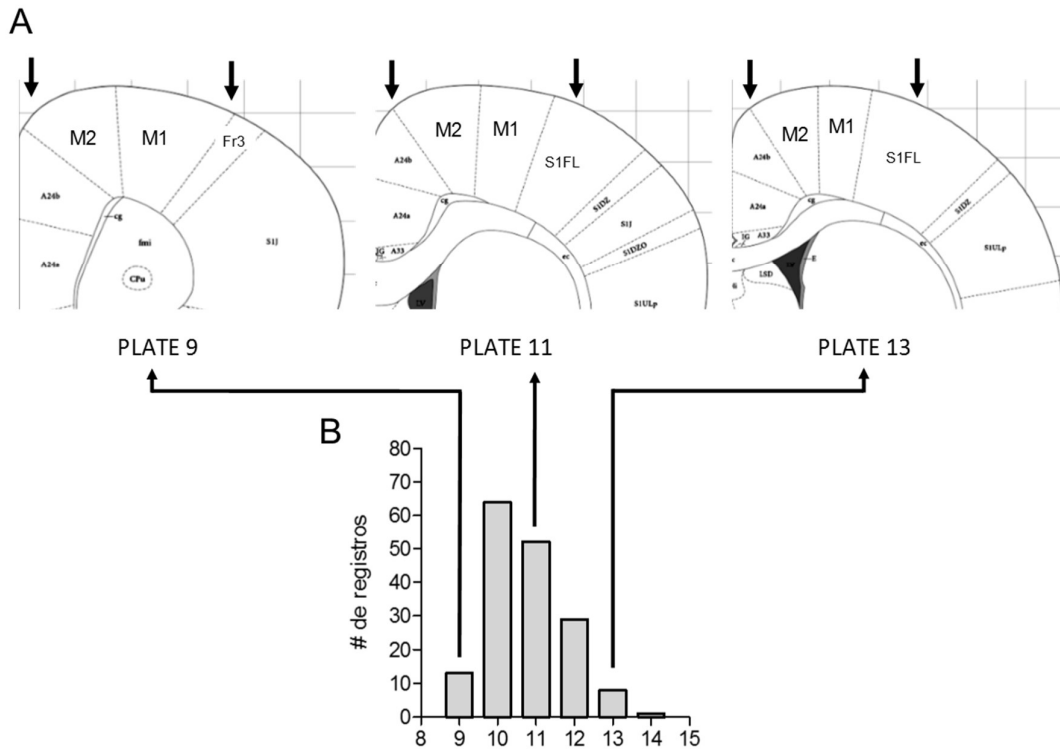


Figura M2. Áreas corticales utilizadas para los experimentos. **(A)** Esquemas de cortes coronales del cerebro de la rata indicando las áreas corticales utilizadas. **(B)** Histograma de frecuencias que muestra la cantidad de registros electrofisiológicos independientes en función de su ubicación de acuerdo al atlas del cerebro de la rata [123].

trabajo (HCX APO L63X / AN: 0.9 / WD: 2.2 mm, Leica Microsystems, #506148), para permitir una adecuada identificación del soma. Las imágenes obtenidas, ya sea mediante epifluorescencia o contraste por interferencia diferencial (CID) con luz infrarroja, fueron digitalizadas empleando una cámara CCD monocromática de 1.45 megapíxeles (DFC-360FX, Leica Microsystems, Suiza) y observadas en tiempo real en el monitor de una computadora empleando el programa *Leica Application Suite* (LAS, V 3.3.0, Leica Microsystems, Suiza). Se obtuvieron registros somáticos en modo de fijación de voltaje y configuración *whole-cell* de astrocitos identificados visualmente en base a su marcación con SR-101 y a su morfología distintiva. Esta se caracteriza por un cuerpo celular de forma ovoide o irregular relativamente pequeño (diámetro aproximado de 10 μm), del cual se originan pocos procesos, claramente distinguibles tanto por microscopía de CID como por su contenido de SR-101, colorante fluorescente incorporado selectivamente por células gliales [68]. También se obtuvieron registros de neuronas (láminas II-III), las cuales fueron identificadas en base a su mayor

tamaño y ausencia de marcación con SR-101. Los registros se obtuvieron utilizando un amplificador para *patch-clamp* (EPC-8, HEKA Elektronik, Lambrecht, Alemania) conectado a una computadora por medio de un convertidor AD/DA (InstruTECH LIH 8+8, HEKA Elektronik, Lambrecht, Alemania). Tanto los protocolos de estimulación usados para la generación de pulsos de voltaje y corriente, como los de adquisición de datos, fueron configurados empleando el programa Patchmaster (PatchMaster® v2x32, HEKA Elektronik, Lambrecht, Alemania). Las pipetas de registro fueron fabricadas a partir de capilares de borosilicato (1.5/0.84 mm de diámetro externo/interno, World Precision Instruments, Florida, EEUU) empleando un estirador de pipetas horizontal controlado por microprocesador (P-97, Sutter Instrument Co., EEUU). La resistencia de las pipetas, medida en el baño (R_p), se encontró en el rango de los 4-6 M Ω cuando fueron llenadas con una solución intracelular de la siguiente composición (en mM): gluconato de potasio 130, MgCl₂ 1, Na₂ATP, HEPES 20, EGTA 10, pH: 7.3 ajustado con KOH)[90]. Alícuotas congeladas conteniendo *Lucifer Yellow* (LY, 1mg/ml, Invitrogen-TFS, #L453) fueron descongeladas y filtradas utilizando filtros de jeringa descartables (Whatman Puradisc®, GE-Healthcare, #6786-0402, Buckinghamshire, Reino Unido) antes de su utilización. Las pipetas fueron llenadas empleando Microloader® *tips* (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) y sujetas al soporte del preamplificador, contactando un electrodo de plata clorado. Un electrodo de referencia de Ag/AgCl (EP2, World Precision Instruments, Florida, EEUU) fue sumergido en el baño de la cámara de registro y la diferencia de voltaje fue compensada utilizando el circuito dedicado presente en el amplificador. Durante la formación del sello (de hasta 5 Giga Ohm), y hasta la culminación del registro, se realizó un monitoreo en línea de los valores de R_p , resistencia del sello (R_s) y resistencia total de entrada celular (R_T), aplicando pulsos de voltaje (duración: 5 ms; amplitud: 2 mV), mediante la función *Test Pulse*. De acuerdo con Lindau y Neher 1988 [124], las corrientes capacitivas de membrana no fueron compensadas. Sin embargo, para prevenir la saturación del amplificador, 5pF de la capacitancia rápida de la pipeta fueron neutralizados de manera rutinaria [125]. Los errores de voltaje debidos a la R_a en serie no fueron compensados, ya que el efecto compensatorio ha probado ser infructuoso en astrocitos presentando valores bajos de R_m como los reportados en esta tesis [77] y para los experimentos de *dye coupling* realizados no resulta esencial la

compensación. Se registró un solo astrocito por rebanada y se implementó un tiempo de difusión de colorante de 10 minutos. Se utilizaron para el análisis sólo los registros que mostraron valores iniciales de potencial de membrana (V_m) ≤ -75 mV y de $R_T \leq 25$ M Ω . La caracterización de las propiedades eléctricas de membrana fue llevada a cabo inmediatamente luego de la ruptura del sello (t_0) y reiterada en dos oportunidades cada cinco minutos. En los experimentos de cambio agudo de solución en la cámara de registro, la caracterización se repitió cada un minuto. Los registros que mostraron cambios de $R_a \geq 20\%$, o de $V_m \geq 3$ mV, fueron excluidos. En los experimentos con LY, la pipeta fue removida cuidadosamente, y las rebanadas fueron fijadas con paraformaldehído (PFA) al 4% en *buffer* fosfato (PB, por su sigla en inglés, *phosphate buffer*) 0.1 M, pH 7.4, durante aproximadamente ~ 12 h en heladera. Luego de 4 lavados de 20 min con *buffer* fosfato salino (PBS, por su sigla en inglés, *phosphate buffered saline*) 0.02 M en heladera, las rebanadas fueron retransferidas al microscopio para la captura de imágenes. Para evitar la contaminación de las rodajas frescas con PFA, la documentación fue llevada a cabo utilizando una cámara de inmersión y accesorios de uso dedicado.

c. *Procesamiento y análisis de los registros electrofisiológicos*

El voltaje de membrana (V_m) fue obtenido directamente de la lectura del amplificador en el modo *zero current*. Para caracterizar los perfiles de corriente versus voltaje, se obtuvieron registros de corriente en respuesta a un protocolo de pulsos de voltaje de -160 hasta +40 mV, con incrementos de 15 mV y duración de 50 ms, desde un potencial de partida de -85 mV. Las corrientes evocadas fueron filtradas con un filtro analógico (5 kHz, filtro Bessel de orden 7), digitalizadas (frecuencia de muestreo: 100 kHz / resolución: 16-bit) y almacenadas en una computadora. La obtención de gráficos I-V en tiempo real contribuyó de manera rutinaria con la identificación de las células registradas. La determinación de los parámetros eléctricos pasivos de membrana se realizó a partir de la respuesta promedio a diez escalones de voltaje de 10 mV de amplitud y 50 ms de duración a una frecuencia de 1Hz. Las corrientes evocadas fueron filtradas con un filtro pasa bajos (10 kHz) antes de su digitalización (200 kHz / 16-bit). La corriente transitoria capacitiva fue modelada con una función mono-exponencial decreciente, entre

$t_{150\mu s}$ (al fin de la corriente capacitiva rápida) y t_{15ms} , utilizando el programa IGOR Pro (v6.1.2.0, WaveMetrics, Oregon, EEUU). De esta curva ajustada se obtuvieron los siguientes parámetros: la corriente instantánea, por extrapolación al momento de la aplicación del escalón de voltaje (I_0), la corriente en el estado estacionario (I_{ss}) y la constante de tiempo (τ). Luego, se calcularon los valores de R_a , R_m y capacitancia celular (C_m), según $R_a = \Delta V / I_0$, $R_m = R_T - R_a$, donde $R_T = \Delta V / I_{ss}$, y $C_m = \tau / [R_m \times R_a / R_m + R_a]$. Los registros para el cálculo de R_s ($R_s = \Delta V / I_{ss}$) fueron obtenidos con antelación a la ruptura del sello. Todos los cálculos fueron automatizados utilizando el programa IGOR Pro. Cada escalón de voltaje evocó una corriente transitoria con dos componentes simétricos, presentes tanto al comienzo, como al final del salto de voltaje. Los parámetros fueron estimados utilizando ambas curvas y luego se trabajó con su promedio.

4. *Inmunohistoquímica*

Los animales destinados a inmunomarcación fueron sometidos a un procedimiento de perfusión trans-cardíaca según lo previamente descrito [122]. La anestesia se inició mediante una inyección intraperitoneal de tiopental sódico (70mg/kg) y la cavidad torácica fue rápidamente abierta, exponiendo el corazón. Para prevenir la coagulación sanguínea, una dosis de heparina fue inyectada en el corazón (0.2 ml, 1000U) y un minuto más tarde, una cánula fue insertada en la aorta ascendente a través del ventrículo izquierdo. Los animales fueron perfundidos con ~150 ml de solución salina y luego con ~300 ml de solución fijadora (PFA al 4% en PB, pH: 7.4) a TA. Posteriormente se removió el cerebro, se post-fijó por inmersión durante toda la noche en la misma solución (heladera) y luego de lavados en PBS (2 de 4 h y 1 de 12 h en heladera), se criopreservó por inmersión secuencial en soluciones de sacarosa al 15 y 30%. El tejido fue congelado por inmersión en isopentano líquido enfriado con hielo seco y almacenado en un congelador a -20°C . Se generó una colección de cortes coronales de 40 μm de espesor abarcando la corteza motora en un criostato (Minitome Plus, International Equipment Company, EEUU), que se almacenó a -20°C en medio crioprotector-anticongelante (composición: 300ml etilenglicol + 300 ml glicerol + 400 ml PB). En los experimentos de inmunomarcación post-registro, las rebanadas fueron fijadas mediante inmersión en solución fijadora (4 h en

heladera) y luego de 4 lavados de 15 min en PBS en heladera, permanecieron en PBS hasta el día siguiente (~12 h en heladera).

Entre una y dos secciones de tejido fueron elegidas al azar y sometidas a un procedimiento de inmunomarcación en corte flotante [122]. En todos los casos, la tinción de fondo fue minimizada incubando en una solución de albúmina de suero bovino (BSA, por su sigla en inglés, *bovine serum albumin*, Sigma-Aldrich, #A9647) al 5% en PBS, durante 40 min. a TA. A continuación, las secciones fueron incubadas con agitación por 48h a 8°C en presencia del anticuerpo primario correspondiente (Tabla M1), en una solución de BSA al 0.5% y azida sódica al 0.02% en PBS-Tx (Tritón x-100 al 1% y gelatina 0.2%, en PBS). Luego de 4 lavados de 10 min. en PBS-Tx a TA, las secciones fueron incubadas con el correspondiente anticuerpo secundario (Tabla M1), en PBS-Tx a TA. Los tiempos de incubación fueron de 4 h en el caso de los anticuerpos conjugados con fluorocromo, y de 2 h para los biotinilados. La marcación fluorescente de anticuerpos secundarios biotinilados se llevó a cabo agregando un paso de incubación con Streptavidina-Cy3 (Invitrogen-TFS, #SA1010; 1:400 en PBS-Tx, 2h, a TA). Luego de dos periodos de 10 min. en PBS y uno de 10 min. en PB a TA, las secciones marcadas con fluorescencia fueron montadas sobre portaobjetos utilizando un medio de montaje acuoso (Mowiol® 4-88, Calbiochem, #475904) y almacenadas en heladera. Para la inmunodetección del marcador neuronal NeuN se usó un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa. La actividad de la peroxidasa endógena se redujo mediante la exposición a una solución con 0.1% de H₂O₂ en etanol:PB:agua2:1:2 por 30 min. a TA. Se incubó en una solución conteniendo el complejo Extravidine®-Peroxidase (Sigma-Aldrich, #E2886, 1:400 en PBS, 2h a TA). A continuación, la actividad de la peroxidasa fue inducida en presencia de H₂O₂ utilizando 3.3'-diaminobencidina tetrahidrocloruro (Sigma-Aldrich, #D5637) como cromógeno. Las secciones fueron deshidratadas en etanol de graduación ascendente, aclaradas en xileno, y montadas utilizando medio de montaje anhidro. En los experimentos de inmunomarcación post-registro se incubó el anticuerpo primario (anti-GFAP) durante 24 h en heladera. Las rebanadas fueron montadas luego de 2 lavados de 10 min. en PBS-Tx y otros 2 lavados de 10 min. en PBS.

EPITOPE	CONJUGADO	ESPECIE	PROVEEDOR	#CATALOGO	DILUCIÓN
AQP4	-	Cabra	SCBT	sc-9888	1:500
Cx43	-	Conejo	Invitrogen-TFS	71-0700	1:250
Cx30	-	Conejo	Invitrogen-TFS	71-2200	1:1000
GLT1	-	Conejo	SCBT	sc-15317	1:500
GFAP	Cy3	Ratón	Sigma-Aldrich	C9205	1:1000
GFAP	-	Ratón	BioGenex	MU020-UC	1:5000
NeuN	-	Ratón	Merck-Millipore	MAB377	1:1000
SYP	-	Conejo	SCBT	sc-9116	1:500
S100 β		Ratón	Sigma-Aldrich	S2532	1:1000
Goat-IgG	Biotina	Conejo	Sigma-Aldrich	B7024	1:200
Mouse-IgG	Biotina	Cabra	Sigma-Aldrich	B6649	1:200
Mouse-IgG	AF ¹ 488	Conejo	Invitrogen-TFS	A11059	1:1000
Rabbit-IgG	AF ¹ 555	Cabra	Invitrogen-TFS	A21428	1:1000
Rabbit-IgG	AF ¹ 635	Cabra	Invitrogen-TFS	A31577	1:1000

¹Alexa Fluor®

Tabla M1. Lista de anticuerpos. AQP4: acuaporina 4; Cx43: conexina43; Cx30: conexina30; Glt-1 (Eaat₂): transportador de aminoácidos excitatorios tipo 2; GFAP: proteína glial fibrilar ácida; NeuN: marcador nuclear neuronal; Syp: sinaptofisina; S100 β : proteína de unión a calcio de la familia S100, variante β .

5. Imágenes

a. Adquisición

La adquisición de imágenes se llevó a cabo en el mismo microscopio en el que se realizaron los experimentos de electrofisiología (ver sección 3.b. *Registros electrofisiológicos y dye-coupling*), que contaba con un sistema de epifluorescencia con lámpara de mercurio, y filtros apropiados para la visualización de los marcadores fluorescentes utilizados. Las imágenes fueron adquiridas utilizando la cámara mencionada anteriormente, bajo el control del programa LAS (V 3.3.0, Leica Microsystems, Suiza). La selección del área a fotografiar fue llevada a cabo con la ayuda de una retícula, empleando un objetivo de bajo aumento (N PLAN 5X / AN: 0.12, Leica Microsystems, #11506302). Se seleccionaron cuatro campos por corte, comenzando a 2 mm de la línea media, cada 500 μ m en dirección lateral. En cada ubicación, las imágenes fueron obtenidas a 100 y/o 350 μ m respecto de la piamadre, asegurándose que el campo abarcara la lámina I y parte de las láminas II-III, respectivamente. La correcta localización laminar se confirmó en cortes comparables marcados con el marcador neuronal NeuN, en los que se apreció la extensión de la lámina I,

caracterizada por una muy baja densidad de neuronas, hasta 200 μm aproximadamente desde la piamadre, en contraste con las láminas II-III, en las que se apreció una mayor densidad de neuronas. En las áreas de interés, se obtuvieron imágenes de 322 x 241 μm empleando un objetivo de 40X (N PLAN, AN: 0.65, Leica Microsystems, #506097). En los preparados destinados al conteo de neuronas y astrocitos, las secciones marcadas para NeuN (histoquímica) y S100 β (fluorescencia), fueron fotografiadas en toda su profundidad empezando desde el primer plano focal cada 2 μm , modificando manualmente la posición en el eje z con el control micrométrico del microscopio. En los experimentos de *dye-coupling*, la adquisición de imágenes se realizó con un objetivo de inmersión en agua (HCX APO L 20X / AN: 0.5 / WD: 3.5 mm, Leica Microsystems, #15506147), cada 5 μm . Los parámetros de captura (tiempo de exposición, ganancia, ajuste de *gamma*) fueron establecidos para cada marcador o colorante de modo de maximizar el rango dinámico en base a un histograma de intensidades de referencia, e implementados de igual manera para los distintos grupos experimentales. Por otra parte, el estudio de la asociación entre las células acopladas y los astrocitos marcados con GFAP fue desarrollado sobre pilas de imágenes de 1024 x 1024 píxeles obtenidas cada 1 μm con un microscopio confocal de escaneo laser (BX61, Olympus y software FluoView 300) en el servicio de microscopía confocal del Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular (FCEN-UBA). Se usó un objetivo 40x de inmersión en aceite (UplanApo, AN:1, Olympus). La excitación de LY y Cy3 se llevó a cabo utilizando fuentes láser de Argón ($\lambda = 488 \text{ nm}$) y Helio-Neón ($\lambda = 543 \text{ nm}$) respectivamente. Para minimizar la interferencia por excitación cruzada, la adquisición de imágenes fue realizada en modo secuencial. Todas las imágenes fueron guardadas en formato TIFF para su posterior análisis.

b. Procesamiento

Todo el procesamiento se llevó a cabo utilizando el programa ImageJ [126] (v1.50b). A las imágenes de inmunofluorescencia, se les sustrajo la fluorescencia de fondo, calculada como el valor de intensidad promedio de la imagen de una sección control inmunorevelada sin anticuerpo primario. También se corrigieron las inhomogeneidades sistemáticas del campo. Para esto, se

generó una imagen a partir de una muestra uniforme (dispersión de una gota de solución del colorante Rodamina-B; Sigma-Aldrich, #R-9131) sobre un cubreobjetos. Esta imagen patrón fue dividida por su valor de intensidad promedio, generando una matriz de coeficientes en torno a la unidad, que fue multiplicada por cada imagen experimental [127]. En el caso de las marcaciones de acuaporina-4, a cada imagen resultante se le restó un duplicado suavizado (*Gaussian Blur* con $\sigma=2$), para homogenizar las variaciones de intensidad no sistemáticas del fondo, que dificultaban el establecimiento de un umbral global durante el análisis [128].

c. Análisis

Todos los análisis se realizaron utilizando el programa ImageJ [126] (v1.50b). En el caso de las imágenes que presentaron una inmunomarcación de tipo puntillado o granular (Cx43, Cx30, SYP, y Glt-1) el análisis fue realizado sobre uno de los cuatro campos fotografiados en cada corte, siguiendo un criterio de selección aleatorio. La cuantificación se realizó en tres áreas de muestreo circulares (100 píxeles de diámetro), distribuidas aleatoriamente dentro de una región de interés rectangular de 322 x 130 μm centrada verticalmente con respecto a la imagen, y omitiendo la inclusión de marca asociada a vasos sanguíneos, o zonas desprovistas de marca asociadas a la presencia de somas neuronales (ver Figura M.3 y Figura I.4 en Resultados). Las imágenes de cada área de muestreo fueron binarizadas empleando un umbral global determinado mediante el algoritmo *Moments*, se midió el porcentaje de píxeles sobre el valor umbral, y los valores de las tres áreas fueron promediados. En el caso de la marcación de acuaporina-4, las imágenes fueron binarizadas empleando un umbral global basado en el histograma (función *Auto-Threshold*). La cuantificación del porcentaje de área marcada se realizó sobre una región de interés rectangular como la mencionada anteriormente (Figura M3C1) y se promediaron los valores obtenidos de cuatro posiciones de muestreo (ver sección 5.a: *Adquisición*). Para contabilizar células marcadas con NeuN o S100 β , las células visualizadas fueron marcadas manualmente mediante la función *Multi-point tool* dentro de los límites impuestos por una sonda de conteo, ubicada en el centro de la imagen (plugin: *Sampling Window*, Jiri Janacek, 2012), con dimensiones 150 x 150 μm y 250 x

