



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD EN EL HIPOCAMPO POR LA ACTIVACIÓN
DE INTERNEURONAS**

TESIS

QUE PARA OPTAR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

PRESENTA:

LA LIC. EN CIENCIAS GENÓMICAS. STEPHANIE E. VARGAS ABONCE

DIRECTOR DE TESIS:

DR. FERNANDO PEÑA ORTEGA

CIRCUITOS NEURONALES. INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA. UNAM.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DR. VICTOR DE LAFUENTE

**SISTEMAS SENSORIALES Y PLANEACION MOTORA. INSTITUTO DE
NEUROBIOLOGÍA. UNAM.**

DRA. ANAID ANTARAMIAN

UNIDAD DE PROTEOGENÓMICA. INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA. UNAM.

MÉXICO, JULIO 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Neurobiología

Los miembros del Comité Tutorial certificamos que la tesis elaborada por: Stephanie Elizabeth Vargas Abonce, cuyo título es: “Modulación de la actividad en el hipocampo por la activación de interneuronas” se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Firma

Presidente

Dr. José Bargas Díaz

Secretario

Dr. Fernando Peña Ortega

Vocal

Dr. Ataulfo Martínez Torres

Suplente

Dr. Víctor De Lafuente Flores

Suplente

Dr. José Gerardo Rojas Piloni

Aprobado por el Comité Académico

Coordinador del Programa

RESUMEN

MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD EN EL HIPOCAMPO POR LA ACTIVACIÓN DE INTERNEURONAS

Los patrones de actividad poblacional, como los ritmos theta y gamma, han sido observados predominantemente en el hipocampo, durante la locomoción, la orientación, la atención y otros comportamientos voluntarios. Estos ritmos son generados por la actividad de redes de interneuronas GABAérgicas distintas, las cuales modulan la actividad oscilatoria de las neuronas principales con las que hacen contacto. Con la finalidad de evaluar la contribución de las interneuronas GABAérgicas en la generación de estos ritmos, actualmente se exploran estrategias farmacológicas y no farmacológicas. En este trabajo se hizo un estudio comparativo de la activación de las interneuronas GABAérgicas sobre las oscilaciones hipocampales producidas *in vitro*, utilizando como herramientas a la neuregulina 1 (NRG1), así como la optogenética. Se analizaron los efectos de la NRG1 sobre la actividad espontánea de campo registrada en rebanadas de hipocampo y se encontró que la aplicación aguda de la NRG1 inhibe, de manera dependiente de la concentración, la potencia de la actividad espontánea hipocampal. El efecto inhibitorio de la NRG1 es reversible y depende de la transmisión GABAérgica pues es eliminado en presencia de bicuculina. Si bien la NRG1 mostró una tendencia a acelerar la actividad hipocampal (aumento en la frecuencia pico), dicho efecto no fue significativo. De lo anterior, concluimos que la aplicación de la NRG1 resulta en una inhibición generalizada de la actividad hipocampal que no permite evaluar fielmente el papel de las interneuronas en la generación de los distintos ritmos hipocampales. Por otra parte, se utilizó la técnica de optogenética, mediante la expresión específica de la Channelrhodopsina 2 (ChR2) en interneuronas del hipocampo. La activación de las interneuronas con luz azul, a distintas frecuencias, produjo un aumento de la actividad de campo local. La actividad del hipocampo se moduló preferencialmente en la frecuencia de 5 Hz que se encuentra dentro del rango theta. Se concluye que la activación optogenética de las interneuronas GABAérgicas modifica la dinámica del circuito hipocampal en ventanas temporales y en frecuencias de importancia fisiológica.