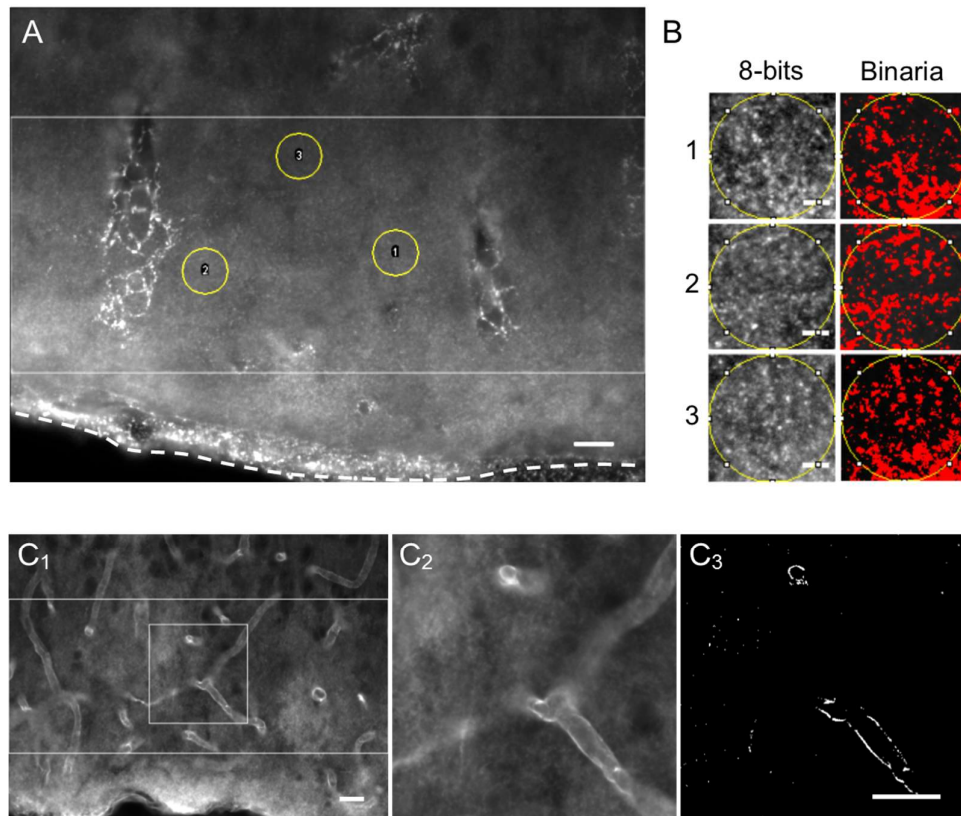


Figura M.3. Cuantificación de inmunomarcaciones. **(A)** Imagen de una inmunomarcación representativa de tipo puntillado o granular (Cx43), en la corteza motora de la rata (Lámina I). Nótese la banda rectangular delimitando el área destinada a la cuantificación, dentro de la cual se localizan tres áreas de muestreo aleatorio representativas (círculos amarillos, 100 píxeles de diámetro). **(B)** Magnificación de las tres áreas de muestreo indicadas en A. La primera columna muestra las imágenes en escala de grises (8-bits), mientras que la segunda muestra las imágenes binarias obtenidas luego de la determinación del umbral. **(C)** Imagen de la marca de AQP-4. Se muestra una imagen de bajo aumento (C_1) indicando la región de interés para la cuantificación y un recuadro cuya ampliación se muestra antes (C_2) y después (C_3) del procesamiento. La línea interrumpida delimita la piamadre (A). Barras de escala: $20\mu\text{m}$ (A, C); $5\mu\text{m}$ (B).

$200\ \mu\text{m}$ para NeuN y S100 β , respectivamente. Los resultados fueron expresados como número de células marcadas por unidad de área. Para el estudio morfométrico de las redes de astrocitos marcadas por transferencia de colorante las células acopladas fueron visualizadas, seleccionadas manualmente utilizando la función *Multi-point tool*, y contabilizadas como número de células acopladas. Se delimitó el área proyectada de cada red con el comando *Polygon selections*, así como la máxima distancia entre células en los ejes paralelo (eje x) y perpendicular (eje y) a la superficie pial, utilizando el comando *Straight line selection*. La extensión de cada red en la profundidad de la rebanada (eje z) se calculó como el número de fotografías $\times 5\ \mu\text{m} \times 1.36$; en donde $5\ \mu\text{m}$ corresponde a la distancia nominal entre planos y 1.36 es el índice de refracción de la corteza cerebral de la

rata [129]. Además, se calcularon los valores de densidad celular proyectada en un plano como densidad 2D = # células acopladas / área, y de densidad celular tridimensional como densidad 3D = # células acopladas / área x eje z (ver Figura 1.3A). Para evaluar la asociación entre las células llenadas con *lucifer yellow* y los procesos marcados con GFAP se calculó la proporción de células acopladas (LY^+) que expresaban o no GFAP ($LY^+/GFAP^+$ y $LY^+/GFAP^-$). Se consideró a una célula LY^+ como $GFAP^+$ si el soma estaba delimitado por procesos $GFAP^+$.

6. Estadística

Las comparaciones estadísticas se realizaron utilizando el programa InfoStat (Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina) y Prism (versión 5.01, Graphpad Software, California, Estados Unidos). Los supuestos de distribución normal e igualdad de varianzas entre tratamientos fueron puestos a prueba utilizando las pruebas de Shapiro-Wilks (modificado) y Levene, respectivamente. En los casos de distribución normal se implementó la *prueba t de Student* a dos colas para dos muestras, con o sin *corrección de Welch* por falta de homocedasticidad, según correspondiere, o análisis de la varianza (ANOVA) de dos factores, para evaluar efectos del enriquecimiento ambiental en diferentes láminas de la corteza. En caso de rechazarse la hipótesis nula de normalidad, se implementaron métodos no paramétricos (*prueba U de Mann-Whitney*). A su vez, en la situación de rechazo de la hipótesis nula de homocedasticidad, y al no poder aplicarse la *corrección de Welch*, se aplicó una transformación de variable logarítmica de base 10 [130]. A menos que se especifique lo contrario, los resultados obtenidos se encuentran expresados como valor promedio \pm su error estándar. El número de réplicas (N) en los experimentos de marcación inmunohistoquímica se refiere al número de animales dentro de cada tratamiento, mientras que en los experimentos de electrofisiología y *dye-coupling*, hace referencia al número de registros o redes. En todos los casos, las diferencias significativas fueron establecidas con un valor de probabilidad $\alpha \leq 0.05$ (*); también se indicaron los valores de $\alpha \leq 0.01$ (**) y $\alpha \leq 0.001$ (**).

RESULTADOS

CAPITULO I

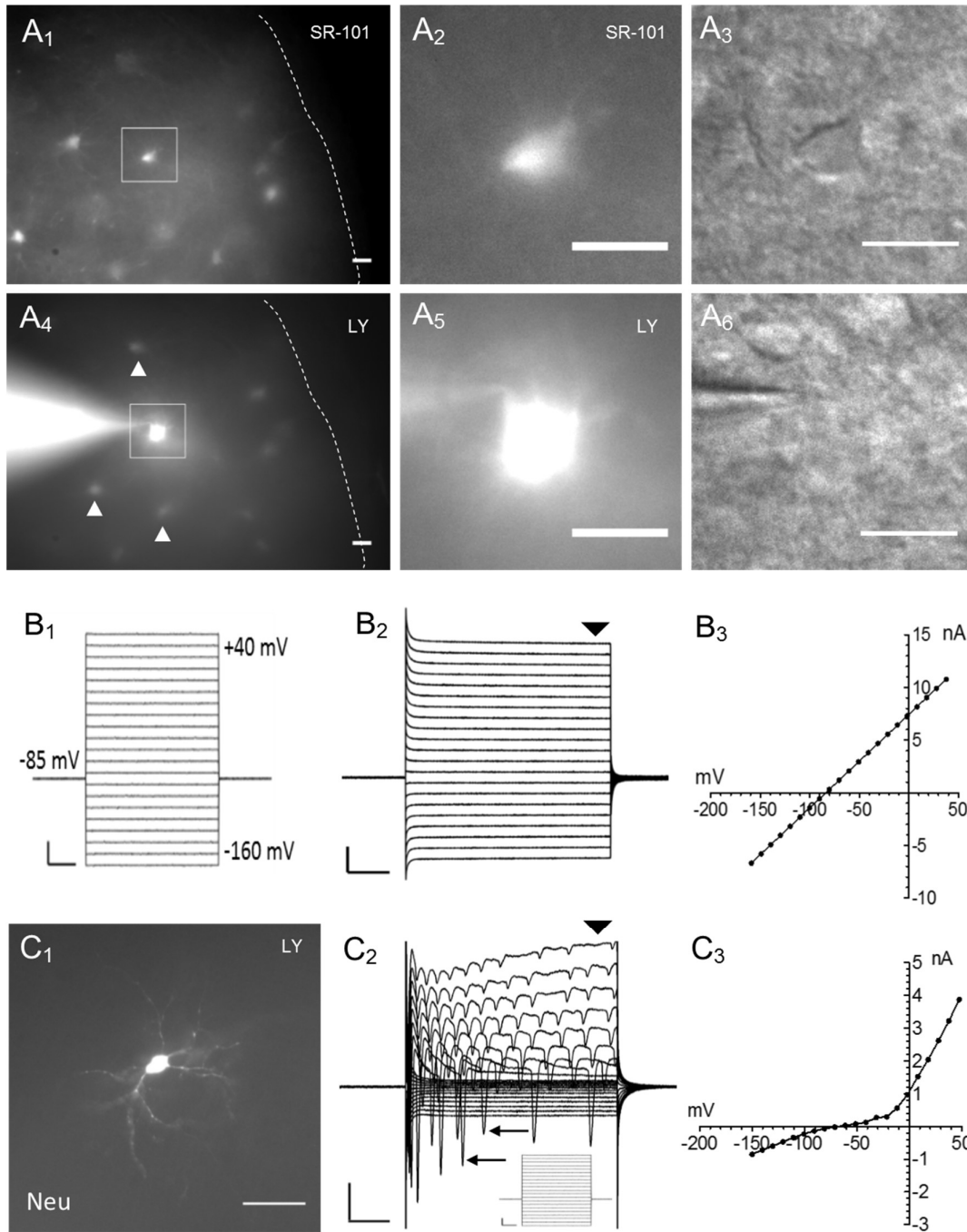
Caracterización de los astrocitos en las láminas I y II-III de la corteza motora de la rata.

Uno de los objetivos de esta Tesis fue evaluar el impacto del enriquecimiento ambiental sobre la configuración de las redes astrogiales de la corteza motora de la rata. Teniendo en cuenta que la estructura y función de estas redes pueden estar limitadas por la citoarquitectura laminar de la corteza, se implementó un análisis segregado entre las láminas I y II-III. En primer lugar, fue necesario caracterizar posibles diferencias en la capacidad de los astrocitos de estas láminas para formar redes astrogiales. Para esto, se realizaron experimentos de *dye-coupling*, en astrocitos corticales identificados electrofisiológicamente en rebanadas de cerebro, y análisis de la distribución de las conexinas que median la formación de redes astrogiales, mediante inmunohistoquímica en secciones de tejido fijadas.

1. Identificación electrofisiológica de los astrocitos de la corteza motora

Como se mencionó en la introducción, las propiedades electrofisiológicas astrogiales, estudiadas mediante registros de astrocitos en rebanadas frescas de cerebro, se caracterizan por voltajes de membrana (V_m) marcadamente hiperpolarizados en relación al V_m neuronal, predominio de un fenotipo electrofisiológico lineal, así como por una muy baja resistencia de membrana (R_m) [67], [69], [96]. Considerando que en nuestros experimentos la edad de los animales utilizados fue al menos de 35 días de edad, la obtención de un fenotipo electrofisiológico maduro con las características mencionadas fue utilizada como herramienta para confirmar la identidad de las células registradas. Se ha reportado previamente que los astrocitos de la lámina I presentan mayor frecuencia de elevaciones transitorias espontáneas del calcio intracelular que los de las láminas II-III, sin embargo, no se ha abordado una caracterización diferencial en cuanto a sus propiedades eléctricas [112]. Con el fin de evaluar una

posible diversidad laminar en las propiedades eléctricas de los astrocitos de la corteza motora de la rata, se obtuvieron registros de astrocitos, identificados en base a su marcación con el marcador sulforhodamina-101 [68] en las láminas I y II-III, en rodajas agudas de cerebro de animales de 35 a 42 días de edad. Las células registradas mostraron una morfología caracterizada por un cuerpo celular ovoide, o irregular, de menos de 10 μm de diámetro, del cual por lo general se apreciaba la nacimiento de algún proceso primario (ver Figura I.1A) y/o incluso alguno con clara proyección vascular. Los registros de la lámina I se obtuvieron a una distancia promedio de $95 \pm 6 \mu\text{m}$ (N=14), mientras que los de las láminas II-III se obtuvieron a $387 \pm 11 \mu\text{m}$ (N=23) con respecto a la piamadre. Los astrocitos registrados presentaron un V_m hiperpolarizado en torno a los -80 mV, valores de R_m muy bajos en torno a los 2 M Ω , y mostraron un perfil lineal de corrientes evocadas por un protocolo de estimulación con pulsos de voltaje escalonados, sin evidencia de conductancias dependientes de voltaje o tiempo (Figura I.1B y Tabla I.1). No se detectaron diferencias estadísticamente significativas en los valores de V_m , R_m , y C_m , entre las láminas I y II-III (Tabla I.1). En contraste con los registros astrogliales, los registros de neuronas identificadas por el tamaño de su soma en lámina II-III mostraron un V_m relativamente más despolarizado, así como valores de R_m decenas de veces mayor que la astrocítica (ver Tabla I.1). A su vez, las corrientes evocadas por pulsos de voltaje despolarizantes evidenciaron la presencia de componentes dependientes de voltaje y tiempo, con cinética típica de las corrientes de acción (Figura I.1C). Los resultados obtenidos permitieron definir a los astrocitos de láminas I y II-III de la corteza motora de la rata como una población celular con propiedades electrofisiológicas homogéneas, caracterizadas por un potencial de membrana hiperpolarizado en relación al de las neuronas circundantes, valores de resistencia de membrana bajos, y una aparente ausencia de conductancias dependientes de voltaje o tiempo. Estos resultados se encuentran en línea con la homogeneidad electrofisiológica descrita en la población astrogliar de la corteza frontal de ratones jóvenes utilizando la misma técnica de registro [131] y con informes de registros electrofisiológicos obtenidos *in vivo* en la corteza somatosensorial de la rata, que muestran valores comparables de V_m entre astrocitos superficiales (láminas I-IV) y profundos (láminas V-VI) [132].



Asimismo, el fenotipo electrofisiológico pasivo mostrado por los astrocitos registrados se encuentra en línea con lo reportado para astrocitos de los barriles de la corteza somatosensorial [96], o del hipocampo [60], [67], [69].

La determinación de los parámetros electrofisiológicos de membrana resultó de utilidad a los fines de la identificación de los astrocitos *in situ*, así como

Figura I.1 (página anterior). Propiedades eléctricas de membrana de astrocitos y neuronas en la corteza motora. **(A)** Identificación de un astrocito cortical en base a su marcación con SR-101 (A_{1-2}), y detalle de su morfología bajo microscopía de contraste por interferencia diferencial (A_3). Las imágenes en (A_{4-6}) representan los mismos campos, una vez transcurridos los 10 minutos de registro con una pipeta cargada de *lucifer yellow*, LY. Nótese la presencia de cuerpos celulares marcados con LY entorno a la célula registrada, indicando la existencia de acoplamiento intercelular (cabezas de flecha, A_4). Barra de escala: 10 μm . **(B)** Registro electrofisiológico en modo de fijación de voltaje y configuración *whole-cell* del astrocito mostrado en A luego de la aplicación de un protocolo de voltajes escalonados de -160 a +40 mV partiendo de un voltaje de -85mV, (B_1). Registros obtenidos mostrando corrientes simétricas de gran amplitud (B_2). La grafica I-V muestra un perfil lineal (B_3), indicando una aparente ausencia de conductancias dependientes de voltaje o tiempo. La marca en B_2 indica el origen de los datos utilizados en B_3 . Barras de escala, horizontal: 10 ms (B_{1-2}), vertical: 20 mV (B_1), 2 nA (B_2). **(C)** Registros representativos de la corriente de membrana evocada en una neurona cortical de las láminas II-III llenada con LY y expuesta a un protocolo de pulsos de voltaje (-150 a +50 mV, voltaje de partida -75 mV) (C_1). Nótese la presencia de componentes transitorios con cinética rápida y dependencia de voltaje (C_2 , flechas), así como una mayor amplitud relativa de las corrientes salientes (C_2), que se hace evidente en la gráfica I-V (C_3). Barra de escala en C_1 : 50 μm . La marca en C_2 indica el origen de los datos utilizados en C_3 . Barras de escala en C_2 , horizontal: 10 ms; vertical: 2 nA; inset, vertical: 20 mV.

para la constatación de la buena calidad del acceso celular durante la sesión de registro, mediante el monitoreo de los valores de R_a y, por ende, del correcto llenado celular en los experimentos de acoplamiento intercelular.

Tipo celular	Lamina	V_m (mV)	R_m (M Ω)	C_m (pF)	R_a (M Ω)	N
Astrocito	I	-81.8 \pm 0.7	1.65 \pm 0.16	505.01 \pm 52.58	10.71 \pm 0.54	14
Astrocito	II-III	-80.8 \pm 0.4	1.35 \pm 0.15	565.08 \pm 59.53	11.95 \pm 0.72	23
Neurona	II-III	-60.3 \pm 7.7	110.59 \pm 4.26	39.26 \pm 2.18	41.34 \pm 1.23	3

Tabla I.1. Propiedades eléctricas de membrana de astrocitos y neuronas en las láminas I y II-III de la corteza motora de la rata. Valores expresados como promedio \pm su error estándar. La prueba U de Mann-Whitney no mostró diferencias significativas entre las propiedades astrogiales de láminas I y II-III: V_m , $P=0.0912$; R_m , $P=0.0780$; C_m , $P=0.6566$; R_a , $P=0.4010$; N representa el número de células registradas.

2. Redes de acoplamiento astrogiales en las láminas I y II-III

Para evaluar si existían diferencias interlaminares en la configuración de las redes de acoplamiento astrogial en las láminas superiores de la corteza motora de la rata, se llevó a cabo un estudio comparativo de la estructura de las redes de acoplamiento *in situ*, mediante experimentos de *dye-coupling* en rebanadas frescas de cerebro. Para esto, se administró el marcador fluorescente *lucifer yellow* (LY) vía la pipeta de registro electrofisiológico durante 10 minutos en astrocitos individuales y posteriormente se evaluó su difusión hacia las células

vecinas en las rodajas fijadas luego del registro. La totalidad de los astrocitos analizados mostró alto grado de acoplamiento, documentándose la presencia del colorante en decenas de células vecinas al astrocito registrado (Figuras I.1A₄, y I.2A₁). Con el objetivo de analizar la naturaleza de las células acopladas, una muestra de las rebanadas con redes marcadas en la lámina I (n=2) fue sometida a un procedimiento de inmunomarcación dirigido contra el marcador astrogial GFAP y se evaluó el grado de asociación entre esta marca y el *lucifer yellow* presente en las células acopladas. En las redes de células estudiadas, el 96% (133/139) de los cuerpos celulares marcados con *lucifer yellow* se encontraba claramente asociado a procesos celulares inmunoreactivos para GFAP, constatándose la naturaleza astrogial de casi la totalidad de las células acopladas (Figura I.2A₂₋₅). La fracción de las células acopladas que no expresó GFAP fue mínima (Figura I.2A₅), indicando que la composición de las redes de acoplamiento fue en gran mayoría astrogial. Para confirmar que el acoplamiento se encontraba mediado por uniones *gap*, se realizaron experimentos en presencia del bloqueante carbenoxolona (CBX). Este derivado del ácido glicirretínico ha probado ser un potente bloqueante de uniones *gap* astrogiales tanto en cultivos celulares (20 μ M) como en rebanadas frescas de cerebro (100-150 μ M), ejerciendo su efecto a los pocos minutos de ser aplicado [133]. Si bien se han reportado efectos sobre otros blancos en este rango de concentraciones, como por ejemplo el bloqueo de canales de calcio dependientes de voltaje [134], o de receptores purinérgicos [135], la aplicación de esta droga constituye una metodología válida para el estudio de la participación de las uniones *gap* en la difusión intercelular de marcadores de acoplamiento en experimentos de *dye-coupling* [72], [96], [136], [137].

En nuestros ensayos, la preincubación de las rodajas con CBX 100 μ M por al menos 30 minutos antes del registro redujo a cero la incidencia del acoplamiento, permaneciendo el colorante exclusivamente dentro de la célula registrada (Figura I.2B). En estos experimentos, la retención del colorante permitió distinguir la marcación intensa del cuerpo celular y de los procesos primarios, así como una marcación de los procesos más finos que dan el aspecto “espongiforme” característico de los astrocitos protoplasmáticos [56], [57].