SUMMARY

MODULATION OF HIPPOCAMPAL ACTIVITY BY INTERNEURON ACTIVATION

Different neural population patterns, such as theta and gamma rhythms, have been observed predominantly in the hippocampus during locomotion, orientation, attention and other voluntary behaviors. These rhythms depend on different GABAergic interneuronal networks. To assess this relationship, pharmacological and non-pharmacological strategies are currently being explored to study the contribution of GABAergic interneurons in the generation of these rhythms. This study aimed to compare the activation of GABAergic interneurons by means of neuregulin 1 (NRG1) and optogenetics on hippocampal oscillations produced *in vitro*. NRG1 reduced the power of the spontaneous hippocampal network activity in a concentration-dependent manner. The inhibitory effect of NRG1 is reversible and depends on GABAergic transmission since it is prevented in the presence of bicuculline. NRG1 tended to accelerate hippocampal network activity (increase in peak frequency); however this effect was not significant. Based on these results, we conclude that application of NRG1 results in a generalized inhibition of hippocampal network activity such that the role of specific interneurons in the generation of hippocampal rhythms cannot be accurately evaluated. To accomplish this goal we used optogenetics, by specifically expressing Channelrhodopsin 2 (ChR2) in interneurons. The activation of the interneurons with blue light, at different frequencies, increased hippocampal network activity. Interestingly, the hippocampal activity was modulated at the frequency of 5 Hz which falls within the theta range. Thus, we conclude that the optogenetic activation of GABAergic interneurons modifies the hippocampal circuit dynamics in physiological time frames and frequencies.

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos a:

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Becario No: 288812/275145

A la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM. Becario No.:
40601719-8

Donativos:

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT): Proyectos 151261 y
181323

Dirección General de Asuntos del Personal Académico- UNAM: Proyectos
IACODI1201511, IB200212-RR280212-24

Alzheimer's Association: Proyecto NIRG-11-205443

Se Agradece enormemente el apoyo brindado por:

Unidad de Proteogenómica: Dra. Anaid Antaramian y a la M. en C. Adriana
González-Gallardo por el apoyo proporcionado en el proceso de genotipificación
de transgénicos, su asesoría en el uso de los vectores virales, por proporcionarnos
el Vector Viral que expresa GFP y por su disposición para apoyar el proyecto en
todo momento.

Bioterio: Al MVZ. José Martín García Servín por estar disponible para resolver
todas las cuestiones respecto al cuidado y atención de los animales en el Bioterio.
Por su apoyo en la obtención del material biológico para la genotipificación y por
todas las atenciones prestadas en todos los aspectos del servicio.

A la MVZ. Alejandra por prestar sus atenciones cuando se requirió de su
conocimiento y manejo de los animales utilizados.

El Dr. Alfredo Varela Echavarría. Por proporcionarnos los ratones transgénicos
CRE/GAD y el material necesario para su caracterización genética y en particular
a la M. en C. Daniela Frade por su apoyo en la genotipificación de los animales y
sus acertados comentarios respecto a este proceso.

Un agradecimiento muy especial a los miembros del laboratorio que apoyaron determinantemente con el desarrollo de este proyecto:

Particularmente al Dr. Benito Ordaz, por su tutoría en la metodología utilizada en el laboratorio, por su disposición a siempre contestar dudas técnicas y académicas y en especial por su ayuda en la obtención de la preparación de hipocampos completos y ritmos theta, ya que sin su participación, esta parte del proyecto no hubiera sido posible.

Al M. en C. Reynaldo Alvarado y al Med. Cir. Andrés Nieto Posadas así como al Biol. Jonathan Lorea por su apoyo en la realización de los experimentos en el multiarreglo de electrodos.

Al Biol. Abraham Márquez por su enseñanza y acertados comentarios en la estandarización de la microinyección en Hipocampo.

Y en general a todos los compañeros del laboratorio que de alguna manera u otra siempre estuvieron para apoyar tanto en cuestiones técnicas, como académicas e incluso personales, ya que sin la participación de todos, el éxito en la realización de este trabajo de investigación hubiese sido inalcanzable.

Y el agradecimiento más enorme al Dr. Fernando Peña Ortega por la oportunidad irrepetible y única de formar parte de su laboratorio, por ser más que un tutor, un mentor o un maestro, representado siempre la guía y el apoyo sustancial para todas y cada una de las etapas de este proyecto. Por sus siempre acertados comentarios y sugerencias, por sus correcciones y enseñanzas, por la presión que siempre es necesaria para concluir un posgrado, por su constancia, su esfuerzo, su dedicación, creatividad y seguimiento de los proyectos que se llevan a cabo en su laboratorio, siempre le estaré inmensamente agradecida.

Agradecimientos infinitos a toda la comunidad del INB y todas las personas que directa o indirectamente contribuyeron con esta tesis de maestría.