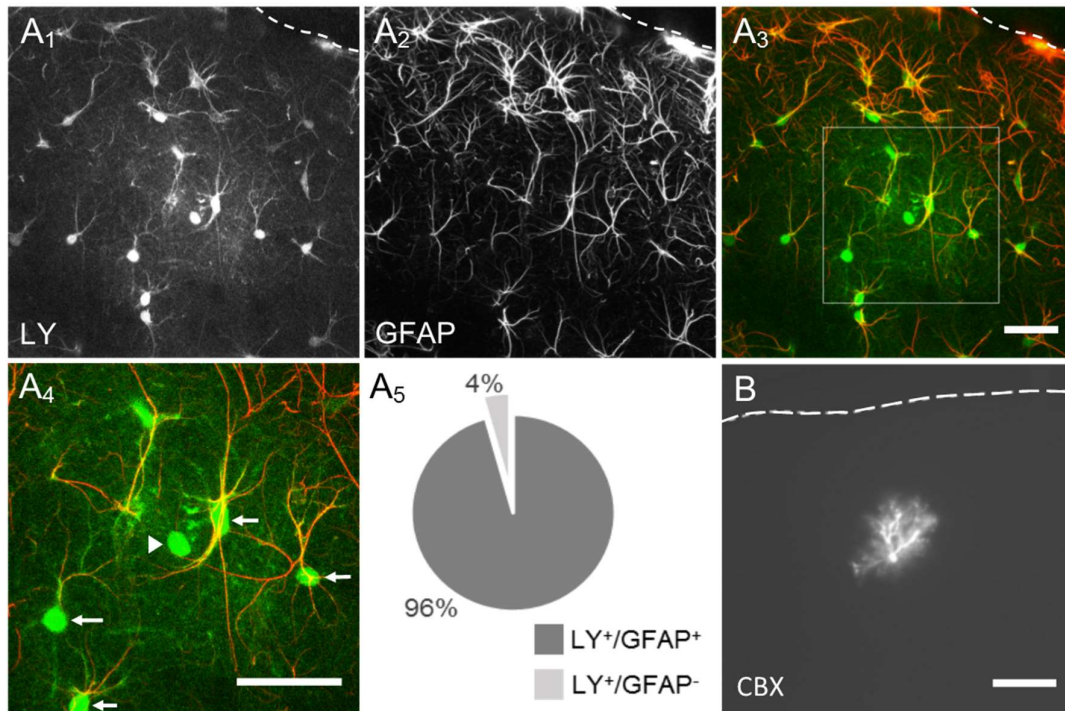


Figura 1.2. Identificación de las células acopladas mediante uniones *gap*. **(A)** Visualización de LY (A₁), GFAP (A₂) y su superposición (A₃) en una red representativa de astrocitos acoplados en la corteza motora (lámina I). (A₄) Magnificación de la zona demarcada en A₃, en la que se indica la presencia de células acopladas asociadas a procesos GFAP⁺ (A₄, flechas), y de una que no lo está (A₄, cabeza de flecha). (A₅) Cuantificación del porcentaje de células acopladas expresando GFAP (n=2 rebanadas, 2 animales). **(B)** La pre-incubación de rebanadas en presencia del bloqueante de uniones *gap* carbenoxolona (CBX, 100 μ M, 30 minutos) inhibió la difusión de LY hacia los astrocitos vecinos durante el registro (N=4). Barra de escala: 50 μ m. La línea interrumpida delimita la piamadre (A₁₋₃, B).

Estos resultados indicaron que la difusión de *lucifer yellow* en las redes de células acopladas se encontraba mediada por uniones *gap*.

El análisis interlaminar de la estructura de las redes mostró que el número de células acopladas en la lámina I fue casi el doble que en la lámina II-III (Figura 1.3A-B₁), mientras que el área de acoplamiento fue de aproximadamente un 40 % menor en las láminas II-III comparando con la lámina I (Figura 1.3A-B₂). El hecho de que la reducción en el área de acoplamiento haya sido menor que la del número de células acopladas sugirió la existencia de una diferencia en la densidad de empaquetamiento celular en las redes de estas láminas. Calculando el cociente entre el número de células acopladas y el área se obtuvo un valor de densidad celular promedio un 32% mayor en la lámina I con respecto a las láminas II-III (Figura 1.3B₃). Para evaluar si la diferencia interlaminar en la densidad celular observada en las redes reflejaba una densidad astrocítica

diferencial en las láminas I y II-III, se analizó la densidad de células inmunoreactivas para la proteína astrogliar S100 β en ratas de 51 días de edad. La densidad de células S100 β ⁺ arrojó un valor promedio en la lámina I casi un 74% mayor que en las láminas II-III (424 ± 29 cel/mm², n=9 y 244 ± 18 cel/mm², n=9, respectivamente). Esta diferencia fue estadísticamente significativa (prueba t de Student a dos colas: $P < 0.001$), sugiriendo que la diferencia observada en la densidad celular de las redes de células acopladas podría reflejar parcialmente una diferencia intrínseca en la densidad astrogliar interlaminar.

En la corteza cerebral gran parte de las aferencias y eferencias tienen una disposición paralela o perpendicular a la superficie cortical [138], [139]. Además, los circuitos corticales presentan una organización anatómica y/o funcional columnar [140], [141]. Dado que la morfología de las redes gliales puede encontrarse limitada por la estructura de los circuitos locales [95], [96], [142], [143], nos propusimos evaluar si la morfología de las redes reflejaba la estructura cortical. Para esto, se midió la extensión máxima de las redes astrocíticas en las direcciones paralela (Eje X) y perpendicular (Eje Y) a la superficie pial (Figura I.3A₂₋₃) y se calculó un índice de circularidad "r", definido como el cociente entre las variables Eje X y Eje Y [96], [131], [142]. Las redes que mostraron un coeficiente r menor o igual que 1.1 y mayor o igual a 0.91 fueron consideradas circulares [142] en cuanto a su proyección en el plano coronal. Las redes circulares representaron el 43% (6/14) y 35% (8/23) del total de redes en las láminas I y II-III, respectivamente (sin diferencias significativas: *Test de Fisher*, $p = 0.7321$). Las redes de la lámina I que no presentaron un coeficiente r en torno a la unidad mostraron una extensión preferencial en la dirección paralela a la superficie cortical (50%, 7/14), mientras que una fracción minoritaria lo hizo en la dirección perpendicular (7%, 1/14). A su vez, los clusters de las láminas II-III se extendieron preferencialmente en la dirección perpendicular (56%, 13/23), mientras que una minoría lo hizo en la dirección paralela (9%, 2/23). En sintonía, el valor promedio de r fue mayor en lámina I respecto a las láminas II-III (1.09 ± 0.03 , n=14; 0.9 ± 0.03 , n=23; Prueba t de Student a dos colas: $P < 0.001$). Mientras que la extensión del Eje Y no mostró diferencias interlaminares significativas, la extensión de los Ejes X y Z en las redes de las láminas II-III fue menor que en las de la lámina I (23% y 13%, respectivamente), ver Figura I.3C.

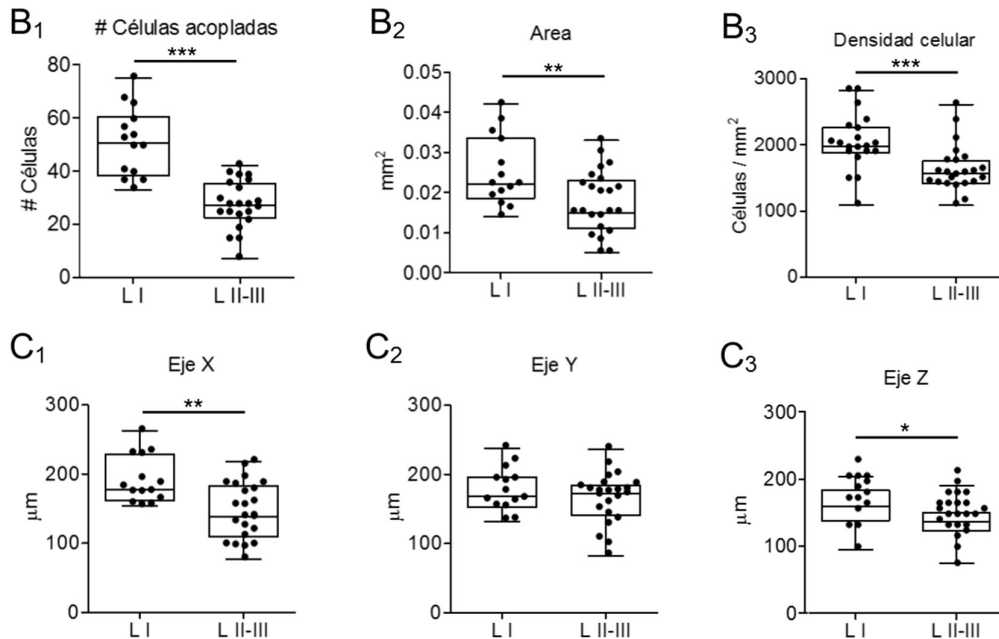
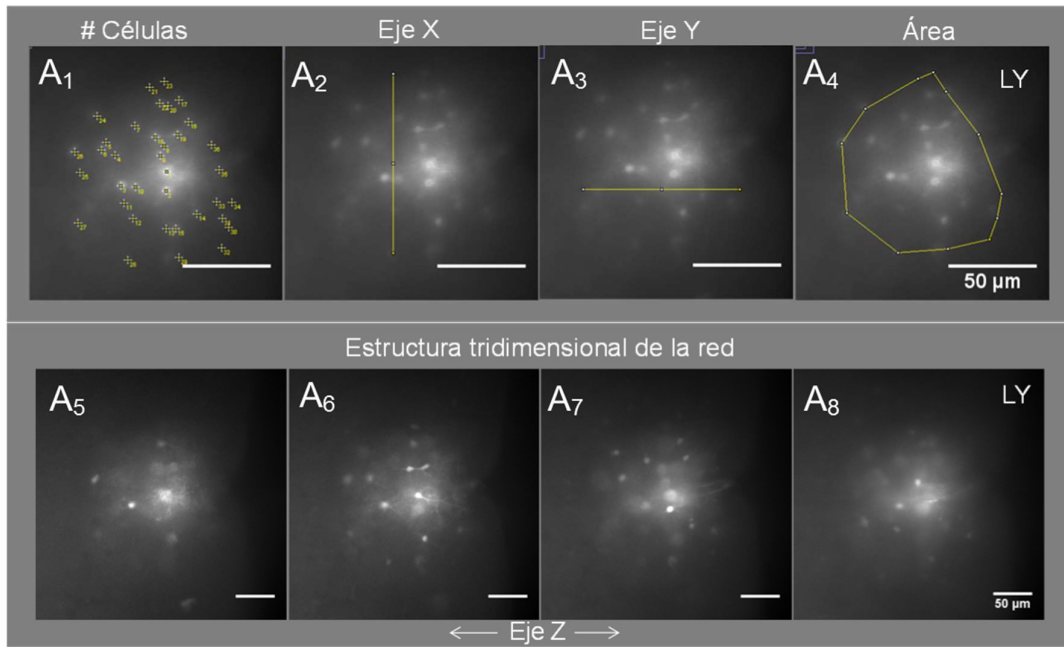


Figura 1.3. Configuración de las redes de acoplamiento astrogial en láminas I y II-III de la corteza motora de la rata. **(A)** Imágenes de un *cluster* representativo y definición de las variables de cuantificación de acoplamiento medidas: Número de células acopladas (A₁), Eje X (A₂), Eje Y (A₃), Área de acoplamiento (A₄) y Eje Z (A₅₋₈). La imagen mostrada en A₁₋₄ consiste en una proyección de máxima intensidad generada a partir de ~20 fotografías obtenidas utilizando un microscopio de fluorescencia convencional abarcando todo el espesor de la rebanada. Las imágenes mostradas en A₅₋₈ fueron obtenidas a 4 profundidades distintas dentro de la rebanada. Barra de escala: 50 μm. **(B)** Cuantificación del acoplamiento en láminas I y II-III. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t de Student a dos colas (B₁ y B₂) y se realizaron mediante la prueba t de Student a dos colas. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001; cada dato corresponde a una red.

Estos resultados indican que las redes de células acopladas presentan distintos patrones de distribución espacial entre dichas láminas, menos extendidas en las láminas II-III en la dirección paralela a la superficie pial, aunque extendidas de manera comparable en dirección perpendicular.

3. *Expresión de conexinas astrogliales en la corteza motora*

Los astrocitos se encuentran acoplados mediante uniones *gap* conformadas principalmente por dos tipos de conexinas: conexina 43 y conexina 30, siendo responsables del acoplamiento que se observa en los experimentos de *dye-coupling* [90]. Para evaluar si las diferencias encontradas en la configuración de las redes de acoplamiento astrogliales en las láminas I y II-III de la corteza motora podrían explicarse por una expresión diferencial de conexinas astrocíticas, se llevó a cabo un estudio inmunohistoquímico comparativo de la densidad de marca de Cx43 y Cx30. Ambas conexinas mostraron un patrón de marcación puntiforme de distribución ubicua en todo el neuropilo cortical, que se vio interrumpido por zonas desprovistas de marca con forma ovoide, compatible con la presencia de cuerpos celulares neuronales, cuya densidad en las láminas II-III es mayor, en comparación con la lámina I (Figura I.4A₁₋₄-B₁₋₄). Además, en todas las láminas se destacó una marcación intensa, con un patrón compatible con la asociación a la pared de algunos vasos sanguíneos, que en ocasiones alcanzó a delimitar su contorno, especialmente en los de mediano y gran calibre (Figura I.4B). Este patrón de marcación peri-vascular similar al de un “panal de abejas”, ha sido descrito con anterioridad y se encuentra asociado a la expresión de estas conexinas en las terminaciones peri-vasculares de los procesos astrogliales [88], [89], [144]. A su vez, tanto Cx43 como Cx30 presentaron una marcación intensa en la superficie cortical, probablemente asociada a la marcación de leptomeninges [88], [89], [144] (Figura I.4A₁-B₁). La densidad de marca en el neuropilo cortical mostró un valor promedio de área marcada por Cx43 ligeramente inferior en la lámina I (~6%) con respecto al observado en las láminas II-III (Figura I.4A₅). Por otra parte, la densidad promedio de marca de Cx30 en las láminas II-III fue casi un 23% menor con respecto al valor de la lámina I (Figura I.4B₅).

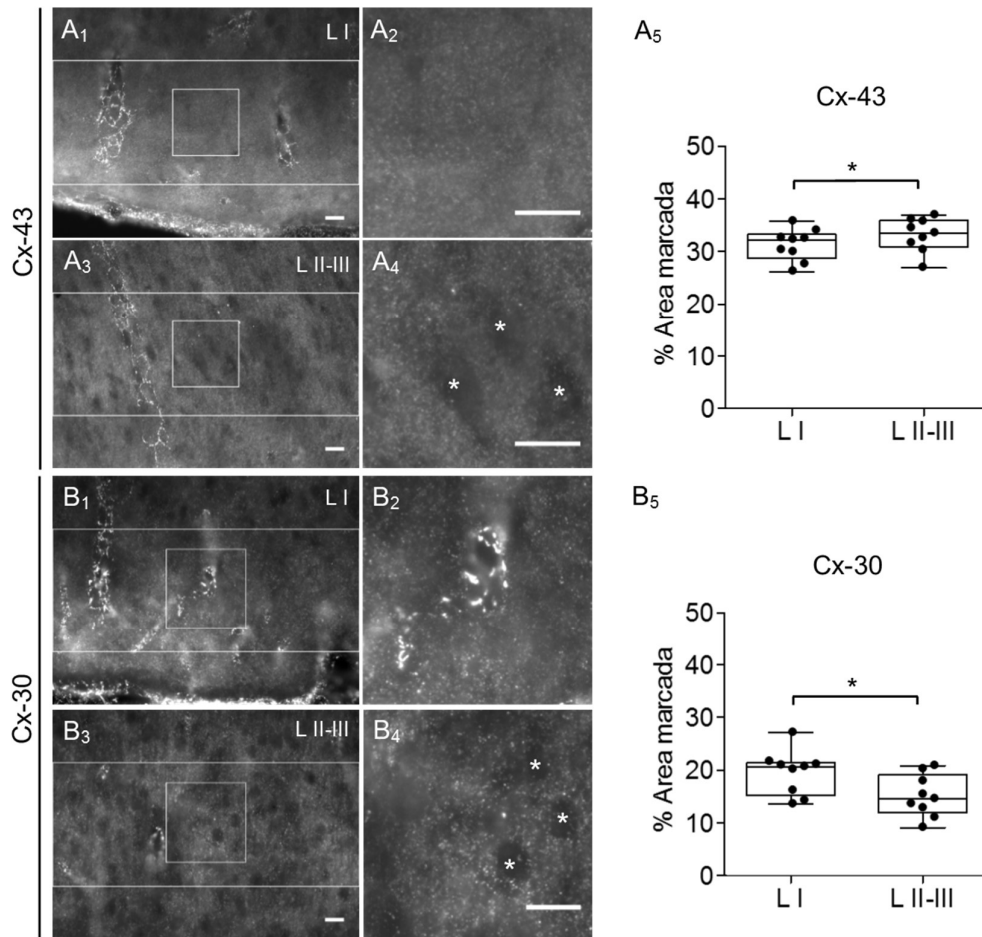


Figura 1.4. Expresión diferencial de conexas astrogliales en láminas I y II-III de la corteza motora. **(A)** Imágenes representativas de la marcación de conexina-43 (A₁₋₄), y gráfico de la comparación estadística de la densidad de marca interlaminar (L I, 31.21 ± 1.013 %; L II-III, 33.1 ± 1.06 %; Prueba t de Student a dos colas, observaciones apareadas: P<0.05, N=9), A₅. **(B)** Imágenes representativas de la marcación de conexina-30 (B₁₋₄), y gráfico de la comparación estadística de la densidad de marca interlaminar (L I, 19.51 ± 1.41 %; L II-III, 15.06 ± 1.334 %; Prueba t de Student a dos colas, observaciones apareadas: P<0.05, N=9), B₅. En A₅ y B₅: *P<0.05. En cada panel: la primera columna (A₁, A₃, B₁, B₃) contiene imágenes panorámicas en donde se indican la unidad de muestreo (rectángulo), y un recuadro (cuadrado), cuyo detalle se muestra ampliado en la columna siguiente (A₂, A₄, B₂, B₄). Las filas superior (A₁-A₂, B₁-B₂) e inferior (A₃-A₄, B₃-B₄), contienen imágenes de láminas I y II-III respectivamente. Asteriscos indican espacios desprovistos de marca probablemente ocupados por cuerpos neuronales (A₄, B₄). Barra de escala: 20 μm.

Estos resultados indican la existencia de un patrón de expresión diferencial para las principales conexas astrogliales en el neuropilo de las láminas I y II-III de la corteza frontal de la rata, más marcado para Cx30, que presenta niveles de expresión más bajos en las láminas II-III, en comparación con la lámina I.

Los datos presentados en este capítulo muestran una organización laminar levemente diferencial de las redes atócíticas de las láminas I y II-III de la

corteza motora. En relación a las de lámina I, las redes de acoplamiento astrogiales de las láminas II-III resultan menos extensas en el plano paralelo a la superficie cortical y presentan una densidad celular más baja. Esto último, probablemente refleje la menor densidad de astrocitos en dichas láminas, la cual fue determinada contabilizando cuerpos celulares inmunomarcados con S100 β .

CAPITULO II

Plasticidad funcional de astrocitos en un modelo de enriquecimiento ambiental

1. Impacto del enriquecimiento ambiental sobre la configuración de las redes de acoplamiento astrogial en la corteza motora de la rata

Los efectos del enriquecimiento ambiental sobre las propiedades de los astrocitos de la corteza cerebral han sido abordados en cuanto a aspectos estructurales [145]. Por ejemplo, se han observado aumentos en el tamaño del núcleo celular, así como en la densidad de marca de la proteína citoesquelética astrogial GFAP en la corteza visual de ratas expuestas a enriquecimiento ambiental durante treinta días luego del destete [30]. A su vez, la implementación de un modelo de enriquecimiento similar provocó un aumento de la cobertura sináptica por parte de los procesos astrogiales periféricos en la corteza visual de ratas expuestas a enriquecimiento ambiental [34]. Es posible que las mejoras en los tiempos de recuperación en modelos de lesión cortical por contusión e isquemia, así como el retraso de la progresión de síntomas en modelos de enfermedades neurodegenerativas, producidos por una exposición a enriquecimiento ambiental, se asocien a plasticidad funcional de las redes de acoplamiento astrogiales en la corteza cerebral, tales como modificaciones en su extensión o geometría. Para evaluar esta hipótesis, debe abordarse en primer lugar el análisis de los efectos del enriquecimiento ambiental sobre la configuración de las redes astrocíticas. Con este fin se analizó el impacto de una exposición a enriquecimiento ambiental sobre la extensión y morfología de las redes de acoplamiento astrogiales, en las láminas I y II-III de la corteza motora de la rata. Para esto, los animales fueron destetados a los 21 días de edad y permanecieron en condiciones estándar o de enriquecimiento ambiental, entre 30 y 45 días (CE₃₀, EA₃₀). Una vez cumplido el tiempo de exposición, se procesaron para la realización de experimentos de *dye-coupling* en rebanadas frescas de cerebro (Figura II.1A). El enriquecimiento ambiental no produjo cambios estadísticamente significativos en los parámetros caracterizados en el capítulo I de esta tesis en cuanto a la morfología de las redes de acoplamiento astrogial en

la lámina I (Figura II.1B). Por otra parte, las redes de las láminas II-III mostraron un área de acoplamiento en promedio un 11.5% mayor en el grupo expuesto a enriquecimiento ambiental, mientras que no se detectaron diferencias en el número de células acopladas (Figura II.1C2).

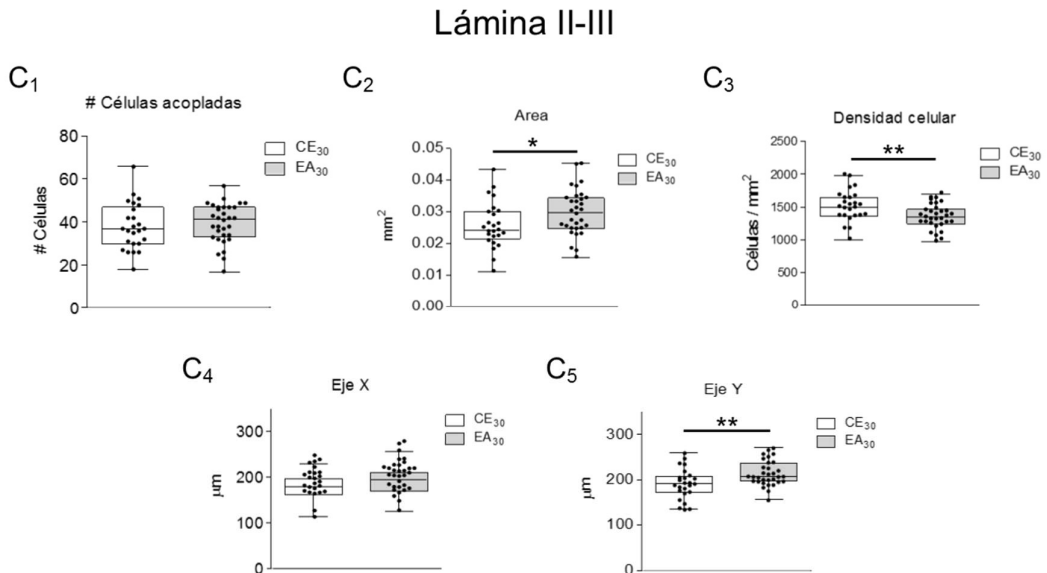
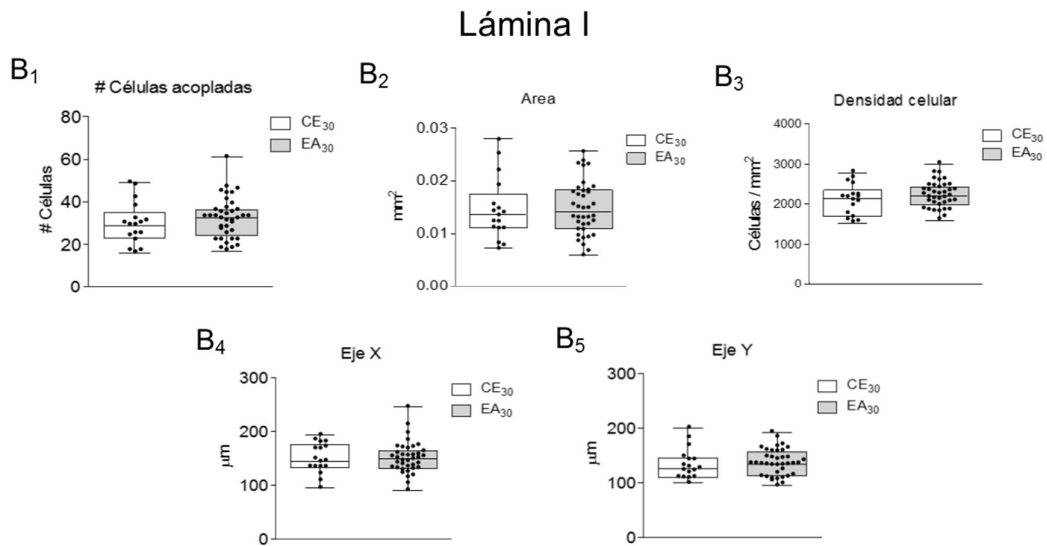
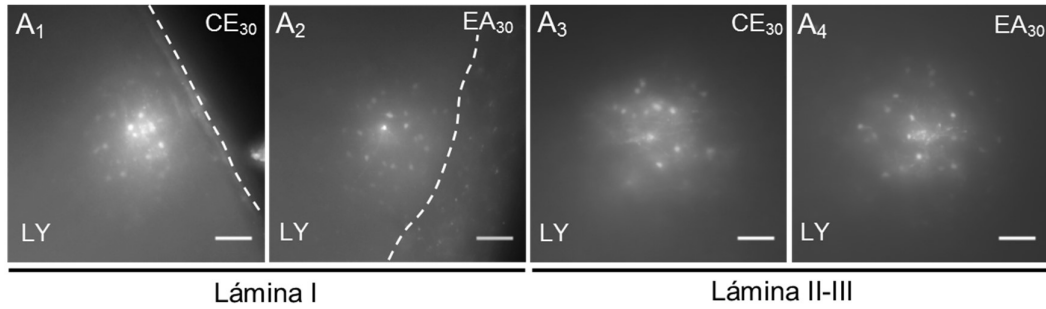


Figura II.1 (página anterior). Impacto de una exposición de 30 días a enriquecimiento ambiental sobre la configuración de las redes de acoplamiento astrogiales en las láminas I y II-III de la corteza motora de la rata. **(A)** Imágenes de redes de acoplamiento astrogial, visualizadas mediante la administración del marcador *lucifer yellow* (LY) en experimentos de *dye-coupling*. Cada imagen consiste en una proyección de máxima intensidad generada a partir de fotografías tomadas cada 5 μm abarcando aproximadamente 100 μm de profundidad de la rebanada. Se muestran imágenes representativas para cada una de las condiciones de ambiente (Condición estándar: CE₃₀; Enriquecimiento ambiental: EA₃₀) y lámina cortical (Lámina I; Lámina II-III). La línea interrumpida delimita la piamadre. Barra de escala: 50 μm . **(B)** Variables características de la extensión y morfología de las redes de acoplamiento astrogiales en función del ambiente (CE₃₀; EA₃₀) en la lámina I. Se muestra número de células acopladas (B₁, P=0.4150), área de acoplamiento (B₂, P=0.9087), densidad celular (B₃, P=0.2499), Eje X (B₄, y P=0.9652) y Eje Y (B₅, P=0.7124). En todas las comparaciones se aplicó una Prueba t de Student a dos colas para muestras independientes. **(C)** Variables características de la extensión y morfología de las redes de acoplamiento astrogiales en función del ambiente (CE₃₀; EA₃₀) en lámina II-III. Estos experimentos no fueron hechos en forma pareada con los de **B** y no son estrictamente comparables. Se muestra número de células acopladas (C₁, P=0.5756), área de acoplamiento (C₂, P<0.05), densidad celular (C₃, P<0.01), Eje X (C₄, P=0.1263) y Eje Y (C₅, P<0.01). Los asteriscos (B, C) indican gráficamente la existencia de diferencias estadísticamente significativas: *P<0.05, **P<0.01.

En sintonía con estos resultados, la densidad celular observada en las redes de las láminas II-III fue en promedio un 10.7% menor en el grupo enriquecido con respecto al control (Figura II.1C₃). A su vez, las redes de las láminas II-III del grupo enriquecido presentaron en promedio una extensión 11.9 % mayor en la dirección perpendicular a la superficie cortical (Eje Y, Figura II.1C₄), mientras que no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la dirección paralela (Eje X), ver Figura II.1C₅. Dado que el número de células en la red no se modifica, estos resultados son consistentes con una expansión del volumen ocupado por estructuras presentes entre los cuerpos celulares astrocíticos (gliopilo) de las láminas II-III como consecuencia del enriquecimiento ambiental. A la luz de los informes que mencionan una disminución en la densidad de neuronas corticales en animales expuestos a enriquecimiento ambiental [146], se realizó un análisis de la densidad de neuronas mediante inmunohistoquímica utilizando el marcador neuronal NeuN, en secciones de tejido de animales expuestos a condiciones estándar o de enriquecimiento ambiental por 30 días luego del destete, para evaluar si el modelo usado en esta tesis se caracteriza por una disminución en la densidad neuronal. El análisis se realizó en las láminas II-III, donde observamos expansión de la red glial. Se observó que el enriquecimiento ambiental no produjo cambios estadísticamente significativos en la densidad de células NeuN+ (CE₃₀ vs EA₃₀; 58 ± 2 células/unidad de muestreo, N=9; 63 ± 2 células/unidad de muestreo, N=9; Prueba t de Student a dos colas para muestras independientes: P=0.1101).

Los efectos producidos por el enriquecimiento ambiental se han registrado luego de un amplio rango de tiempos de exposición. Es interesante notar que algunos de los efectos son transitorios. Por ejemplo, se ha observado un aumento de la tasa de generación de espinas sinápticas en neuronas piramidales de la corteza somatosensorial del ratón, que es marcado a los pocos días de iniciada la exposición al ambiente enriquecido, pero que decae luego de las dos semanas de exposición [121]. Para evaluar si en el modelo usado en esta Tesis ocurren efectos transitorios sobre la configuración de las redes de acoplamiento, que podrían pasar desapercibidos luego de treinta días de exposición, se llevaron a cabo experimentos de *dye-coupling* destinados a evaluar la estructura de las redes luego de diez días de permanencia en la condición estándar o de enriquecimiento ambiental (CE₁₀; EA₁₀). En esta serie de experimentos se obtuvieron registros de astrocitos en todas las láminas para cada individuo, lo cual permitió la realización de un análisis contemplando los factores Ambiente y Lámina (Figura II.2).

En contraste con lo observado luego de una exposición de treinta días a enriquecimiento ambiental, las redes de acoplamiento no sufrieron modificaciones detectables luego de diez días de exposición (Figura II.2B). Los resultados obtenidos no apoyan la idea de que las redes astrogliales responden al enriquecimiento modulando su configuración de manera temprana y transitoria. Por otro lado, el estudio interlaminar de la configuración de las redes arrojó resultados similares a los observados en el capítulo I: las redes de la lámina I presentaron aproximadamente el doble de células que las de las láminas II-III, mientras que el área ocupada también fue mayor, aunque la diferencia no fue tan pronunciada, resultando una densidad celular mayor en las redes de la lámina I (Figura II.2B). Asimismo, se observó un mayor valor de las variables Eje X y Eje Z en la lámina I, mientras que no se detectaron diferencias interlaminares en la extensión de la variable Eje Y (Figura II.2B).

Para evaluar si el efecto producido por los 30 días de exposición a enriquecimiento ambiental sobre la configuración de las redes de acoplamiento astrogliar en las láminas II-III se correlaciona con cambios en la expresión de conexinas astrogliales, se llevó a cabo una evaluación del impacto del enriquecimiento sobre los patrones de expresión de Cx43 y Cx30.

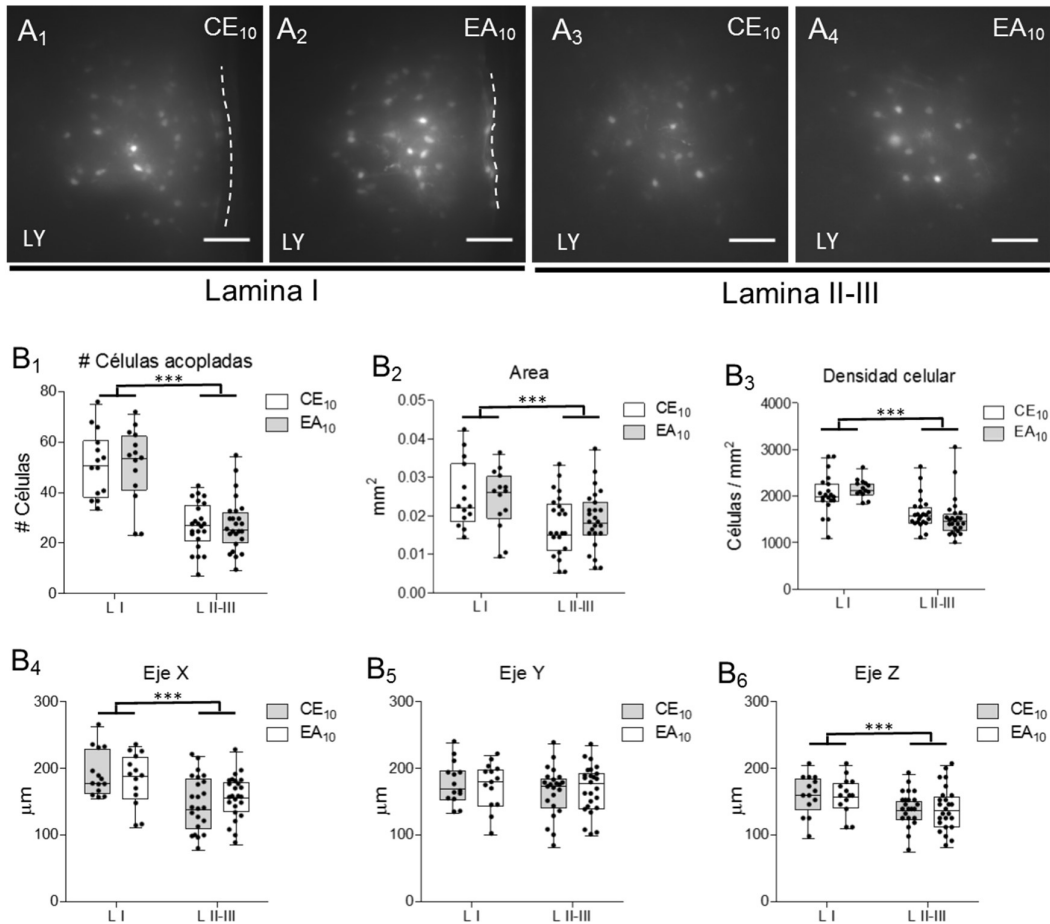


Figura II.2. Impacto de una exposición de 10 días a enriquecimiento ambiental sobre la configuración de las redes de acoplamiento astrogliales en las láminas I y II-III de la corteza motora de la rat. **(A)** Imágenes de redes representativas de células acopladas (LY: *lucifer yellow*) en las láminas I (A₁₋₂), y II-III (A₃₋₄), obtenidas de animales albergados en jaulas estándar, CE₁₀ (A_{1,3}), y de enriquecimiento, EA₁₀ (A_{2,4}), durante 10-20 días con posterioridad a su destete. Cada imagen consiste en una proyección de máxima intensidad generada a partir de fotografías obtenidas tomadas cada 5 μm abarcando aproximadamente 100 μm dl espesor de la rebanada. La línea interrumpida delimita la piamadre (A₁₋₂). Barra de escala: 50 μm (A₁₋₄). **(B)** Variables características de la extensión y morfología de las redes de acoplamiento astrogliales en función del ambiente (CE₁₀; EA₁₀) y lámina cortical (L I; L II-III). Se muestra número de células acopladas (B₁, $P_{(\text{Ambiente} \times \text{Lámina})}=0.9249$; $P_{(\text{Ambiente})}=0.9456$; $P_{(\text{Lámina})}<0.001$), área de acoplamiento (B₂, $P_{(\text{Ambiente} \times \text{Lámina})}=0.5963$; $P_{(\text{Ambiente})}=0.9749$; $P_{(\text{Lámina})}<0.001$), densidad celular (B₃, $P_{(\text{Ambiente} \times \text{Lámina})}=0.4932$; $P_{(\text{Ambiente})}=0.8801$; $P_{(\text{Lámina})}<0.001$, Eje X (B₄, $P_{(\text{Ambiente} \times \text{Lámina})}=0.3123$; $P_{(\text{Ambiente})}=0.9843$; $P_{(\text{Lámina})}<0.001$), Eje Y (B₅, $P_{(\text{Ambiente} \times \text{Lámina})}=0.6968$; $P_{(\text{Ambiente})}=0.9824$; $P_{(\text{Lámina})}=0.2715$) y Eje Z (B₆, $P_{(\text{Ambiente} \times \text{Lámina})}=0.9695$; $P_{(\text{Ambiente})}=0.9197$; $P_{(\text{Lámina})}<0.01$). Estadística: ANOVA de 2 factores; *** $P<0.001$.

En la Figura II.3 se muestra que la densidad de marca de Cx43 no sufrió modificaciones producto de la exposición al enriquecimiento en ninguna de las láminas corticales evaluadas (Figura II.3A). Notablemente, la densidad de marca de Cx30 mostró una disminución estadísticamente significativa en el grupo enriquecido, en las láminas corticales I y II-III (Figura II.3B). Estos resultados indican que el enriquecimiento ambiental modula en forma diferenciada la

expresión de conexinas astrocíticas en la corteza motora de la rata. La disminución de la expresión de Cx30 que observamos, junto con la expansión de las redes, resulta interesante a la luz de un estudio reciente que demuestra que en ratones con deficiencia de Cx30 los astrocitos expanden sus procesos e invaden la brecha sináptica, modulando la fuerza de sinapsis hipocampales [147]. La deficiencia de Cx30 en ratones se ha asociado con un aumento de expresión de los transportadores de glutamato astrocíticos GLT1 y GLAST [148]. GLT1 es el principal transportador de glutamato en astrocitos [149] y limita la excitabilidad sináptica durante la activación sináptica repetida [150]. Notablemente, el aislamiento social en ratas, produce una reducción de la expresión de GLT1 en el hipocampo, que se previene con ejercicio [151]. Con el objeto de evaluar si el enriquecimiento ambiental modula los niveles de expresión de GLT1 en la corteza motora de la rata, se analizó su patrón de marcación mediante inmunohistoquímica en la corteza de animales expuestos a enriquecimiento durante 30 días. Las imágenes obtenidas mostraron un patrón de marcación similar al descrito por otros autores [152] (Figura II.3C). El análisis de la densidad de marca no detectó interacción estadística significativa entre los factores Ambiente y Lámina ($P=0.3779$). Además, el enriquecimiento ambiental no produjo cambios mensurables en la densidad de marca de GLT1 en el neuropilo cortical (efecto principal Ambiente: $P=0.4641$). Por otra parte, la densidad de marca de GLT1 fue un 14.3% mayor en las láminas II-III con respecto a la lámina I (efecto principal Lámina: $P<0.01$, ver Figura II.3C). Las redes astrocíticas tienen funciones de amortiguación de la concentración de potasio extracelular [90] que involucran comunicación con la vasculatura vía los pies astrocíticos terminales [82]. Un trabajo reciente muestra que la superficie de cobertura de los vasos por los pies terminales astrocíticos puede experimentar plasticidad: en un modelo de hipoperfusión cerebral en ratones, los pies terminales se retraen de los vasos del cuerpo calloso y este cambio puede prevenirse por exposición a enriquecimiento ambiental [153]. Los pies terminales pueden ser identificados por la localización de proteínas de membrana características de estos compartimientos, tales como el canal de potasio Kir4.1 y acuaporina 4 (AQP-4) [154].

Para evaluar si el modelo usado en esta tesis puede inducir plasticidad estructural a nivel de los pies terminales astrocíticos, se evaluó la expresión de

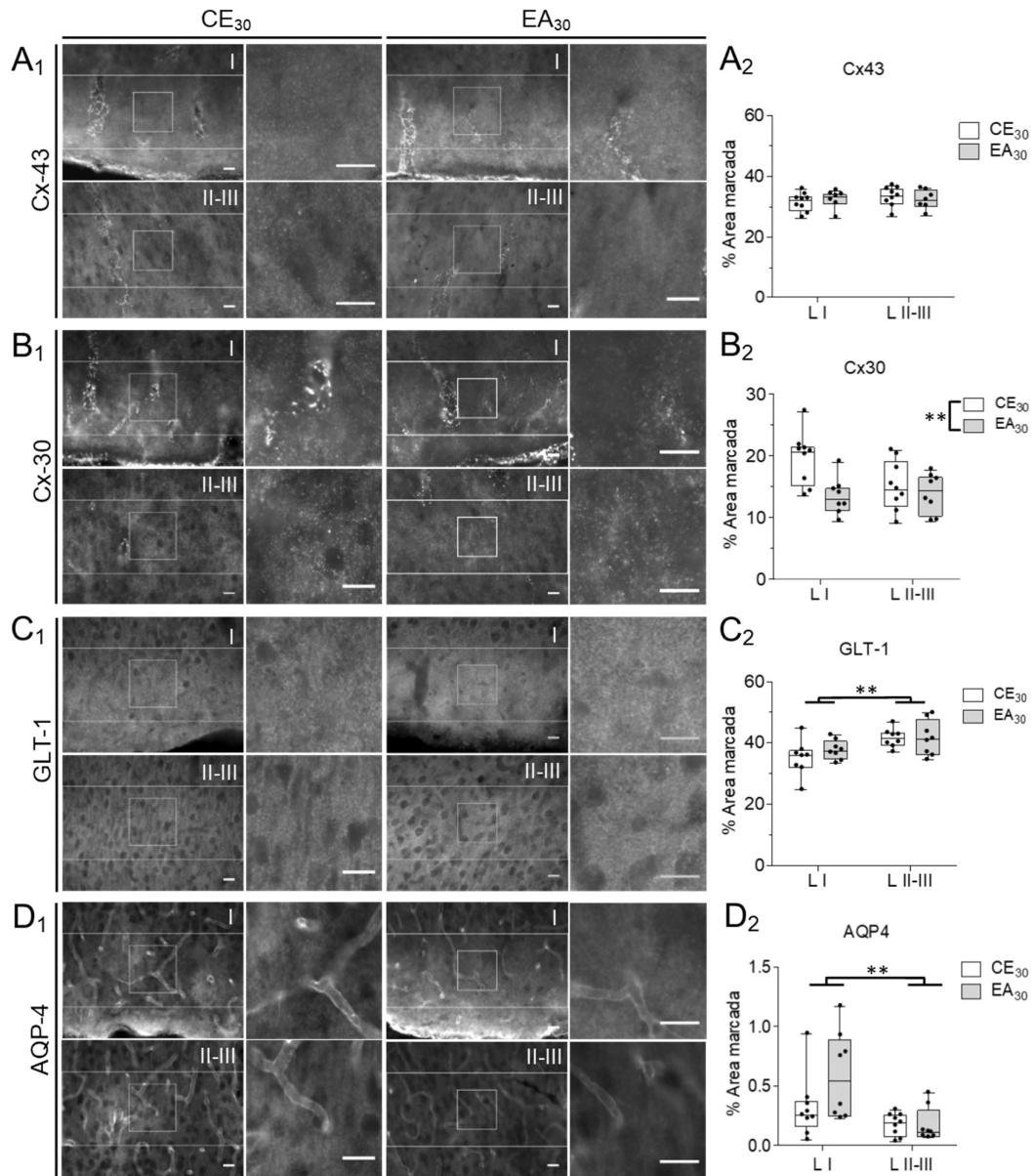


Figura II.3. Impacto del enriquecimiento ambiental (30 días) sobre los patrones de marcación de las conexinas astrogiales Cx43 (A), Cx30 (B), del transportador de glutamato astrogial GLT1 (C), y de la acuaporina astrogial AQP-4, en las láminas superiores de la corteza cerebral de la rata. Para cada marcador (A-D) se muestra una imagen representativa correspondiente a animales alojados en condición estándar (izquierda, CE₃₀) y de enriquecimiento ambiental (derecha, EA₃₀), mostrando la región en dónde se realizó el muestreo aleatorio (rectángulo) y un recuadro (cuadrado), cuyo detalle se muestra ampliado en la imagen contigua. Para cada marcador se muestran también imágenes representativas de cada lámina cortical (arriba, lámina I; abajo, lámina II-III). Los gráficos (A₂, B₂, C₂, D₂) muestran los valores de porcentaje de área marcada por cada anticuerpo; ANOVA de 2 factores (Ambiente: CE₃₀ vs EA₃₀; Lamina: L I vs L II-III); **P<0.01. Barra de escala: 20 μm.