Contenido

1. INTRODUCCIÓN.....	10
2. MARCO TEÓRICO	12
2.1 EL HIPOCAMPO Y LAS INTERNEURONAS.....	12
2.2 OSCILACIONES HIPOCAMPALES.....	18
2.3 EL SISTEMA NEUREGULINA/ERBB4 Y SU IMPORTANCIA EN LA MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD EN EL SISTEMA NERVIOSO.	20
2.3.1 EXPRESIÓN SELECTIVA DEL RECEPTOR ERBB4	20
2.3.2 FUNCIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN NRG1/ERBB4	23
2.4 OPTOGENÉTICA	26
2.4.1 GENES DE OPSINAS MICROBIALES	27
2.4.2 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA CHR2.....	28
2.4.3 FOTOCICLO Y PROPIEDADES DE LA CHANELRODOPSINA-2 (CHR2).....	32
2.4.4 EJEMPLOS DE CONTROL DE LA ACTIVIDAD DE CIRCUITOS NEURONALES A TRAVÉS DE LA ACTIVACIÓN OPTOGENÉTICA DE INTERNEURONAS.....	34
3. JUSTIFICACIÓN	40
4. HIPÓTESIS.....	42
5. OBJETIVOS.....	42
5.1 OBJETIVOS PARTICULARES	42
6. SUJETOS, MATERIALES Y MÉTODOS	43
6.1 MODELO EXPERIMENTAL.....	43
6.2 CIRUGÍA ESTEREOTÁXICA Y MICROINYECCIÓN.....	44
6.3 EXTRACCIÓN DE HIPOCAMPO COMPLETO	44
6.4 OBTENCIÓN DE REBANADAS DE HIPOCAMPO	44
6.5 REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS	45
6.5.1 REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS DE CAMPO.	45
6.6 GENOTIPIFICACIÓN DE ANIMALES TRANSGÉNICOS	46
6.6.1 LISIS DEL TEJIDO Y EXTRACCIÓN DE ADN.....	46
6.6.2 REACCIÓN DE PCR.....	47
6.6.3 GEL DE AGAROSA AL 1.6%	47

6.7 PROTOCOLO DE APLICACIÓN DE LA NRG1 A PREPARACIONES <i>IN VITRO</i> ...	47
6.8 PROTOCOLO DE ESTIMULACIÓN CON LUZ	49
6.9 ANÁLISIS DE LOS ESPECTROS DE POTENCIA.....	50
6.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	51
7. RESULTADOS	52
7.1 ESTABLECIMIENTO DE LAS COORDENADAS DE MICROINYECCIÓN.....	52
7.2 GENOTIPIFICACIÓN DE LOS RATONES TRANSGÉNICOS.....	55
7.3 REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS DE CAMPO.....	56
7.3.1 COMPARACION DE LA ACTIVIDAD CONTROL A LO LARGO DEL TIEMPO.	56
7.3.2 EFECTO DE LA MICROINYECCIÓN VIRAL SOBRE LA ACTIVIDAD HIPOCAMPAL.....	58
7.3.3 EFECTO DE LA NRG1 SOBRE LA ACTIVIDAD HIPOCAMPAL <i>IN VITRO</i>	60
7.3.4 PAPEL DE LA TRANSMISIÓN GABAÉRGICA EN LOS EFECTOS DE LA NRG1.....	62
7.3.5 EFECTO DE LA NRG1 SOBRE LA FRECUENCIA PICO DE LA ACTIVIDAD POBLACIONAL EN EL HIPOCAMPO.....	63
7.3.6 EFECTO DE LA NRG1 EN LA GENERACIÓN DE RITMOS THETA.....	64
7.3.7 EFECTO DE LA NRG1 SOBRE LA FRECUENCIA PICO DURANTE LA GENERACIÓN DE RITMOS.....	66
7.3.8 EFECTO DE LA ESTIMULACIÓN CON LUZ	67
7.3.9 ACTIVACIÓN OPTOGENETICA.....	69
7.3.10 PAPEL DE LA TRANSMISIÓN SINAPTICA EN LOS EFECTOS DE LA ESTIMULACIÓN OPTOGENÉTICA SOBRE LA ACTIVIDAD DE CAMPO ESPONTÁNEA	71
7.3.11 ANALISIS DEL EFECTO DE LA ACTIVACIÓN OPTOGENÉTICA POR FRECUENCIA DE ESTIMULACIÓN	72
7.3.12 EFECTO DE LA ESTIMULACION SOBRE LA FRECUENCIA PICO DE LA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA HIPOCAMPAL.....	73
7.3.13 EFECTO DEL AGONISTA GABAÉRGICO MUSCIMOL SOBRE LA ACTIVIDAD DE CAMPO ESPONTÁNEA DE ANIMALES DE 21 DÍAS DE EDAD.	74
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	76
8.1 OPTOGENÉTICA VS FARMACOLOGÍA. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DEL USO DE AMBAS TÉCNICAS.....	76