AQP-4 mediante inmunohistoquímica en las láminas I y II-III de la corteza motora de animales control y expuestos a 30 días de enriquecimiento ambiental. La

marca de AQP-4 mostró un patrón compatible con estrecha asociación a la pared de los vasos sanguíneos de diverso diámetro presentes en el parénquima cortical (Figura II.3D). El análisis de la densidad de marca de AQP-4 no detectó interacción estadísticamente significativa entre los factores Ambiente y Lamina ($P=0.1479$) ni efecto principal significativo del enriquecimiento ($P=0.2110$), mientras que el porcentaje de área marcada en la lámina I fue mayor que en las láminas II-III ($P<0.01$), ver Figura II.3D.

Los resultados indican que GLT1 y AQP-4 tienen expresión laminar diferencial y que sus niveles de expresión no serían sensibles al enriquecimiento ambiental descrito en esta Tesis.

Con el fin de comparar el modelo de enriquecimiento ambiental usado en nuestro trabajo con otros modelos descritos en la literatura, se analizó su impacto sobre los patrones de expresión de marcadores inmunohistoquímicos que son sensibles al enriquecimiento ambiental en otros modelos. Para esto, se evaluó el marcador neuronal pre-sináptico sinaptofisina (Syn), cuyo nivel de expresión ha mostrado un aumento en la región anterior del cerebro del ratón (incluyendo la corteza frontal), luego de una exposición a enriquecimiento ambiental por treinta días luego del destete [13], así como en la corteza frontal e hipocampo de ratas y ratones expuestos a enriquecimiento ambiental en la edad adulta [155], [156]. La marcación de sinaptofisina fue de tipo puntiforme, con distribución uniforme a lo largo del neuropilo cortical, interrumpida en zonas consistentes con la presencia de cuerpos celulares (Figura II.4A), y se analizó de modo similar al utilizado para las marcaciones de conexinas y GLT1 (ver Figura M.3). El análisis no mostró indicios de interacción estadística significativa entre los factores Ambiente y Lámina ($P=0.7823$). Inesperadamente, el enriquecimiento ambiental no indujo cambios detectables sobre la densidad de marca de SYP ($P=0.4784$). Por otro lado, el porcentaje de área marcada por SYP fue un 14.2% mayor en las láminas II-III con respecto al valor obtenido en la lámina I ($P<0.001$, ver Figura II.4A). En paralelo a los cambios encontrados a nivel de la anatomía microscópica cortical, numerosos reportes han descrito un menor aumento de peso en los animales expuestos a enriquecimiento, en comparación a los controles en jaulas estándar [157], [158]. Este fenómeno ha sido asociado a diferencias en la facilidad de acceso a las fuentes de alimento y agua, a

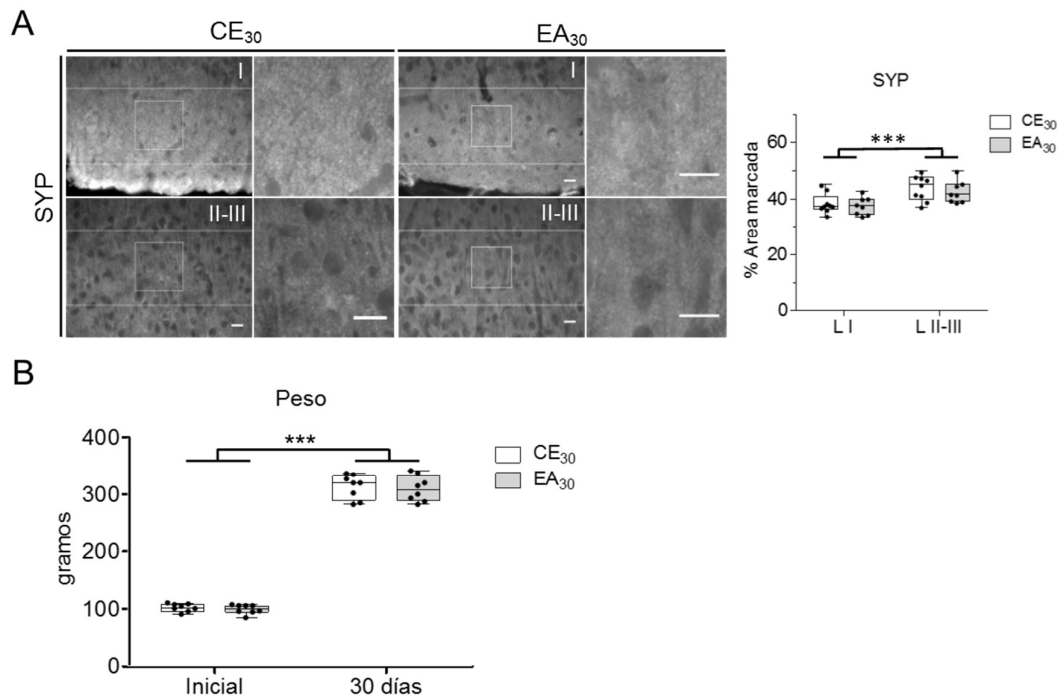


Figura II.4. Impacto del modelo de enriquecimiento ambiental (30 días) sobre marcadores reportados como sensibles al enriquecimiento. **(A)** Impacto del enriquecimiento ambiental sobre la expresión del marcador neuronal pre-sináptico sinaptofisina, SYP. Se muestra una imagen representativa correspondiente a animales alojados en condición estándar (izquierda, CE₃₀) y de enriquecimiento ambiental (derecha, EA₃₀), mostrando la región en dónde se realizó el muestreo aleatorio (rectángulo), y un recuadro (cuadrado), cuyo detalle se muestra ampliado en la imagen contigua. Se muestran también imágenes para cada lámina cortical (arriba, lámina I; abajo, lámina II-III). El gráfico muestra el porcentaje de área marcada; ANOVA de 2 factores (Ambiente: CE₃₀ vs EA₃₀; Lamina: L I vs L II-III). **(B)** Gráfico mostrando el peso de los animales al momento del destete y luego de 30 días de exposición a condiciones estándar o de enriquecimiento ambiental; ANOVA de 2 factores (Tiempo: inicial vs 30 días; Ambiente: CE₃₀ vs EA₃₀); N=8 animales. Diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales: ***P<0.001. Barra de escala: 20 μ m.

diferencias en los niveles de actividad física, o incluso a diferencias en la complejidad de las relaciones sociales entre los individuos, entre las condiciones estándar y de enriquecimiento [158].

Para analizar el impacto del enriquecimiento ambiental usado en esta Tesis sobre la ganancia de peso de los animales, se obtuvieron mediciones del peso de las ratas al momento del destete y luego de 30 días de exposición a cada condición ambiental (ver Figura II.4B). Como era esperable, el peso promedio de los animales mostró un aumento significativo luego de treinta días de permanencia tanto en condiciones estándar como de enriquecimiento ambiental ($P_{\text{Tiempo}} < 0.001$, Figura II.4B). A su vez, la interacción estadística entre los factores Tiempo y Ambiente no fue significativa ($P_{\text{Interacción}} = 0.9213$, Figura II.4B), lo cual

indica que el peso promedio de los animales en ambas condiciones ambientales fue similar tanto al inicio como luego de los treinta días de exposición ($P_{\text{Ambiente}}=0.165$, Figura II.4B). Se desprende de este análisis, que el modelo de enriquecimiento ambiental implementado no tuvo impacto sobre la tasa de ganancia de peso de los animales, luego de treinta días de exposición.

2. *Modulación aguda de las redes de acoplamiento astrogial por exposición a variables fisicoquímicas.*

La conectividad de las redes de acoplamiento astrogial es modulable por la actividad neuronal subyacente [159]. En este sentido, estudios en cultivos celulares han demostrado aumentos en el número de células acopladas como consecuencia del aumento en la concentración extracelular de productos de la actividad neuronal como potasio o glutamato [98], [99]. Los efectos del potasio también han sido demostrados en rebanadas de cerebro del bulbo olfatorio, en las que el número de astrocitos acoplados por *dye-coupling* aumenta aproximadamente un 40% cuando se aumenta la concentración de potasio extracelular de 3 a 6 mM [95].

Dado que en nuestros experimentos el enriquecimiento tuvo efecto indetectable sobre la configuración de las redes astrogiales de la lámina I de la corteza motora, nos propusimos poner a prueba su capacidad de responder a un aumento agudo de la concentración de potasio *ex vivo*. Para esto, se realizaron experimentos de *dye-coupling* en rebanadas cerebrales de animales criados en condiciones estándar durante 30-60 días luego del destete (p51-p80).

Los resultados mostraron que ni el número de células acopladas ni el área de las redes de la lámina I difirió entre los experimentos realizados con baja (2.5 mM) o alta (10 mM) concentración extracelular de potasio (Figura II.5A). Sin embargo, se observó una disminución estadísticamente significativa del 8.6% en la densidad celular de las redes en presencia de la alta concentración de potasio, que fue acompañada por un aumento significativo del 10.9% en su extensión, en la dirección paralela a la superficie cortical (Eje X, ver Figura II.5A).

Los registros electrofisiológicos obtenidos en simultáneo con los datos de *dye-coupling* permitieron documentar una despolarización significativa del V_m astrogliol (Figura II.5B₁) así como una marcada caída en los valores de R_m (Figura II.5B₂) como consecuencia de la exposición a la solución extracelular con potasio elevado. Experimentos adicionales demostraron que los efectos del potasio sobre los parámetros eléctricos de membrana fueron de naturaleza reversible, sin que se observaran cambios en la resistencia de acceso, poniendo de manifiesto la integridad de las células durante el experimento y la calidad del registro, respectivamente (Figura II.5C).

Se ha descrito dependencia con la temperatura para las mediciones de algunas variables fisiológicas. Por ejemplo, la frecuencia y duración de los aumentos transitorios espontáneos en la concentración intracelular de calcio en astrocitos corticales registrados en rebanadas son mayores a temperatura fisiológica que a temperatura ambiente [160]. La temperatura ambiente presenta un desvío importante con respecto a la temperatura fisiológica de los animales homeotermos y podría generar una condición en la que ciertos fenómenos que ocurren *in vivo* pasen desapercibidos, o incluso modelar una condición de hipotermia.

En el contexto anterior, se llevaron a cabo experimentos a los fines de determinar el efecto de un incremento de la temperatura del baño sobre la conectividad de las redes de acoplamiento astrogliol corticales en la lámina I. El incremento de la temperatura del baño de 20-24°C a 32-34°C no produjo cambios significativos sobre las variables de acoplamiento medidas en las redes de astrogliol (Figura II.5A). A su vez, no hubo interacción entre los factores potasio y temperatura, indicando que el trabajo a temperatura cercana a la fisiológica no produjo desenmascaramiento de efectos de la elevación del potasio extracelular que pudieran haber pasado desapercibidos al trabajar en condiciones de hipotermia (Figura II.5A).

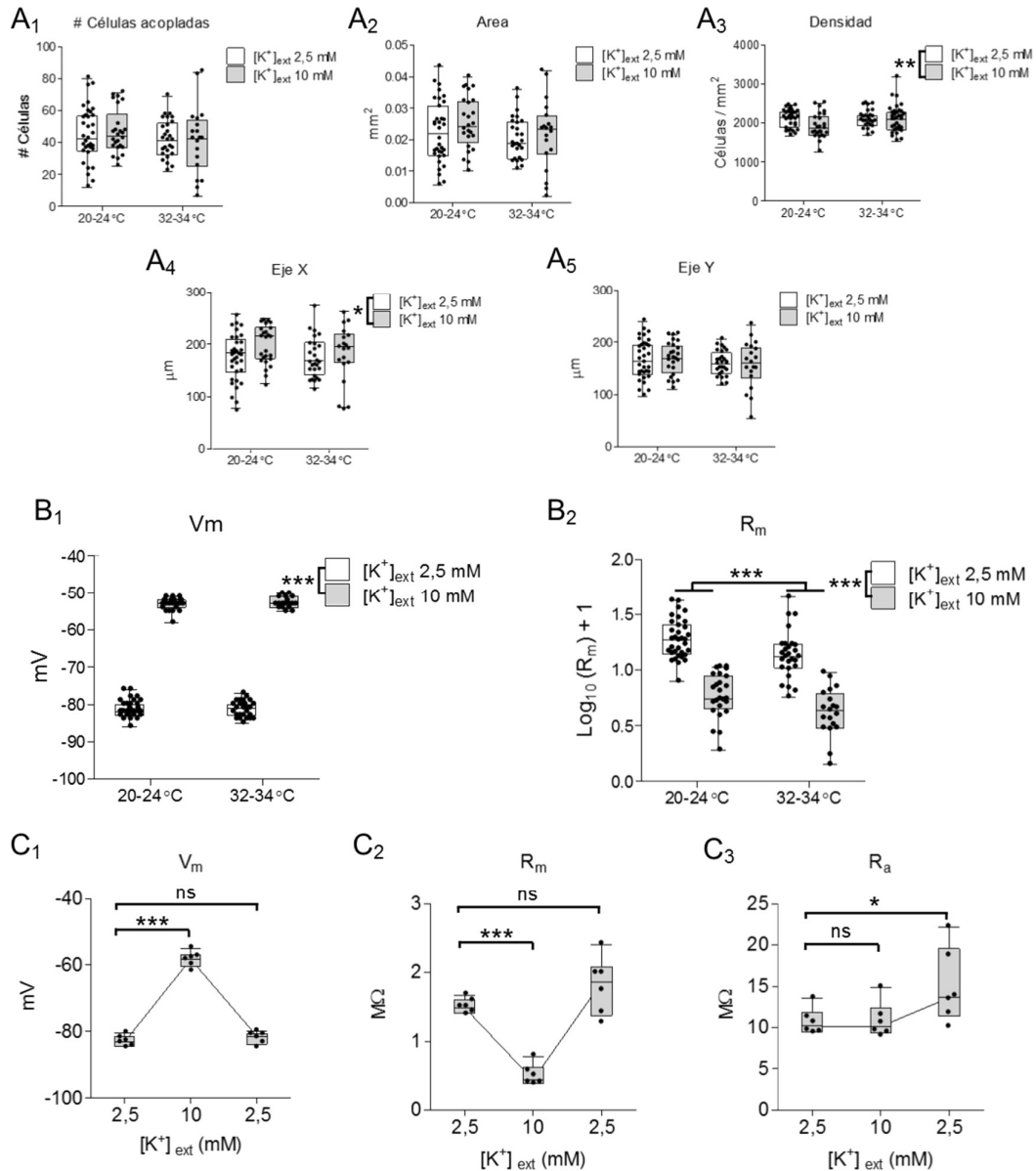


Figura II.5. Modulación del acoplamiento de las redes y propiedades de la membrana de astrocitos de la lámina I por la concentración extracelular de potasio y la temperatura. **(A)** Variables características de la configuración de las redes, en función de la temperatura del baño (20-24°C vs 32-34°C) y de la concentración de potasio extracelular (2,5 vs 10 mM), en la lámina I. Se muestra: número de células acopladas (A₁, $P_{(\text{Potasio} \times \text{Temperatura})} = 0.9355$; $P_{(\text{Potasio})} = 0.6919$; $P_{(\text{Temperatura})} = 0.3251$), área de acoplamiento (A₂, $P_{(\text{Potasio} \times \text{Temperatura})} = 0.7884$; $P_{(\text{Potasio})} = 0.1444$; $P_{(\text{Temperatura})} = 0.2193$), densidad celular (A₃, $P_{(\text{Potasio} \times \text{Temperatura})} = 0.5213$; $P_{(\text{Potasio})} < 0.01$; $P_{(\text{Temperatura})} = 0.5738$), Eje X (A₄, $P_{(\text{Potasio} \times \text{Temperatura})} = 0.4934$; $P_{(\text{Potasio})} < 0.05$; $P_{(\text{Temperatura})} = 0.4289$), Eje Y (A₅, $P_{(\text{Potasio} \times \text{Temperatura})} = 0.9657$; $P_{(\text{Potasio})} = 0.7179$; $P_{(\text{Temperatura})} = 0.2995$); ANOVA de 2 Factores. **(B)** Valores de V_m (B₁) y $\text{Log}_{10}(R_m) + 1$ (B₂) astrogliales en función de la concentración extracelular de potasio (2,5 vs 10 mM) y la temperatura del baño (20-24°C vs 32-34°C). Para V_m : $P_{(\text{Potasio} \times \text{Temperatura})} = 0.6154$; $P_{(\text{Potasio})} < 0.001$; $P_{(\text{Temperatura})} = 0.6872$; para $\text{Log}_{10}(R_m) + 1$: $P_{(\text{Potasio} \times \text{Temperatura})} = 0.9184$; $P_{(\text{Potasio})} < 0.001$; $P_{(\text{Temperatura})} < 0.001$; ANOVA de 2 Factores. **(C)** Valores de V_m (C₁), R_m (C₂), y R_a (C₃) en función de cambios agudos en la concentración extracelular de potasio. ANOVA de 1 Factor con medidas repetidas y comparación múltiple de Dunnet; los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Mientras que los valores de V_m no sufrieron cambios, los valores de R_m mostraron una disminución significativa al incrementarse la temperatura del baño, aunque de menor magnitud que la provocada por el incremento en la concentración extracelular de potasio (Figura II.4B). La ausencia de interacción entre el efecto de la temperatura y el de la concentración de potasio sobre la R_m sugiere que estas manipulaciones operan sobre efectores diferentes.

En conjunto, los datos presentados en este capítulo muestran que el paradigma de enriquecimiento ambiental utilizado produce un efecto moderado de expansión de las redes astrogiales de las láminas II-III en dirección perpendicular al plano de las láminas, que se acompaña de una reducción en la expresión de Cx30 que abarca tanto la lámina I como las láminas II-III. Llamativamente, estos efectos no se acompañaron de otros reportados en la literatura, tales como el aumento de la densidad de marca para sinaptofisina o la menor ganancia de peso de los animales. Esto sugiere que al menos algunos marcadores gliales son suficientemente sensibles a este paradigma de enriquecimiento que resulta subumbral para otros indicadores.

DISCUSIÓN

En las últimas décadas se ha acumulado evidencia contundente en favor de la idea de que para comprender mecanismos subyacentes al funcionamiento del sistema nervioso, incluyendo los que son la base de procesos cognitivos complejos, debe tenerse en cuenta a los astrocitos como elemento participante del procesamiento de información. Por ejemplo, la disrupción de la liberación vesicular en astrocitos de ratones *in vivo* produce un desempeño pobre en una tarea de reconocimiento de objetos nuevos y reduce la potencia de las oscilaciones gamma en el electroencefalograma cortical [161].

Si bien se han descrito múltiples mecanismos por los cuales los astrocitos pueden participar en el procesamiento de información en los circuitos neurales, uno de los mecanismos más explorados es su capacidad de formar redes conectadas mediante conexinas [90]. Por ejemplo, la eliminación de Cx43 de los astrocitos impide la potenciación de larga duración en la corteza somatosensorial de ratones en respuesta a la estimulación de vibrisas y empobrece su desempeño en tareas de exploración [162].

La configuración de las redes astrogliales es susceptible de plasticidad, tanto a nivel de la expresión como de la permeabilidad de conexinas. Se ha reportado que la expresión de Cx43 se encuentra reducida en la corteza orbitofrontal de pacientes con depresión y/o alcoholismo [163]. Por otra parte, en rodajas agudas de cerebro como las usadas en esta Tesis se ha mostrado que la extensión de redes astrogliales se amplía en presencia de señales producidas por la actividad neuronal [92], [95]. Sin embargo, no existen reportes que demuestren modulación de la configuración de las redes astrogliales como resultado de la experiencia conductual.

En esta Tesis se llevó a cabo un estudio del impacto del enriquecimiento ambiental post-destete sobre la configuración de las redes de acoplamiento astrogliales en las láminas superiores de la corteza motora de la rata por medio de experimentos de *dye-coupling* en rebanadas.

Fue necesaria una caracterización de las diferencias interlaminares constitutivas que reveló que las redes de astrocitos acoplados en la lámina I presentaron un área de acoplamiento más extensa e involucraron un mayor número de células que los de las láminas II-III. Al mismo tiempo presentaron una mayor densidad celular, lo cual probablemente refleja una diferencia intrínseca en la densidad de astrocitos entre tales láminas, ya que también se observó una mayor densidad de células inmunoreactivas al marcador astrogial S100 β en la lámina I.

En línea con nuestras observaciones, se han documentado diferencias en la densidad de empaquetamiento de los astrocitos de las láminas I y II-III en diversas áreas de la corteza cerebral de roedores, mediante la implementación de diversas metodologías, entre las que se destaca la cuantificación de células que capturan el marcador vital glial SR101 utilizando microscopía de dos fotones *in-vivo*, en las áreas frontal y parietal de la corteza cerebral de ratas y ratones [68], [112], [114]. También se ha confirmado mediante la cuantificación de astrocitos identificados por su morfología empleando técnicas de impregnación metálica y azul de toluidina en secciones fijadas, y por la cuantificación de perfiles astrogiales bajo microscopía electrónica, en las regiones occipital y parietal de la corteza cerebral de la rata [164]–[166].

Además de presentar diferencias en la densidad celular, nuestros resultados muestran que las redes de acoplamiento astrogiales de la lámina I presentaron una elongación preferencial en la dirección paralela a la superficie cortical, mientras que los de las láminas II-III lo hicieron en sentido perpendicular. Un estudio similar en la corteza frontal del ratón [131] encontró que las redes de acoplamiento marcadas con el trazador biocitina en la lámina I también presentaron una elongación preferencial en la dirección paralela a la superficie cortical. En contraste con nuestras observaciones, los autores describieron un fenómeno similar en las láminas II-III, que puede deberse a que la biocitina presenta mayor permeabilidad a través de las uniones *gap* que el LY utilizado en nuestros experimentos [167], [168], así como al mayor tiempo de duración de la sesión de registro (20 vs 10 min.), lo cual en conjunto puede haber permitido que la difusión del trazador haya enfrentado condiciones no reproducidas por nuestra preparación. Por otro lado, este estudio usó ratones juveniles (p9-11), por lo que

las discrepancias observadas en la morfología de las redes astrogiales de las láminas II-III podrían atribuirse a diferencias interespecíficas o del estadio del desarrollo.

En la corteza somatosensorial del ratón, las redes de acoplamiento astrogiales de los barriles muestran mayor extensión en la dirección perpendicular a la superficie cortical, lo cual fue considerado evidencia de la asociación entre la red de acoplamiento astrogial y los dominios funcionales neuronales [96], [169]. Podemos especular que la morfología extendida en la dirección perpendicular a la superficie cortical que presentaron las redes de acoplamiento astrogiales de láminas II-III en nuestros experimentos está relacionada con la existencia de dominios funcionales columnares en esta lámina de la corteza motora. Si bien no es robusta la evidencia anatómica de una organización columnar en la corteza motora [170], estudios funcionales recientes muestran una organización topográfica de la codificación de parámetros cinemáticos por neuronas de la corteza motora [140] y una organización columnar de las conexiones inhibitorias sobre neuronas piramidales en esta corteza [141].

En nuestros resultados, la gran mayoría de las células acopladas (96%) presentó clara asociación con la marca de GFAP (Figura I.2), evidenciando que casi la totalidad de las células acopladas eran astrocitos. Las células que no presentaron clara asociación con la marcación de GFAP pueden haber sido astrocitos con niveles de expresión de esta proteína muy bajos [86], o bien oligodendrocitos maduros, cuya capacidad de formar uniones gap permeables a *lucifer yellow* con células astrogiales ha sido demostrada en láminas inferiores de la corteza cerebral y en la sustancia blanca subcortical [171]. Por otra parte, la presencia de astrocitos no acoplados dentro del dominio espacial de una red (células GFAP⁺/LY⁻) no pudo ser evaluada dado que la marca de GFAP se localiza en los procesos astrocíticos y dificulta la identificación de los somas asociados. Una alternativa futura será el uso de marcadores astrocíticos somáticos, como S100 β , para poder evaluar la existencia de redes de acoplamiento astrogiales selectivas [159], conformadas por subgrupos de la población astrogial en una determinada región, como han sido descritas en el hipocampo [131], en los barriles de la corteza somatosensorial [96] y en el bulbo olfatorio [95] del ratón.

En nuestros experimentos, el estudio de la distribución de las principales conexas astrogiales, Cx43 y Cx30, en las láminas I y II-III, demostró una mayor densidad de marca de Cx43 en las láminas II-III, mientras que los niveles de Cx30 fueron mayores en la lámina I (Figura I.4). Los resultados obtenidos para la distribución de Cx43 contrastan con observaciones previas indicando una mayor expresión en la lámina I en comparación con las láminas II-III en la corteza frontal del ratón [131], y en la parietal y occipital de la rata [88], [172]. Sin embargo, a diferencia de estos trabajos, el procedimiento aplicado en nuestros experimentos estuvo dirigido a la cuantificación de la marca de tipo puntillado distribuida en el neuropilo, omitiendo la inclusión de la marca intensa asociada a los procesos astrogiales perivasculares. En este sentido, los mayores niveles de densidad de Cx43 reportados en la lámina I pueden haberse debido a la abundante marca que existe entorno a los grandes vasos sanguíneos que ingresan al parénquima cortical desde la superficie cerebral (Figura I.4).

Si bien la difusión de trazadores en experimentos de *dye-coupling* queda abolida cuando se elimina la expresión de Cx43 y Cx30 en astrocitos por métodos genéticos [90], no es esperable una correlación fuerte entre la extensión de las redes y los niveles de expresión de conexas. En primer lugar, debido a que la Cx43 astrogial abocada a la formación de uniones *gap* intercelulares representa una fracción del total, ya que otras fracciones participan en la formación de uniones *gap* auto-celulares [173] y en funciones de adhesión y señalización independientes de la formación de canales [174], [175]. En segunda instancia, debido a que la extensión de las redes astrogiales depende de la permeabilidad relativa de las conexas disponibles al trazador usado. En nuestro caso, se usó el trazador *lucifer yellow*, que difunde a través de Cx43, pero lo hace de forma muy reducida o nula a través de Cx30 [176].

Nuestro trabajo aporta evidencia novedosa de que las diferencias halladas en la citoarquitectura interlaminar astrogial reportadas en la literatura presentan un correlato a nivel funcional, al observarse que las redes de acoplamiento astrogiales en la lámina I presentan una mayor densidad celular que en las láminas II-III. Estos resultados aportan evidencia acerca de la heterogeneidad estructural y funcional que pueden presentar las redes astrogiales en diferentes láminas de una misma área cortical [177].

Además de la mayor densidad celular, el tamaño de las redes astrogliales en la lámina I también fue mayor. Si se asume que la difusión a través de las uniones *gap* constituye el factor limitante principal para la difusión de LY entre las células acopladas [178], entonces se desprendería de nuestras observaciones que la eficiencia del acoplamiento sería mayor en lámina I, aunque resta evaluarlo en forma directa.

Cabe preguntarse si la mayor densidad de astrocitos observada en la lámina I, que se encuentran funcionalmente conectados, como indican nuestros experimentos, tiene implicancias fisiológicas en relación con la función de circuitos corticales. Una de las principales funciones atribuidas a los astrocitos protoplasmáticos en el sistema nervioso es la de captación de potasio del espacio extracelular [81]. El acoplamiento astrogliial establece una red celular que favorece la captación de potasio en sitios de concentración elevada de potasio extracelular, generalmente asociados a zonas de elevada actividad neuronal, y la liberación de potasio en zonas distantes, de baja concentración extracelular de potasio [179], [180]. Una mayor eficiencia del acoplamiento, así como un mayor número de astrocitos acoplados en red, optimizaría el mecanismo de amortiguación de la concentración de potasio extracelular [181]. Resta evaluar, mediante estudios futuros, si la mayor densidad celular en las redes de la lámina I responde a diferentes demandas asociadas a los patrones de actividad sináptica interlaminares. En este sentido, resultará valioso el aporte de futuros experimentos diseñados para estudiar el grado de asociación entre las diferencias interlaminares encontradas en el componente astrogliial y los patrones interlaminares de actividad de los circuitos neuronales subyacentes.

Con la intención de poner a prueba la capacidad de modulación aguda de la eficiencia del acoplamiento astrogliial se evaluó el impacto de una elevación de la concentración extracelular de potasio sobre la magnitud del acoplamiento en experimentos de *dye-coupling*. En contraste con lo reportado en cultivos celulares astrogliales así como en rebanadas del bulbo olfatorio del ratón, el aumento del potasio extracelular no produjo aumentos en el número de células acopladas ni en el área de acoplamiento, descartándose un impacto sobre la eficiencia del acoplamiento. En este contexto, la observación de una leve expansión significativa de las redes en la dirección paralela a la superficie cortical (Figura

II.5A₄), podría interpretarse en términos de un efecto osmótico, como consecuencia de la incorporación de agua en los astrocitos, inherente al proceso de captación de potasio extracelular [179]. Mediante el empleo de líneas transgénicas anulando la expresión de Cx43 o Cx30, un estudio ha informado que el aumento de la eficiencia del acoplamiento luego de una elevación de la concentración extracelular de potasio de 3 a 6 mM en el bulbo olfatorio del ratón fue dependiente de la expresión de Cx30 y no de Cx43 [95]. Esto podría explicar la falta de efecto en nuestros experimentos debido a la ya mencionada muy baja permeabilidad del LY a través de las uniones *gap* conformadas por Cx30 [176]. Experimentos complementarios utilizando un marcador de acoplamiento permeable a Cx30 como por ejemplo sulforhodamina-B, o biocitina, permitirán analizar la existencia de un efecto del potasio extracelular sobre la eficiencia del acoplamiento astrogliar dependiente de una acción sobre Cx30. Alternativamente al aumento generalizado de potasio del baño extracelular empleado en nuestros experimentos, una liberación focalizada mediante el empleo de una micropipeta, permitirá estudiar el efecto en función de una elevación de potasio restringida espacial y temporalmente, análoga a la que ocurre durante la actividad sináptica, que también podrá emularse mediante estimulación eléctrica de terminales locales.

A su vez, resulta interesante que la eficiencia del acoplamiento no sufrió modificaciones al aumentarse la temperatura del baño desde los 20-24°C hasta los 32-34°C (Figura II.5A). Estos resultados contrastan con la disminución en la frecuencia y duración de las oscilaciones intracelulares de calcio registradas en astrocitos en rebanadas neocorticales de ratón y en cultivos celulares astrogliales [160], ante manipulaciones similares, indicando una diferencia en la dependencia con la temperatura entre el acople por uniones *gap* y la actividad de calcio. Además, no se registró interacción entre los factores potasio y temperatura, lo cual sugiere que la ausencia de efecto del potasio sobre la eficiencia del acoplamiento no se debe al trabajo en condiciones no fisiológicas de temperatura.

El modelo de enriquecimiento ambiental implementado en esta tesis fue capaz de inducir una expansión selectiva de las redes de acoplamiento astrogliales en las láminas II-III, que consistió en una elongación en sentido

perpendicular a la superficie cortical. A su vez, la densidad celular de las redes fue menor en el grupo enriquecido, que fue difícil de interpretar en base a cambios en la eficiencia del acoplamiento. Estos resultados se encuentran en línea con una disminución en la densidad de células astrogliales reportada por otros autores en la corteza visual de la rata luego de una exposición de treinta días a enriquecimiento ambiental post-destete [30]. A su vez, los autores informaron un aumento de la densidad superficial de los procesos celulares marcados con GFAP, indicativo de una hipertrofia astrogliar, que al provocar una separación de los somas astrogliales, sería causa de la disminución en la densidad astrogliar observada en la corteza visual de los animales expuestos a enriquecimiento ambiental, según proponen los autores [30].

Estos antecedentes permiten proponer la existencia de una hipertrofia astrogliar en las láminas II-III que explicaría la expansión de las redes de acoplamiento astrogliales que se presenta en esta Tesis.

Una explicación basada en el aumento del volumen vascular tiene poco sustento, dado que la densidad de marca de acuaporina-4 no sufrió un aumento en el grupo enriquecido, pero cabe notar que este es un marcador indirecto de la densidad vascular.

A la luz de reportes previos indicando aumentos en la expresión de sinaptofisina en la corteza frontal e hipocampo de ratas y ratones luego de una exposición a enriquecimiento ambiental [13], [155], [156], fue inesperado que la densidad de marca de sinaptofisina no sufriera modificaciones producto de la exposición a enriquecimiento ambiental usado en esta tesis. Sin embargo, este resultado, junto con el dato de que los animales expuestos a enriquecimiento mostraron una ganancia de peso indistinguible de la observada en animales alojados en condiciones estándar, presenta la interesante posibilidad de que la glía responda al enriquecimiento con mayor sensibilidad que otros indicadores. Esta característica sería especialmente notable ante paradigmas que resultan de intensidad subumbral para los cambios neuronales, como parece ser el usado en esta Tesis.

Es interesante notar que el enriquecimiento ambiental produjo una disminución de la densidad de marca de Cx30 tanto en la lámina I como en las

láminas II-III. Experimentos recientes han demostrado que la Cx30 cumple funciones importantes en la modulación de la actividad sináptica en el hipocampo, regulando la migración y el anclaje de los procesos astrogliales peri-sinápticos en la hendidura sináptica, independientemente de su función como canal [147]. Notablemente, la eliminación de Cx30 promueve una expansión de procesos astrocíticos que invaden la hendidura sináptica y deprimen la función de las sinapsis, posiblemente al hacer disponible una superficie mayor para la remoción del neurotransmisor [147]. Esta evidencia permite proponer que la disminución en la densidad de marca de Cx30 registrada en nuestro modelo de enriquecimiento ambiental podría encontrarse vinculada con la expansión de procesos astrocíticos y, en consecuencia, del gliopilo y las redes gliales.

Un estudio reciente ha mostrado que diferencias individuales en la neurogénesis hipocampal, en grupos de ratones genéticamente homogéneos, se encuentran asociadas a diferencias en el nivel de actividad exploratoria y a diferencias en indicadores de plasticidad cerebral luego de una exposición a enriquecimiento ambiental [182]. Nuestros resultados muestran que la variabilidad dentro de los grupos expuestos a enriquecimiento ambiental (EA₁₀ y EA₃₀) no mostró diferencias estadísticamente significativas en relación a los controles (CE₁₀ y CE₃₀), en ninguna de las variables estudiadas (Prueba de Levene), lo cual descartaría la posibilidad de que una mayor variabilidad en el grupo enriquecido, producto de diferencias individuales o del establecimiento de jerarquías entre los animales, haya enmascarado el impacto del enriquecimiento sobre las variables estudiadas.

La exposición a un ambiente enriquecido mejora la recuperación de la función motora luego del daño en modelos de injuria por contusión o isquemia en la corteza motora [19]–[21]. Estudios complementarios han mostrado que el enriquecimiento produce un aumento en el grado de ramificación de las dendritas, así como en el número de espinas sinápticas en neuronas piramidales de las láminas III y V en dicha área cortical [18].

Los hallazgos de esta Tesis indican que la configuración de las redes astrogliales y la expresión de las conexinas que las median son modulables por la exposición a un ambiente enriquecido, aún en ausencia de plasticidad sináptica

estructural evaluada mediante marcadores neuronales. Estos resultados permiten plantear la posibilidad de que la plasticidad de las redes astrogiales participe en una mejor recuperación por exposición a enriquecimiento ambiental luego de una injuria y/o en la prevención de la progresión de enfermedades neurodegenerativas.

BIBLIOGRAFIA

- [1] D. Debanne, "Plasticity of neuronal excitability in vivo," *J. Physiol.*, vol. 587, no. 13, pp. 3057–3058, Jul. 2009.
- [2] R. P. Sammons y T. Keck, "Adult plasticity and cortical reorganization after peripheral lesions," *Curr. Opin. Neurobiol.*, vol. 35, pp. 136–141, Dec. 2015.
- [3] J. D. Sweatt, "Neural plasticity and behavior - sixty years of conceptual advances," *J. Neurochem.*, vol. 139, pp. 179–199, Oct. 2016.
- [4] A. Sale, N. Berardi, y L. Maffei, "Environment and Brain Plasticity: Towards an Endogenous Pharmacotherapy," *Physiol. Rev.*, vol. 94, no. 1, pp. 189–234, 2014.
- [5] J. Nithianantharajah y A. J. Hannan, "Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system.," *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 7, no. September, pp. 697–709, 2006.
- [6] H. van Praag, G. Kempermann, y F. H. Gage, "Neural consequences of environmental enrichment.," *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 1, no. December, pp. 191–198, 2000.
- [7] M. G. Leggio, L. Mandolesi, F. Federico, F. Spirito, B. Ricci, F. Gelfo, y L. Petrosini, "Environmental enrichment promotes improved spatial abilities and enhanced dendritic growth in the rat," *Behav. Brain Res.*, vol. 163, no. 1, pp. 78–90, 2005.
- [8] H. Hirase y Y. Shinohara, "Transformation of cortical and hippocampal neural circuit by environmental enrichment," *Neuroscience*, vol. 280, pp. 282–298, 2014.
- [9] E. L. Bennett, M. C. Diamond, D. Krech, y M. R. Rosenzweig, "Chemical and Anatomical Plasticity of Brain: Changes in brain through experience, demanded by learning theories, are found in experiments with rats," *Science (80-.)*, vol. 146, no. 3644, pp. 610–619, Oct. 1964.
- [10] M. C. Diamond, D. Krech, y M. R. Rosenzweig, "The effects of an enriched environment on the histology of the rat cerebral cortex," *J. Comp. Neurol.*, vol. 123, no. 1, pp. 111–120, 1964.
- [11] A. Globus, M. R. Rosenzweig, E. L. Bennett, y M. C. Diamond, "Effects of differential experience on dendritic spine counts in rat cerebral cortex.," *J. Comp. Physiol. Psychol.*, vol. 82, no. 2, pp. 175–181, 1973.

- [12] A. M. Turner y W. T. Greenough, "Differential rearing effects on rat visual cortex synapses. I. Synaptic and neuronal density and synapses per neuron," *Brain Res.*, vol. 329, no. 1–2, pp. 195–203, Mar. 1985.
- [13] J. Nithianantharajah, H. Levis, y M. Murphy, "Environmental enrichment results in cortical and subcortical changes in levels of synaptophysin and PSD-95 proteins," *Neurobiol. Learn. Mem.*, vol. 81, no. 3, pp. 200–210, May 2004.
- [14] G. Kempermann, H. G. Kuhn, y F. H. Gage, "More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment," *Nature*, vol. 386, no. 6624, pp. 493–495, Apr. 1997.
- [15] J. O. Coq y C. Xerri, "Environmental enrichment alters organizational features of the forepaw representation in the primary somatosensory cortex of adult rats," *Exp. Brain Res.*, vol. 121, no. 2, pp. 191–204, 1998.
- [16] D. B. Polley, E. Kvašňák, y R. D. Frostig, "Naturalistic experience transforms sensory maps in the adult cortex of caged animals.," *Nature*, vol. 429, no. May, pp. 67–71, 2004.
- [17] D. S. Alwis y R. Rajan, "Environmental enrichment causes a global potentiation of neuronal responses across stimulus complexity and lamina of sensory cortex.," *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 7, no. August, p. 124, 2013.
- [18] F. Gelfo, P. De Bartolo, A. Giovine, L. Petrosini, y M. G. Leggio, "Layer and regional effects of environmental enrichment on the pyramidal neuron morphology of the rat," *Neurobiol. Learn. Mem.*, vol. 91, no. 4, pp. 353–365, 2009.
- [19] E. Kovcsdi, A. B. Gyorgy, S. K. C. Kwon, D. L. Wingo, A. Kamnaksh, J. B. Long, C. E. Kasper, y D. V. Agoston, "The effect of enriched environment on the outcome of traumatic brain injury; a behavioral, proteomics, and histological study," *Front. Neurosci.*, vol. 5, no. APR, pp. 1–12, 2011.
- [20] S. Mering y J. Jolkkonen, "Proper housing conditions in experimental stroke studies-special emphasis on environmental enrichment," *Front. Neurosci.*, vol. 9, no. MAR, pp. 1–8, 2015.
- [21] J. Biernaskie y D. Corbett, "Enriched rehabilitative training promotes improved forelimb motor function and enhanced dendritic growth after focal ischemic injury.," *J. Neurosci.*, vol. 21, no. 14, pp. 5272–5280, 2001.
- [22] G. Ghézali, G. Dallérac, y N. Rouach, "Perisynaptic astroglial processes:

- dynamic processors of neuronal information,” *Brain Struct. Funct.*, vol. 221, no. 5, pp. 2427–2442, 2016.
- [23] R. D. Fields, A. Araque, H. Johansen-Berg, S. Lim, G. Lynch, K. Nave, M. Nedergaard, R. Perez, T. Sejnowski, H. Wake, S. Lim, G. Lynch, K. Nave, y M. Nedergaard, “Glial biology in learning and cognition.,” *Neuroscientist*, vol. 20, no. 5, pp. 426–31, 2014.
- [24] T. M. Pirttimaki y H. R. Parri, “Astrocyte Plasticity: Implications for Synaptic and Neuronal Activity,” *Neurosci.*, vol. 19, no. 6, pp. 604–615, 2013.
- [25] N. Takata, T. Mishima, C. Hisatsune, T. Nagai, E. Ebisui, K. Mikoshiba, y H. Hirase, “Astrocyte Calcium Signaling Transforms Cholinergic Modulation to Cortical Plasticity In Vivo,” *J. Neurosci.*, vol. 31, no. 49, pp. 18155–18165, 2011.
- [26] J. Sibille, J. Zapata, J. Teillon, y N. Rouach, “Astroglial calcium signaling displays short-term plasticity and adjusts synaptic efficacy.,” *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 9, no. May, p. 189, 2015.
- [27] L. F. Eng, J. J. Vanderhaeghen, A. Bignami, y B. Gerstl, “An acidic protein isolated from fibrous astrocytes.,” *Brain Res.*, vol. 28, no. 2, pp. 351–4, May 1971.
- [28] A. Bignami, L. F. Eng, D. Dahl, y C. T. Uyeda, “Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence,” *Brain Res.*, vol. 43, no. 2, pp. 429–435, 1972.
- [29] A. M. Sirevaag y W. T. Greenough, “Differential rearing effects on rat visual cortex synapses. III. Neuronal and glial nuclei, boutons, dendrites, and capillaries,” *Brain Res.*, vol. 424, no. 2, pp. 320–332, 1987.
- [30] A. M. Sirevaag y W. T. Greenough, “Plasticity of GFAP-immunoreactive astrocyte size and number in visual cortex of rats reared in complex environments,” *Brain Res.*, vol. 540, no. 1–2, pp. 273–278, 1991.
- [31] T. A. Jones, N. Hawrylak, y W. T. Greenough, “Rapid laminar-dependent changes in GFAP immunoreactive astrocytes in the visual cortex of rats reared in a complex environment,” *Psychoneuroendocrinology*, vol. 21, no. 2, pp. 189–201, 1996.
- [32] G. G. Viola, L. Rodrigues, J. C. Américo, G. Hansel, R. S. Vargas, R. Biasibetti, A. Swarowsky, C. A. Gonçalves, L. L. Xavier, M. Achaval, D. O. Souza, y O. B. Amaral, “Morphological changes in hippocampal astrocytes