8.2 EL USO DE LA OPTOGENÉTICA COMO MÉTODO DE ACTIVACIÓN INTERNEURONAL RESULTA EN UNA ACTIVACIÓN DEL CIRCUÍTO HIPOCAMPAL.	84
8.3 LA RESPUESTA DEL CIRCUÍTO HIPOCAMPAL DEPENDE DE LAS FRECUENCIAS DE ESTIMULACIÓN OPTOGENÉTICA.....	85
8.4 LA GENERACIÓN DE RITMOS HIPOCAMPALES DEPENDE DE LA MODULACIÓN INHIBITORIA Y LAS DINÁMICAS NEURONALES SUBSECUENTES. 89	
8.4 POSIBLES IMPLICACIONES FISIOLÓGICAS DE LA GENERACIÓN DE RITMOS MEDIANTE TÉCNICAS OPTOGENÉTICAS	90
9. CONCLUSIONES	93
10. BIBLIOGRAFÍA	94
<i>ANEXO 1.- Propiedades de las interneuronas</i>	<i>133</i>
<i>ANEXO 2.- Vector viral y Recombinación CRE-Dependiente.....</i>	<i>134</i>

1. INTRODUCCIÓN

La generación de conductas complejas y procesos cognitivos de orden superior, dependen de la actividad sincrónica y organizada de grupos neuronales, más que de la actividad de elementos neuronales únicos (Amaral, 1993, Ylinen, *et al*, 1995, Longacher y Staley, 1999, Brunn, *et al*, 2002, Benchenane, *et al*, 2010 y Verret, *et al*, 2012). Esta actividad permite la generación de ritmos específicos (por ejemplo, los ritmos theta y gamma) que han sido asociados con la exploración, la orientación espacial, el aprendizaje y la memoria (Lacaille, *et al*, 1987, Mehta, Lee y Wilson, 2002, Tucker, 2007, Uhlhaas y Singer, 2010 y Benchenane, *et al*, 2010). Estos ritmos, observados en diversas estructuras como el hipocampo, sincronizan la actividad neuronal no sólo dentro de la estructura hipocampal, sino de todas las estructuras que reciben entradas sinápticas de los distintos estratos del hipocampo (Braak, 1974, Buhl, Halasy y Somogyi, 1994, Buzsáki, *et al*, 1994, Jones y Wilson, 2005, Cenquizca y Swanson, 2006 y Dembrow, Chitwood y Johnston, 2010). Para estudiar las redes neuronales involucradas en la generación de actividad rítmica, es necesario controlar a los elementos neuronales de estas redes (es decir activarlos o inactivarlos) de manera específica y simultánea en escalas temporales del orden de los milisegundos (Cardín, *et al*, 2009). Este abordaje experimental es muy difícil con técnicas farmacológicas y electrofisiológicas clásicas debido a las cinéticas lentas de los fármacos disponibles y a la inespecificidad de la estimulación eléctrica en las preparaciones más utilizadas (Sah, Hestrin y Nicoll, 1990, Staley, *et al*, 2001, Tucker, 2007, Moore, Cooper y Sprutson, 2009 y Packer y Yuste, 2011). Por ejemplo, en esta tesis se muestra que la activación de subtipos de interneuronas responsivas a la Neuregulina 1 produce una inhibición generalizada y sostenida de la actividad hipocampal. Esta inhibición generalizada imposibilita el estudio de las dinámicas de la red hipocampal y, más aún, el análisis del papel de las interneuronas en estas dinámicas (Buonanno y Fischbach, 2001, Fisahn, *et al*, 2009, Wen, *et al*, 2010, Ting, *et al*, 2011 y Li, *et al*, 2012). El descubrimiento de que se pueden expresar proteínas transmembranales microbiales en células neuronales de mamíferos –las cuales responden, con cinéticas de apertura y cerrado muy