- induced by environmental enrichment in mice,” *Brain Res.*, vol. 1274, pp. 47–54, Jun. 2009.
- [33] P. Sampedro-Piquero, P. De Bartolo, L. Petrosini, C. Zancada-Menendez, J. L. Arias, y A. Begega, “Astrocytic plasticity as a possible mediator of the cognitive improvements after environmental enrichment in aged rats,” *Neurobiol. Learn. Mem.*, vol. 114, pp. 16–25, 2014.
- [34] T. a Jones y W. T. Greenough, “Ultrastructural evidence for increased contact between astrocytes and synapses in rats reared in a complex environment.,” *Neurobiol. Learn. Mem.*, vol. 65, no. 1, pp. 48–56, 1996.
- [35] R. L. Leino, D. Z. Gerhart, A. M. Van Bueren, A. L. McCall, y L. R. Drewes, “Ultrastructural localization of GLUT 1 and GLUT 3 glucose transporters in rat brain,” *J. Neurosci. Res.*, vol. 49, no. 5, pp. 617–626, 1997.
- [36] M. Simard, G. Arcuino, T. Takano, Q. S. Liu, y M. Nedergaard, “Signaling at the gliovascular interface,” *J. Neurosci.*, vol. 23, no. 1529–2401, pp. 9254–9262, 2003.
- [37] A. M. Sirevaag, J. E. Black, D. Shafron, y W. T. Greenough, “Direct evidence that complex experience increases capillary branching and surface area in visual cortex of young rats,” *Dev. Brain Res.*, vol. 43, no. 2, pp. 299–304, 1988.
- [38] J. E. Black, A. M. Zelazny, y W. T. Greenough, “Capillary and mitochondrial support of neural plasticity in adult rat visual cortex,” *Exp. Neurol.*, vol. 111, no. 2, pp. 204–209, 1991.
- [39] J. E. Black, A. M. Sirevaag, y W. T. Greenough, “Complex experience promotes capillary formation in young rat visual cortex,” *Neurosci. Lett.*, vol. 83, no. 3, pp. 351–355, 1987.
- [40] B. Lacoste, C. H. Comin, A. Ben-Zvi, P. S. Kaeser, X. Xu, L. da F. Costa, y C. Gu, “Sensory-Related Neural Activity Regulates the Structure of Vascular Networks in the Cerebral Cortex,” *Neuron*, vol. 83, no. 5, pp. 1117–1130, Sep. 2014.
- [41] H. Kucukdereli, N. J. Allen, A. T. Lee, A. Feng, M. I. Ozlu, L. M. Conatser, C. Chakraborty, G. Workman, M. Weaver, E. H. Sage, B. A. Barres, y C. Eroglu, “Control of excitatory CNS synaptogenesis by astrocyte-secreted proteins Hevin and SPARC.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, no. 32, pp. E440-9, 2011.

- [42] W. C. Risher, S. Patel, I. H. wan Kim, A. Uezu, S. Bhagat, D. K. Wilton, L. J. Pilaz, J. Singh Alvarado, O. Y. Calhan, D. L. Silver, B. Stevens, N. Calakos, S. H. Soderling, y C. Eroglu, "Astrocytes refine cortical connectivity at dendritic spines," *Elife*, vol. 3, pp. 1–24, 2014.
- [43] S. K. Singh, J. A. Stogsdill, N. S. Pulimood, H. Dingsdale, Y. H. Kim, L.-J. Pilaz, I. H. Kim, A. C. Manhaes, W. S. Rodrigues, A. Pamukcu, E. Enustun, Z. Ertuz, P. Scheiffele, S. H. Soderling, D. L. Silver, R.-R. Ji, A. E. Medina, y C. Eroglu, "Astrocytes Assemble Thalamocortical Synapses by Bridging NRX1 α and NL1 via Hevin," *Cell*, vol. 164, pp. 183–196, Jan. 2016.
- [44] J. D. Rothstein, M. Dykes-Hoberg, C. A. Pardo, L. A. Bristol, L. Jin, R. W. Kuncl, Y. Kanai, M. A. Hediger, Y. Wang, J. P. Schielke, y D. F. Welty, "Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate.," *Neuron*, vol. 16, no. 3, pp. 675–86, Mar. 1996.
- [45] K. Tanaka, K. Watase, T. Manabe, K. Yamada, M. Watanabe, K. Takahashi, H. Iwama, T. Nishikawa, N. Ichihara, T. Kikuchi, S. Okuyama, N. Kawashima, S. Hori, M. Takimoto, y K. Wada, "Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1.," *Science*, vol. 276, no. 5319, pp. 1699–702, Jun. 1997.
- [46] Y. H. Huang, S. R. Sinha, K. Tanaka, J. D. Rothstein, y D. E. Bergles, "Astrocyte Glutamate Transporters Regulate Metabotropic Glutamate Receptor-Mediated Excitation of Hippocampal Interneurons," *J. Neurosci.*, vol. 24, no. 19, pp. 4551–4559, May 2004.
- [47] C. Genoud, C. Quairiaux, P. Steiner, H. Hirling, E. Welker, y G. W. Knott, "Plasticity of astrocytic coverage and glutamate transporter expression in adult mouse cortex," *PLoS Biol.*, vol. 4, no. 11, pp. 2057–2064, 2006.
- [48] A. Araque, V. Parpura, R. P. Sanzgiri, y P. G. Haydon, "Tripartite synapses: Glia, the unacknowledged partner," *Trends Neurosci.*, vol. 22, no. 5, pp. 208–215, 1999.
- [49] M. M. Halassa, T. Fellin, y P. G. Haydon, "The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease," *Trends Mol. Med.*, vol. 13, no. 2, pp. 54–63, 2007.
- [50] A. Reichenbach y H. Wolburg, "Astrocytes and Ependymal Glia (Morphology, Ultrastructure, and Identification)," in *Neuroglia*, 3rd ed., B. R.

- Ransom y H. Kettenmann, Eds. New York: Oxford University Press, 2013, pp. 38–39.
- [51] J. A. Colombo, A. Yañez, V. Puissant, y S. Lipina, “Long, interlaminar astroglial cell processes in the cortex of adult monkeys,” *J. Neurosci. Res.*, vol. 40, no. 4, pp. 551–556, 1995.
- [52] J. A. Colombo, “The interlaminar glia: from serendipity to hypothesis,” *Brain Struct. Funct.*, 2016.
- [53] H. D. Reisin y J. A. Colombo, “Glial changes in primate cerebral cortex following long-term sensory deprivation,” *Brain Res.*, vol. 1000, no. 1–2, pp. 179–182, 2004.
- [54] J. A. Colombo, H. D. Reisin, M. Jones, y C. Bentham, “Development of interlaminar astroglial processes in the cerebral cortex of control and Down’s syndrome human cases,” *Exp. Neurol.*, vol. 193, no. 1, pp. 207–217, 2005.
- [55] J. A. Colombo, B. Quinn, y V. Puissant, “Disruption of astroglial interlaminar processes in Alzheimer’s disease,” *Brain Res. Bull.*, vol. 58, no. 2, pp. 235–242, 2002.
- [56] M. M. Halassa, T. Fellin, H. Takano, J.-H. Dong, y P. G. Haydon, “Synaptic Islands Defined by the Territory of a Single Astrocyte,” *J. Neurosci.*, vol. 27, no. 24, pp. 6473–6477, Jun. 2007.
- [57] E. a Bushong, M. E. Martone, Y. Z. Jones, y M. H. Ellisman, “Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains.,” *J. Neurosci.*, vol. 22, no. 1, pp. 183–192, 2002.
- [58] M. López-Hidalgo, W. B. Hoover, y J. Schummers, “Spatial organization of astrocytes in ferret visual cortex,” *J. Comp. Neurol.*, vol. 524, no. 17, pp. 3561–3576, Dec. 2016.
- [59] F. Vasile, E. Dossi, y N. Rouach, “Human astrocytes: structure and functions in the healthy brain,” *Brain Struct. Funct.*, vol. 0, no. 0, p. 10.1007/s00429-017-1383-5, Mar. 2017.
- [60] C. Steinhäuser, T. Berger, M. Frotscher, y H. Kettenmann, “Heterogeneity in the Membrane Current Pattern of Identified Glial Cells in the Hippocampal Slice,” *Eur. J. Neurosci.*, vol. 4, no. 6, pp. 472–484, 1992.
- [61] C. Steinhäuser, R. Jabs, y H. Kettenmann, “Properties of GABA and glutamate responses in identified glial cells of the mouse hippocampal slice.,” *Hippocampus*, vol. 4, no. 1, pp. 19–35, 1994.

- [62] A. Bordey y H. Sontheimer, "Postnatal development of ionic currents in rat hippocampal astrocytes in situ," *J. Neurophysiol.*, vol. 78, no. 1, pp. 461–477, 1997.
- [63] A. Nishiyama, A. Chang, y B. D. Trapp, "NG2+ glial cells: a novel glial cell population in the adult brain.," *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, vol. 58, no. 11, pp. 1113–24, Nov. 1999.
- [64] C. C. Stichel, C. M. Müller, y K. Zilles, "Distribution of glial fibrillary acidic protein and vimentin immunoreactivity during rat visual cortex development," *J. Neurocytol.*, vol. 20, no. 2, pp. 97–108, Feb. 1991.
- [65] W. Walz, "Controversy surrounding the existence of discrete functional classes of astrocytes in adult gray matter," *Glia*, vol. 31, no. 2, pp. 95–103, Aug. 2000.
- [66] H. K. Kimelberg, "The problem of astrocyte identity," *Neurochem. Int.*, vol. 45, no. 2–3, pp. 191–202, 2004.
- [67] M. Zhou, "Development of GLAST(+) Astrocytes and NG2(+) Glia in Rat Hippocampus CA1: Mature Astrocytes Are Electrophysiologically Passive," *J. Neurophysiol.*, vol. 95, no. 1, pp. 134–143, 2006.
- [68] A. Nimmerjahn, F. Kirchhoff, J. N. D. Kerr, y F. Helmchen, "Sulforhodamine 101 as a specific marker of astroglia in the neocortex in vivo.," *Nat. Methods*, vol. 1, no. 1, pp. 31–37, 2004.
- [69] K. W. Kafitz, S. D. Meier, J. Stephan, y C. R. Rose, "Developmental profile and properties of sulforhodamine 101-Labeled glial cells in acute brain slices of rat hippocampus," *J. Neurosci. Methods*, vol. 169, no. 1, pp. 84–92, Mar. 2008.
- [70] C. Nolte, M. Matyash, T. Pivneva, C. G. Schipke, C. Ohlemeyer, U. Hanisch, y M. Delbru, "GFAP Promoter-Controlled EGFP- Expressing Transgenic Mice : A Tool to Visualize Astrocytes and Astrogliosis in Living Brain Tissue," vol. 86, no. September 2000, pp. 72–86, 2001.
- [71] K. Matthias, F. Kirchhoff, G. Seifert, K. Hüttmann, M. Matyash, H. Kettenmann, y C. Steinhäuser, "Segregated expression of AMPA-type glutamate receptors and glutamate transporters defines distinct astrocyte populations in the mouse hippocampus.," *J. Neurosci.*, vol. 23, no. 5, pp. 1750–1758, 2003.
- [72] A. Wallraff, B. Odermatt, K. Willecke, y C. Steinhäuser, "Distinct types of

- astroglial cells in the hippocampus differ in gap junction coupling,” *Glia*, vol. 48, no. 1, pp. 36–43, 2004.
- [73] C. Steinhäuser, G. Seifert, y J. W. Deitmer, “Physiology of astrocytes: ion channels and ion transporters,” in *Neuroglia*, 3rd ed., H. Kettenmann y B. R. Ransom, Eds. New York: Oxford University Press, 2013, p. 185.
- [74] G. Dallérac, O. Chever, y N. Rouach, “How do astrocytes shape synaptic transmission? Insights from electrophysiology.,” *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 7, no. October, p. 159, 2013.
- [75] B. Djukic, K. B. Casper, B. D. Philpot, L. Chin, y K. D. Mccarthy, “Conditional Knock-Out of Kir 4 . 1 Leads to Glial Membrane Depolarization , Inhibition of Potassium and Glutamate Uptake , and Enhanced Short-Term Synaptic Potentiation,” *Neuroscience*, vol. 27, no. 42, pp. 11354–11365, 2007.
- [76] G. Seifert, K. Hüttmann, D. K. Binder, C. Hartmann, A. Wyczynski, C. Neusch, y C. Steinhäuser, “Analysis of astroglial K⁺ channel expression in the developing hippocampus reveals a predominant role of the Kir4.1 subunit.,” *J. Neurosci.*, vol. 29, no. 23, pp. 7474–88, 2009.
- [77] M. Zhou, G. Xu, M. Xie, X. Zhang, G. P. Schools, L. Ma, H. K. Kimelberg, y H. Chen, “TWIK-1 and TREK-1 are potassium channels contributing significantly to astrocyte passive conductance in rat hippocampal slices.,” *J. Neurosci.*, vol. 29, no. 26, pp. 8551–64, 2009.
- [78] S. Zhong, Y. Du, C. M. Kiyoshi, B. Ma, C. C. Alford, Q. Wang, Y. Yang, X. Liu, y M. Zhou, “Electrophysiological behavior of neonatal astrocytes in hippocampal stratum radiatum,” *Mol. Brain*, vol. 9, no. 1, p. 34, 2016.
- [79] Y. V. Kucheryavykh, L. Y. Kucheryavykh, C. G. Nichols, H. M. Maldonado, K. Baksi, A. Reichenbach, S. N. Skatchkov, y M. J. Eaton, “Downregulation of Kir4.1 inward rectifying potassium channel subunits by RNAi impairs potassium transfer and glutamate uptake by cultured cortical astrocytes,” *Glia*, vol. 55, no. 3, pp. 274–281, Feb. 2007.
- [80] H. Brew y D. Attwell, “Electrogenic glutamate uptake is a major current carrier in the membrane of axolotl retinal glial cells.,” *Nature*, vol. 327, pp. 707–709, 1987.
- [81] H. K. Kimelberg, “Functions of mature mammalian astrocytes: a current view.,” *Neurosci.*, vol. 16, no. 1, pp. 79–106, 2010.
- [82] J. A. Filosa, A. D. Bonev, S. V Straub, A. L. Meredith, M. K. Wilkerson, R. W.

- Aldrich, y M. T. Nelson, "Local potassium signaling couples neuronal activity to vasodilation in the brain," *Nat. Neurosci.*, vol. 9, no. 11, pp. 1397–1403, 2006.
- [83] C. R. Rose y J. Y. Chatton, "Astrocyte sodium signaling and neuro-metabolic coupling in the brain," *Neuroscience*, vol. 323, pp. 121–134, 2016.
- [84] H. Hirase, L. Qian, P. Barthó, y G. Buzsáki, "Calcium Dynamics of Cortical Astrocytic Networks In Vivo," *PLoS Biol.*, vol. 2, no. 4, pp. 0494–0499, Apr. 2004.
- [85] N. Kuga, T. Sasaki, Y. Takahara, N. Matsuki, y Y. Ikegaya, "Large-Scale Calcium Waves Traveling through Astrocytic Networks In Vivo," *J. Neurosci.*, vol. 31, no. 7, pp. 2607–2614, 2011.
- [86] F. J. Binmöller y C. M. Müller, "Postnatal development of dye-coupling among astrocytes in rat visual cortex.," *Glia*, vol. 6, no. 2, pp. 127–37, 1992.
- [87] R. Bruzzone, T. W. White, y D. L. Paul, "Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling.," *Eur. J. Biochem.*, vol. 238, no. 1, pp. 1–27, 1996.
- [88] T. Yamamoto, A. Ochalski, E. L. Hertzberg, y J. I. Nagy, "On the organization of astrocytic gap junctions in rat brain as suggested by LM and EM immunohistochemistry of connexin43 expression.," *J. Comp. Neurol.*, vol. 302, no. 4, pp. 853–83, Dec. 1990.
- [89] J. I. Nagy, D. Patel, P. A. Ochalski, y G. L. Stelmack, "Connexin30 in rodent, cat and human brain: selective expression in gray matter astrocytes, co-localization with connexin43 at gap junctions and late developmental appearance.," *Neuroscience*, vol. 88, no. 2, pp. 447–68, Jan. 1999.
- [90] A. Wallraff, R. Köhling, U. Heinemann, M. Theis, K. Willecke, y C. Steinhäuser, "The impact of astrocytic gap junctional coupling on potassium buffering in the hippocampus.," *J. Neurosci.*, vol. 26, no. 20, pp. 5438–47, May 2006.
- [91] S. Finkbeiner, "Calcium waves in astrocytes-filling in the gaps," *Neuron*, vol. 8, no. 6, pp. 1101–1108, 1992.
- [92] N. Rouach, A. Koulakoff, V. Abudara, K. Willecke, y C. Giaume, "Astroglial Metabolic Networks Sustain Hippocampal Synaptic Transmission," *Science (80-.)*, vol. 322, no. 5907, pp. 1551–1555, Dec. 2008.
- [93] G. K. Gandhi, N. F. Cruz, K. K. Ball, S. A. Theus, y G. A. Dienel, "Selective

- astrocytic gap junctional trafficking of molecules involved in the glycolytic pathway: Impact on cellular brain imaging,” *J. Neurochem.*, vol. 110, no. 3, pp. 857–869, 2009.
- [94] M. Abbaci, M. Barberi-Heyob, W. Blondel, F. Guillemin, y J. Didelon, “Advantages and limitations of commonly used methods to assay the molecular permeability of gap junctional intercellular communication,” *Biotechniques*, vol. 45, no. 1, pp. 33–62, 2008.
- [95] L. Roux, K. Benchenane, J. D. Rothstein, G. Bonvento, y C. Giaume, “Plasticity of astroglial networks in olfactory glomeruli,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 108, no. 45, pp. 18442–18446, Nov. 2011.
- [96] V. Houades, A. Koulakoff, P. Ezan, I. Seif, y C. Giaume, “Gap Junction-Mediated Astrocytic Networks in the Mouse Barrel Cortex,” *J. Neurosci.*, vol. 28, no. 20, pp. 5207–5217, 2008.
- [97] A. Koulakoff, P. Ezan, y C. Giaume, “Neurons control the expression of connexin 30 and connexin 43 in mouse cortical astrocytes,” *Glia*, vol. 56, no. 12, pp. 1299–1311, 2008.
- [98] M. O. Enkvist y K. D. McCarthy, “Astroglial gap junction communication is increased by treatment with either glutamate or high K⁺ concentration.,” *J. Neurochem.*, vol. 62, no. 2, pp. 489–95, 1994.
- [99] M. H. De Pina-Benabou, M. Srinivas, D. C. Spray, y E. Scemes, “Calmodulin kinase pathway mediates the K⁺-induced increase in Gap junctional communication between mouse spinal cord astrocytes.,” *J. Neurosci.*, vol. 21, no. 17, pp. 6635–43, 2001.
- [100] U. Pannasch, L. Vargová, J. Reingruber, P. Ezan, D. Holcman, C. Giaume, E. Syková, y N. Rouach, “Astroglial networks scale synaptic activity and plasticity.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, no. 20, pp. 8467–8472, 2011.
- [101] O. Chever, E. Dossi, U. Pannasch, M. Derangeon, y N. Rouach, “Astroglial networks promote neuronal coordination,” *Sci. Signal.*, vol. 9, no. 410, pp. 1–9, 2016.
- [102] S. E. Lutz, Y. Zhao, M. Gulinello, S. C. Lee, C. S. Raine, y C. F. Brosnan, “Deletion of astrocyte connexins 43 and 30 leads to a dysmyelinating phenotype and hippocampal CA1 vacuolation,” *J. Neurosci.*, vol. 29, no. 24, pp. 7743–7752, 2009.