rápidas, a la estimulación con luz- ha permitido que estas limitaciones se superen y que se utilice esta técnica para estudiar la participación de tipos celulares específicos en la dinámica de las redes neuronales que subyacen los procesos conductuales y cognitivos conocidos (Banghart, *et al*, 2004, Zhang, *et al*, 2006, Plazzo, *et al*, 2011 y Han y Dorby, 2010). Así pues, la optogenética nos permite aplicar protocolos de inhibición o reclutamiento de neuronas específicas con las ventajas de ser un método poco invasivo y de ser altamente específico. La especificidad se basa en que se puede transfectar un subgrupo neuronal deseado mediante el uso de constructos virales que infectarán únicamente las células de interés (Boyden, *et al*, 2005, Adamantidis, *et al*, 2007, Chow, Han y Dobry, 2010, Smear, *et al*, 2013 y Kohara,*et al*, 2014) o, en nuestro caso, la expresión de las opsinas en tipos celulares que han sido modificados genéticamente para permitir la expresión de constructos específicos (Potter, *et al*, 2009, Zhao, *et al*, 2011 y Kohara, *et al*, 2014). Sea cual fuere el método de expresión específico, la optogenética permite activar o inhibir grupos neuronales de manera simultánea y efectiva en ventanas temporales de importancia fisiológica, evitando con esto los efectos no-específicos de la estimulación eléctrica o la manipulación farmacológica (Boyden, *et al*, 2005, Zhang, *et al*, 2008, Cardín, *et al*, 2009, Gradinaru, *et al*, 2010 y LaLumiere, 2010).

2. MARCO TEÓRICO

2.1 EL HIPOCAMPO Y LAS INTERNEURONAS

La formación hipocámpal está constituida por el giro dentado, el hipocampo propio (que puede ser dividido en tres subcampos, CA1, CA2 y CA3), el complejo subicular (que también puede dividirse en tres subdivisiones: el subiculum, presubiculum y parasubiculum) y la corteza entorrinal que es generalmente dividida en subdivisiones medias y laterales (Amaral, 1978). La estructura tridimensional de la formación hipocámpal es compleja, pues aparece como una estructura elongada cuyo eje provee una forma de “C” desde el núcleo septal rostro-dorsal al lóbulo temporal incipiente caudo-ventral (Amaral y Witter, 1988).

Los campos de la formación hipocámpal están relacionados por conexiones unidireccionales largas y únicas (Blackstad, 1956, Raisman, Cowan y Powell, 1965 y Ramón y Cajal, 1893, 1911). El giro dentado recibe la mayoría de sus entradas de la corteza entorrinal a través de la “vía perforante” y las células granulares del giro dentado proyectan a través de sus fibras “musgosas” al campo CA3 del hipocampo (Andersen, *et al*, 1968 y Gaarskjaer, 1978). Las células piramidales de CA3 dan origen a axones colateralizados que terminan dentro de CA3 como conexiones asociativas y proveen la mayoría de las entradas al campo CA1 en un haz de fibras conocidas como las “colaterales de Schaffer” (Hjorth-Simonsen, 1973). Finalmente, las neuronas piramidales de CA1 y las neuronas del *subiculum* proyectan de regreso a la corteza entorrinal a través de las “fibras alveares” (Kohler, 1988). El “circuito trisináptico de Amaral” describe la ruta de activación del hipocampo a partir de la activación de la corteza entorrinal que resultará en la activación de toda la estructura por las cuatro rutas descritas en sucesión (La vía perforante, las fibras musgosas, las colaterales de Schaffer y finalmente las fibras alveares de CA1) (Amaral y Witter, 1989). Aun cuando este modelo simplificado del circuito hipocámpal se utiliza comúnmente en la investigación (Hasselmo, 2005), se debe tener en cuenta que la circuitería del hipocampo es mucho más

compleja. En primer lugar, existen dos proyecciones distintas de la corteza entorhinal que contribuyen, más allá del giro dentado, con fibras hacia todos los campos de la formación hipocampal y al subiculum (Steward y Scoville, 1976 y Witter y Amaral, 1991). Por otro lado la proyección a CA1 puede ser representada como un axón simple que termina uniformemente en este campo, pero la proyección de CA3 a CA1 surge de axones altamente colateralizados de las células piramidales que contribuyen a distintas ramas de CA1 (Tamanaki, Abe y Nojyo, 1988 e Ishizuka, Weber y Amaral, 1990). Más aún, subgrupos de células en CA1 son invadidas preferencialmente por subgrupos de células de CA3 (Ishizuka, Weber y Amaral, 1990). Finalmente, la proyección principal de CA1 al subiculum no se incluye en el modelo clásico (Tamanaki y Nojyo, 1990 y Amaral, Dolorfo y Alvarez-Royo, 1991). Estos son ejemplos que muestran la complejidad intrínseca de la formación hipocampal (Amaral, 1993 y Hasselmo, 2005).

El área CA1 del hipocampo constituye una estructura en la que las células piramidales codifican representaciones de memorias espaciales y episódicas y proveen la salida glutamatérgica a otras áreas corticales y subcorticales (Giocomo y Hasselmo, 2007, Klausberger y Somogi, 2008 y Graves, *et al*, 2012). Para llevar a cabo estas funciones, la actividad de las células piramidales se encuentra regulada por una gran diversidad de interneuronas GABAérgicas que proveen una inhibición específica y que regulan la actividad piramidal de una manera sincronizada (Jonas, *et al*, 2003, Cenquizca y Swanson, 2006 y Gulyás *et al*, 1999).

Las células piramidales (también conocidas como células principales), son neuronas con un soma de morfología piramidal y dos árboles dendríticos distintos (Braak, 1974 y Braak, 1983). Se encuentran en estructuras como la corteza cerebral, el hipocampo y la amígdala, pero no en el bulbo olfatorio o la columna vertebral. Son las células excitatorias más numerosas en las estructuras corticales de mamíferos (Olbrich y Braak, 1985), sugiriendo que tienen un papel sustancial en las funciones cognitivas de orden superior (Lacaille, *et al*, 1987, Ishizuka, Weber

y Amaral, 1990 Kamondi, *et al*, 1997, Jones y Wilson, 2005 y Kesner, Hunsaker y Gilbert, 2005). La estructura de las neuronas piramidales, aun cuando es estereotípica, es muy variable, tanto entre regiones (hipocampo vs neocortezas) como dentro de ellas (por ejemplo la capa II vs la capa V en la corteza) (Gaarskjaer, 1978, Fox, 1989, Staff, *et al*, 2000 y Graves, *et al*, 2012). En el hipocampo, la morfología piramidal se caracteriza por la presencia de árboles dendríticos basales y apicales, los cuales surgen del soma piramidal y se ramifican varias veces hasta la punta en el caso de las dendritas basales y se extienden varios cientos de micras antes de la ramificación para formar el penacho apical (el cual consiste de dendritas ramificadas pocas veces antes de la punta) en el caso de las dendritas apicales. (Lorente de Nó, 1934, Schwartzkroin y Mathers, 1978 y Braitenberg y Schiiz, 1983). Las neuronas piramidales reciben entradas sinápticas de decenas de miles de sinapsis excitatorias y algunos miles de sinapsis inhibitorias (Häusser, Spruston y Stuart, 2000, Dembrow, Chitwood y Johnston, 2010 y Graves, *et al*, 2012). La mayoría de las entradas excitatorias utilizan el glutamato como neurotransmisor (Giocomo y Hasselmo, 2007, Moore, Cooper y Spruston, 2009 y Niswender y Conn, 2010), mientras que las entradas inhibitorias utilizan GABA (Freund y Buzsáki, 1996, Staff,*et al*, 2000 y Klausberger y Somogyi, 2008). Las interneuronas GABAérgicas constituyen únicamente el 20% de las neuronas hipocampales (Cassell y Brown, 1977 y Krook-Magnuson,*et al*, 2012), pero son cruciales para regular el funcionamiento de los circuitos locales encargados de las funciones sensoriales, motoras y cognitivas de los organismos (Benchenane, *et al*, 2010), al inervar diferencialmente distintos dominios de las células principales, generando con esto respuestas específicas de las poblaciones neuronales en estructuras como el hipocampo y la corteza (Krook-Magnuson,*et al*, 2012). Estos dos tipos celulares (neuronas principales e interneuronas) pueden distinguirse tanto morfológicamente como por sus características electrofisiológicas (Sik, *et al*, 1994, 1995, Klausberger, *et al*, 2003 y Jonas, *et al*, 2003, Anexo 1.).