- [103] O. Peters, C. G. Schipke, A. Philipps, B. Haas, U. Pannasch, L. P. Wang, B. Benedetti, A. E. Kingston, y H. Kettenmann, "Astrocyte Function is Modified by Alzheimer's Disease-like Pathology in Aged Mice," *J. Alzheimer's Dis.*, vol. 18, no. 1, pp. 177–189, Jul. 2009.
- [104] J. I. Nagy, W. Li, E. L. Hertzberg, y C. A. Marotta, "Elevated connexin43 immunoreactivity at sites of amyloid plaques in Alzheimer's disease," *Brain Res.*, vol. 717, no. 1–2, pp. 173–178, 1996.
- [105] K. D. Harris y G. M. G. Shepherd, "The neocortical circuit: themes and variations," *Nat. Neurosci.*, vol. 18, no. 2, pp. 170–181, 2015.
- [106] R. J. Douglas y K. A. C. Martin, "NEURONAL CIRCUITS OF THE NEOCORTEX," *Annu. Rev. Neurosci.*, vol. 27, no. 1, pp. 419–451, Jul. 2004.
- [107] D. et al. Purves, Ed., "Neuroscience," in *Neuroscience*, 3rd ed., Sunderland, MA 01375: Sinauer Associates, Inc., 2004, p. 613.
- [108] M. E. Larkum y J. J. Zhu, "Signaling of layer 1 and whisker-evoked Ca²⁺ and Na⁺ action potentials in distal and terminal dendrites of rat neocortical pyramidal neurons in vitro and in vivo.," *J. Neurosci.*, vol. 22, no. 16, pp. 6991–7005, 2002.
- [109] M. Garcia-Munoz y G. W. Arbuthnott, "Basal ganglia—thalamus and the 'crowning enigma,'" *Front. Neural Circuits*, vol. 9, no. November, pp. 1–10, 2015.
- [110] S. J. Cruikshank, O. J. Ahmed, T. R. Stevens, S. L. Patrick, A. N. Gonzalez, M. Elmaleh, y B. W. Connors, "Thalamic control of layer 1 circuits in prefrontal cortex.," *J. Neurosci.*, vol. 32, no. 49, pp. 17813–23, 2012.
- [111] P. Rubio-Garrido, F. Pérez-De-Manzo, C. Porrero, M. J. Galazo, y F. Clascá, "Thalamic input to distal apical dendrites in neocortical layer 1 is massive and highly convergent," *Cereb. Cortex*, vol. 19, no. 10, pp. 2380–2395, 2009.
- [112] N. Takata y H. Hirase, "Cortical layer 1 and layer 2/3 astrocytes exhibit distinct calcium dynamics in vivo," *PLoS One*, vol. 3, no. 6, 2008.
- [113] A. F. H. McCaslin, B. R. Chen, A. J. Radosevich, B. Cauli, y E. M. C. Hillman, "In vivo 3D morphology of astrocyte-vasculature interactions in the somatosensory cortex: implications for neurovascular coupling.," *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, vol. 31, no. 3, pp. 795–806, 2011.

- [114] F. Appaix, S. Girod, S. Boisseau, J. Römer, J. C. Vial, M. Albrieux, M. Maurin, A. Depaulis, I. Guillemain, y B. van der Sanden, “Specific in vivo staining of astrocytes in the whole brain after intravenous injection of sulforhodamine dyes,” *PLoS One*, vol. 7, no. 4, pp. 1–13, 2012.
- [115] C. G. Schipke, B. Haas, y H. Kettenmann, “Astrocytes discriminate and selectively respond to the activity of a subpopulation of neurons within the barrel cortex,” *Cereb. Cortex*, vol. 18, no. 10, pp. 2450–2459, 2008.
- [116] J. Schummers, H. Yu, y M. Sur, “Tuned responses of astrocytes and their influence on hemodynamic signals in the visual cortex.,” *Science (80-.)*, vol. 320, no. 5883, pp. 1638–43, Jun. 2008.
- [117] A. Ghosh, M. T. Wyss, y B. Weber, “Somatotopic astrocytic activity in the somatosensory cortex,” *Glia*, vol. 61, no. 4, pp. 601–610, Apr. 2013.
- [118] M. López-Hidalgo y J. Schummers, “Cortical maps: a role for astrocytes?,” *Curr. Opin. Neurobiol.*, vol. 24, no. 1, pp. 176–189, Feb. 2014.
- [119] R. J. Douglas y K. a C. Martin, “Mapping the matrix: the ways of neocortex.,” *Neuron*, vol. 56, no. 2, pp. 226–238, 2007.
- [120] F. Gelfo, P. De Bartolo, A. Giovine, L. Petrosini, y M. Giuseppa, “Neurobiology of Learning and Memory Layer and regional effects of environmental enrichment on the pyramidal neuron morphology of the rat,” *Neurobiol. Learn. Mem.*, vol. 91, no. 4, pp. 353–365, 2009.
- [121] C. K. E. Jung y J. Herms, “Structural Dynamics of Dendritic Spines are Influenced by an Environmental Enrichment: An In Vivo Imaging Study,” *Cereb. Cortex*, vol. 24, no. 2, pp. 377–384, Feb. 2014.
- [122] X. A. Lanosa, I. Santacroce, y J. A. Colombo, “Exposure to environmental enrichment prior to a cerebral cortex stab wound attenuates the postlesional astroglia response in rats.,” *Neuron Glia Biol.*, vol. 7, no. 2–4, pp. 163–75, 2011.
- [123] G. Paxinos y C. Watson, *The Rat Brain In Stereotaxic Coordinates*, 7th ed. Elsevier Inc., 2014.
- [124] M. Lindau y E. Neher, “Patch-clamp techniques for time-resolved capacitance measurements in single cells.,” *Pflugers Arch.*, vol. 411, no. 2, pp. 137–146, 1988.
- [125] S. H. Heinemann, “Guide to Data Acquisition and Analysis,” in *Single-Channel Recording*, 2nd ed., B. Sakmann y E. Neher, Eds. New York:

- Plenum Press, 1995, pp. 53–90.
- [126] C. A. Schneider, W. S. Rasband, y K. W. Eliceiri, “NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis,” *Nat. Methods*, vol. 9, no. 7, pp. 671–675, 2012.
- [127] E. D. Salomon, S. L. Shaw, J. C. Waters, C. M. Waterman-Storer, P. S. Maddox, E. Yeh, y K. Bloom, “A high-resolution multimode digital microscope system,” in *Methods in Cell Biology, Vol 81 (Digital Microscopy)*, 3rd ed., G. Sluder y D. E. Wolf, Eds. Elsevier, 2007, pp. 187–217.
- [128] P. Bankhead, “Detection by thresholding,” *Analyzing fluorescence microscopy images with ImageJ*. Queen’s University Belfast, Belfast, pp. 67–78, 2014.
- [129] J. Sun, S. J. Lee, L. Wu, M. Sarntinoranont, y H. Xie, “Refractive index measurement of acute rat brain tissue slices using optical coherence tomography,” *Opt. Express*, vol. 20, no. 2, p. 1084, Jan. 2012.
- [130] G. P. Quinn y M. J. Keough, “Transforming data,” in *Experimental Design and Data Analysis for Biologists*, 1st ed., Cambridge: Cambridge University Press, 2002, p. 64.
- [131] V. Houades, N. Rouach, P. Ezan, F. Kirchhoff, A. Koulakoff, y C. Giaume, “Shapes of astrocyte networks in the juvenile brain.,” *Neuron Glia Biol.*, vol. 2, no. 1, pp. 3–14, 2006.
- [132] T. Mishima y H. Hirase, “In Vivo Intracellular Recording Suggests That Gray Matter Astrocytes in Mature Cerebral Cortex and Hippocampus Are Electrophysiologically Homogeneous,” *J. Neurosci.*, vol. 30, no. 8, pp. 3093–3100, Feb. 2010.
- [133] C. Giaume y M. Theis, “Pharmacological and genetic approaches to study connexin-mediated channels in glial cells of the central nervous system,” *Brain Res. Rev.*, vol. 63, no. 1–2, pp. 160–176, 2010.
- [134] J. P. Vessey, M. R. Lalonde, H. A. Mizan, N. C. Welch, M. E. Kelly, y S. Barnes, “Carbenoxolone inhibition of voltage-gated Ca channels and synaptic transmission in the retina,” *J Neurophysiol*, vol. 92, no. 2, pp. 1252–1256, 2004.
- [135] S. O. Suadicani, C. F. Brosnan, y E. Scemes, “P2X 7 Receptors Mediate ATP Release and Amplification of Astrocytic Intercellular Ca,” *Neuroscience*, vol. 26, no. 5, pp. 1378–1385, 2006.
- [136] F. Blomstrand, L. Venance, A. L. Sirén, P. Ezan, E. Hanse, J. Glowinski, H.

- Ehrenreich, y C. Giaume, “Endothelins regulate astrocyte gap junctions in rat hippocampal slices,” *Eur. J. Neurosci.*, vol. 19, no. 4, pp. 1005–1015, 2004.
- [137] W. Meme, M. Vandecasteele, C. Giaume, y L. Venance, “Electrical coupling between hippocampal astrocytes in rat brain slices,” *Neurosci. Res.*, vol. 63, no. 4, pp. 236–243, 2009.
- [138] V. J. Srinivasan, H. Radhakrishnan, J. Y. Jiang, S. Barry, y A. E. Cable, “Optical coherence microscopy for deep tissue imaging of the cerebral cortex with intrinsic contrast,” *Opt. Express*, vol. 20, no. 3, pp. 2220–39, 2012.
- [139] C. Leahy, H. Radhakrishnan, y V. J. Srinivasan, “Volumetric imaging and quantification of cytoarchitecture and myeloarchitecture with intrinsic scattering contrast,” *Biomed. Opt. Express*, vol. 4, no. 10, pp. 1913–1978, 2013.
- [140] E. Stark, R. Drori, y M. Abeles, “Motor cortical activity related to movement kinematics exhibits local spatial organization,” *Cortex*, vol. 45, no. 3, pp. 418–431, 2009.
- [141] D. Kätzel, B. V Zelman, C. Buetfering, M. Wölfel, y G. Miesenböck, “The columnar and laminar organization of inhibitory connections to neocortical excitatory cells,” *Nat. Neurosci.*, vol. 14, no. 1, pp. 100–107, Jan. 2011.
- [142] V. Augustin, C. Bold, S. L. Wadle, J. Langer, R. Jabs, C. Philippot, D. J. Weingarten, C. R. Rose, C. Steinhäuser, y J. Stephan, “Functional anisotropic panglial networks in the lateral superior olive,” *Glia*, vol. 64, no. 11, pp. 1892–1911, Nov. 2016.
- [143] L. Claus, C. Philippot, S. Griemsmann, A. Timmermann, R. Jabs, C. Henneberger, H. Kettenmann, y C. Steinhäuser, “Barreloid Borders and Neuronal Activity Shape Panglial Gap Junction-Coupled Networks in the Mouse Thalamus,” *Cereb. Cortex*, pp. 1–10, 2016.
- [144] T. Yamamoto, A. Ochalski, E. L. Hertzberg, y J. I. Nagy, “LM and EM immunolocalization of the gap junctional protein connexin 43 in rat brain.,” *Brain Res.*, vol. 508, no. 2, pp. 313–9, Feb. 1990.
- [145] J. A. Markham y W. T. Greenough, “Experience-driven brain plasticity: beyond the synapse,” *Neuron Glia Biol.*, vol. 1, no. 4, p. 351, Jul. 2005.
- [146] B. J. Anderson, “Plasticity of gray matter volume: The cellular and synaptic

- plasticity that underlies volumetric change,” *Dev. Psychobiol.*, vol. 53, no. 5, pp. 456–465, 2011.
- [147] U. Pannasch, D. Freche, G. Dallérac, G. Ghézali, C. Escartin, P. Ezan, M. Cohen-Salmon, K. Benchenane, V. Abudara, A. Dufour, J. H. R. Lübke, N. Déglon, G. Knott, D. Holcman, y N. Rouach, “Connexin 30 sets synaptic strength by controlling astroglial synapse invasion.,” *Nat. Neurosci.*, vol. 17, no. 4, pp. 549–58, 2014.
- [148] T. Unger, S. Bette, J. Zhang, M. Theis, y J. Engele, “Connexin-deficiency affects expression levels of glial glutamate transporters within the cerebrum,” *Neurosci. Lett.*, vol. 506, no. 1, pp. 12–16, 2012.
- [149] G. T. Petr, Y. Sun, N. M. Frederick, Y. Zhou, S. C. Dhamne, M. Q. Hameed, C. Miranda, E. A. Bedoya, K. D. Fischer, W. Armsen, J. Wang, N. C. Danbolt, A. Rotenberg, C. J. Aoki, y P. A. Rosenberg, “Conditional Deletion of the Glutamate Transporter GLT-1 Reveals That Astrocytic GLT-1 Protects against Fatal Epilepsy While Neuronal GLT-1 Contributes Significantly to Glutamate Uptake into Synaptosomes,” *J. Neurosci.*, vol. 35, no. 13, pp. 5187–5201, Apr. 2015.
- [150] T. Aida, J. Yoshida, M. Nomura, A. Tanimura, Y. Iino, M. Soma, N. Bai, Y. Ito, W. Cui, H. Aizawa, M. Yanagisawa, T. Nagai, N. Takata, K. F. Tanaka, R. Takayanagi, M. Kano, M. Götz, H. Hirase, y K. Tanaka, “Astroglial Glutamate Transporter Deficiency Increases Synaptic Excitability and Leads to Pathological Repetitive Behaviors in Mice,” *Neuropsychopharmacology*, vol. 40, no. 7, pp. 1569–1579, 2015.
- [151] M. Gómez-Galán, T. Femenía, E. Aberg, L. Graae, A. Van Eeckhaut, I. Smolders, S. Brené, M. Lindskog, M. Gómez-Galán, T. Femenía, E. Aberg, L. Graae, A. Van Eeckhaut, I. Smolders, S. Brené, y M. Lindskog, “Running opposes the effects of social isolation on synaptic plasticity and transmission in a rat model of depression,” *PLoS One*, vol. 11, no. 10, pp. 1–11, 2016.
- [152] a Furuta, J. D. Rothstein, y L. J. Martin, “Glutamate transporter protein subtypes are expressed differentially during rat CNS development.,” *J. Neurosci.*, vol. 17, no. 21, pp. 8363–8375, 1997.
- [153] Y. Hase, L. Craggs, M. Hase, W. Stevenson, J. Slade, D. Lopez, R. Mehta, A. Chen, D. Liang, A. Oakley, M. Ihara, K. Horsburgh, y R. N. Kalaria, “Effects of environmental enrichment on white matter glial responses in a

- mouse model of chronic cerebral hypoperfusion,” *J. Neuroinflammation*, vol. 14, no. 1, p. 81, Dec. 2017.
- [154] E. A. Nagelhus, T. M. Mathiesen, y O. P. Ottersen, “Aquaporin-4 in the central nervous system: Cellular and subcellular distribution and coexpression with KIR4.1,” *Neuroscience*, vol. 129, no. 4, pp. 905–913, 2004.
- [155] S. Saito, S. Kobayashi, Y. Ohashi, M. Igarashi, Y. Komiyama, y S. Ando, “Decreased synaptic density in aged brains and its prevention by rearing under enriched environment as revealed by synaptophysin contents,” *J. Neurosci. Res.*, vol. 39, no. 1, pp. 57–62, 1994.
- [156] K. M. Frick y S. M. Fernandez, “Enrichment enhances spatial memory and increases synaptophysin levels in aged female mice,” *Neurobiol. Aging*, vol. 24, no. 4, pp. 615–626, 2003.
- [157] B. Fiala, F. M. Snow, y W. T. Greenough, “‘Impoverished’ rats weigh more than ‘enriched’ rats because they eat more.,” *Dev. Psychobiol.*, vol. 10, no. July 1976, pp. 537–541, 1977.
- [158] J. Zaias, T. J. Queeney, J. B. Kelley, E. S. Zakharova, y S. Izenwasser, “Social and physical environmental enrichment differentially affect growth and activity of preadolescent and adolescent male rats.,” *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.*, vol. 47, no. 2, pp. 30–4, Mar. 2008.
- [159] C. Giaume, A. Koulakoff, L. Roux, D. Holcman, y N. Rouach, “Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions,” *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 11, no. 2, pp. 87–99, Feb. 2010.
- [160] C. G. Schipke, A. Heidemann, A. Skupin, O. Peters, M. Falcke, y H. Kettenmann, “Temperature and nitric oxide control spontaneous calcium transients in astrocytes,” *Cell Calcium*, vol. 43, no. 3, pp. 285–295, Mar. 2008.
- [161] H. S. Lee, A. Ghetti, A. Pinto-Duarte, X. Wang, G. Dzievczapolski, F. Galimi, S. Huitron-Resendiz, J. C. Pina-Crespo, A. J. Roberts, I. M. Verma, T. J. Sejnowski, y S. F. Heinemann, “Astrocytes contribute to gamma oscillations and recognition memory,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 111, no. 32, pp. E3343-52, 2014.
- [162] Y. Han, H. xiao Yu, M. li Sun, Y. Wang, W. Xi, y Y. qin Yu, “Astrocyte-restricted disruption of connexin-43 impairs neuronal plasticity in mouse

- barrel cortex," *Eur. J. Neurosci.*, vol. 39, no. 1, pp. 35–45, 2014.
- [163] J. J. Miguel-Hidalgo, B. A. Wilson, S. Hussain, A. Meshram, G. Rajkowska, y C. A. Stockmeier, "Reduced connexin 43 immunolabeling in the orbitofrontal cortex in alcohol dependence and depression," *J. Psychiatr. Res.*, vol. 55, no. 1, pp. 101–109, 2014.
- [164] L. Leibnitz, B. Bär, L. Günther, R. Ludwig, y A. Hedlich, "The glia types in the visual system of adult rats, their shape variability, distribution patterns, and their lightoptically visible contacts to other tissue structures.," *J. Hirnforsch.*, vol. 23, no. 2, pp. 225–38, 1982.
- [165] J. G. Parnavelas, R. Luder, S. G. Pollard, K. Sullivan, y A. R. Lieberman, "A Qualitative and Quantitative Ultrastructural Study of Glial Cells in the Developing Visual Cortex of the Rat," *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 301, no. 1103, pp. 55–84, Apr. 1983.
- [166] P. L. A. Gabbott y M. G. Stewart, "Distribution of neurons and glia in the visual cortex (area 17) of the adult albino rat: A quantitative description," *Neuroscience*, vol. 21, no. 3, pp. 833–845, Jun. 1987.
- [167] D. I. Vaney, "Many diverse types of retinal neurons show tracer coupling when injected with biocytin or Neurobiotin," *Neurosci. Lett.*, vol. 125, no. 2, pp. 187–190, 1991.
- [168] D. C. Spray, "Physiological Properties of Gap Junction Channels in the Nervous System," in *Gap Junctions in the Nervous System*, 1st ed., D. C. Spray y R. Dermietzel, Eds. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag, 1996, pp. 39–59.
- [169] R. Eilam, R. Aharoni, R. Arnon, y R. Malach, "Astrocyte morphology is confined by cortical functional boundaries in mammals ranging from mice to human," *Elife*, vol. 5, no. JUN2016, pp. 1–18, 2016.
- [170] N. G. Hatsopoulos, "Columnar organization in the motor cortex," *Cortex*, vol. 46, no. 2, pp. 270–271, 2010.
- [171] S. K. Wasseff y S. S. Scherer, "Cx32 and Cx47 mediate oligodendrocyte:astrocyte and oligodendrocyte:oligodendrocyte gap junction coupling," *Neurobiol. Dis.*, vol. 42, no. 3, pp. 506–513, 2011.
- [172] A. Rohlmann y J. R. Wolff, "Subcellular Topography and Plasticity of Gap Junction Distribution on Astrocytes," in *Gap Junctions In The Nervous System*, D. C. Spray y R. Dermietzel, Eds. Berlin, Heidelberg: Springer-

Verlag, 1996, pp. 175–190.

- [173] J. R. Wolff, K. Stuke, M. Missler, H. Tytko, P. Schwarz, A. Rohlmann, y T. I. Chao, “Autocellular coupling by gap junctions in cultured astrocytes: A new view on cellular autoregulation during process formation,” *Glia*, vol. 24, no. 1, pp. 121–140, 1998.
- [174] E. Scemes, “Modulation of astrocyte P2Y₁ receptors by the carboxyl terminal domain of the gap junction protein Cx43,” *Glia*, vol. 56, no. 2, pp. 145–153, Jan. 2008.
- [175] L. A. B. Elias, M. Turmaine, J. G. Parnavelas, y A. R. Kriegstein, “Connexin 43 mediates the tangential to radial migratory switch in ventrally derived cortical interneurons,” *J. Neurosci.*, vol. 30, no. 20, pp. 7072–7, 2010.
- [176] D. Manthey, K. Banach, T. Desplantez, C. G. Lee, C. A. Kozak, O. Traub, R. Weingart, y K. Willecke, “Intracellular domains of mouse connexin26 and -30 affect diffusional and electrical properties of gap junction channels,” *J. Membr. Biol.*, vol. 181, pp. 137–148, 2001.
- [177] L. Ben Haim y D. H. Rowitch, “Functional diversity of astrocytes in neural circuit regulation,” *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 18, no. 1, pp. 31–41, Dec. 2016.
- [178] S. L. Mills y S. C. Massey, “The kinetics of tracer movement through homologous gap junctions in the rabbit retina,” *Vis. Neurosci.*, vol. 15, no. 4, pp. 765–77, Mar. 1998.
- [179] P. Kofuji y E. A. Newman, “Potassium buffering in the central nervous system,” *Neuroscience*, vol. 129, no. 4, pp. 1045–1056, 2004.
- [180] K. Holthoff y O. W. Witte, “Directed spatial potassium redistribution in rat neocortex,” *Glia*, vol. 29, no. 3, pp. 288–292, 2000.
- [181] B. Ma, R. Buckalew, Y. Du, C. M. Kiyoshi, C. C. Alford, W. Wang, D. M. Mctigue, J. J. Enyeart, D. Terman, y M. Zhou, “Gap junction coupling confers isopotentiality on astrocyte syncytium,” *Glia*, vol. 64, no. 2, pp. 214–226, 2016.
- [182] J. Freund, A. M. Brandmaier, L. Lewejohann, I. Kirste, M. Kritzler, A. Krüger, N. Sachser, U. Lindenberger, G. Kempermann, A. Kruger, N. Sachser, U. Lindenberger, G. Kempermann, C. Rica, S. Pedro, S. Jose, C. Rica, C. Rica, S. Pedro, S. Jose, C. Rica, C. Rica, S. Pedro, S. Jose, J. Freund, A. M. Brandmaier, L. Lewejohann, I. Kirste, M. Kritzler, A. Kruger, N. Sachser, U. Lindenberger, y G. Kempermann, “Emergence of individuality in genetically

identical mice.” *Science* (80-.), vol. 340, no. 6133, pp. 756–9, 2013.