El grupo de Somogyi ha descrito el disparo específico de interneuronas *in vivo* durante la generación de diversos patrones de oscilación poblacional (Klausbergery Somogyi, 2008). Este grupo (y otros) han demostrado que, bajo una variedad de condiciones conductuales, las interneuronas generan potenciales de acción sincronizados a fases específicas de los ciclos oscilatorios theta, gamma y oscilaciones de alta frecuencia (Han, *et al*, 1993, Buhl, Halasy y Somogy, 1994, Cobb, *et al*, 1995 y Klausberger, *et al*, 2003). Observaron que tres subtipos interneuronales distintos (interneuronas canasta, axo-axónicas y O-LM), definidos por su conectividad sináptica así como por marcadores moleculares, contribuyen de manera diferencial a las oscilaciones theta y a las *Sharp-wave ripples* (Anexo, Figura 2.1.1), y que estos subtipos interneuronales muestran una clara preferencia de fase: Las Células piramidales disparan preferencialmente a los 20° del ángulo medio de la oscilación theta, las interneuronas positivas para parvalbumina (PV+) disparan preferencialmente a los 271° ángulo medio de la oscilación theta, las interneuronas axo-axónicas disparan preferencialmente a los 185° ángulo medio de la oscilación theta y las interneuronas oriens-lacunosum moleculare (O-LM) disparan preferencialmente a los 19° del ángulo medio de la oscilación theta (Anexo; Figura 2.1.1).

La gran diversidad de interneuronas GABAérgicas evolucionó para controlar la actividad de las células piramidales de la siguiente forma: durante la actividad theta, las células de CA1 se activan principalmente por la vía perforante (Nakazawa, *et al*, 2002 y Brun, *et al*, 2002). Las células O-LM, cuyos axones se coalinean con la entrada de la vía perforante, disparan coincidentemente con la hiperpolarización más fuerte en las dendritas distales de las células piramidales (Buzsáki, 2002). De esta forma, las interneuronas O-LM modulan el procesamiento de la información excitatoria en fase desde de la vía perforante al generar una hiperpolarización rítmica que podría desinactivar los canales iónicos sensibles a voltaje y facilitar la propagación somato dendrítica de los potenciales de acción (Sprutson, *et al*, 1995) y las ráfagas de potenciales de acción (Harris, *et al*, 2001).

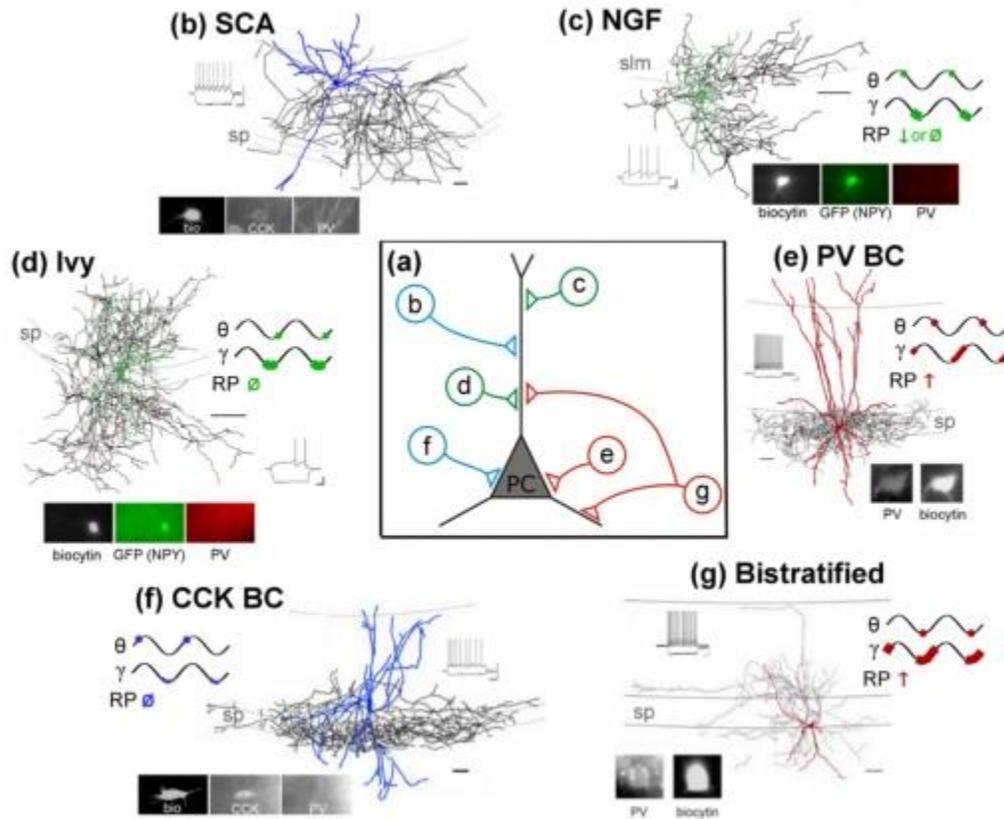


Figura 2.1.1. Diversidad anatómica y funcional de las interneuronas hipocámpales.

Tan sólo en CA1, se han encontrado cuando menos 21 tipos diferentes de interneuronas, incluyendo las asociadas a las colaterales de Schaffer (SCA; **b**), las neurogliaformes (NGF; **c**), las células Ivy (**d**), interneuronas de canasta (BC; **e-f**) y las biestratificadas (**g**), entre muchas otras no mostradas. Estas células expresan diferentes marcadores moleculares, incluyendo Coleocistoquinina (CCK; azul), parvalbumina (PV; rojo), y el neuropéptido Y (NPY; verde) y tienen por blanco distintas regiones a lo largo de los ejes axo-somato-dendríticos de las neuronas principales postsinápticas (PC; **a**). De igual manera, estos subtipos interneuronales pueden ser clasificados por sus patrones de disparo (mostrados a los lados, actividad registrada *in vitro*) y sus morfologías (marcadas en color para cada caso). Nótese que estas células tienen patrones de disparo asociados con distintas fases de los ritmos theta y gamma (mostrados como θ y γ ; las marcas de colores sobre las oscilaciones indican el tiempo relativo del pico de la tasa de disparo para cada subtipo interneuronal) y actividad asociada que aumenta (RP \uparrow) disminuye (RP \downarrow) o no cambia (RP \emptyset) durante la generación de Sharp Wave Ripples. Tomada de Krook-Magnuson, *et al*, 2011.

Las células axo-axónicas y las células de canasta presentan descargas en la fase descendente de los ciclos theta cuando las descargas de las neuronas piramidales son mínimas y la potencia en gamma está en su pico máximo, lo que permite restringir el disparo de la neurona piramidal a una ventana temporal muy estricta y, simultáneamente, favorecer la desactivación de los canales sensibles a voltaje para la generación de ulteriores espigas (Fox, 1989, Buzsáki, 2002, Skaggs, *et al*, 1996, Mehta, Lee y Wilson, 2002 y Harris, *et al*, 2002).

En general, la gran mayoría de las interneuronas muestran oscilaciones intrínsecas durante la aplicación de una corriente despolarizante sostenida (usualmente <50 pA) (Chapman y Lacaille, 1999) que coloca el potencial de membrana en valores apenas por debajo del umbral (Ylinen, 1995 y Cobb, *et al*, 1995). Dependiendo del tipo neuronal, estas oscilaciones subumbrales se generan con frecuencias en los rangos theta (interneuronas O-LM y PV) (Tukker, 2007, Klausberger y Somogyi, 2008 y Krook-Magnuson, *et al*, 2012) y gamma (interneuronas NGF y Ivy) (Fuentealba, *et al*, 2008 y Krook-Magnuson, *et al*, 2011). Esta actividad intrínseca fue descrita desde 1999 por Chapman y Lacaille. Estos autores demostraron que las oscilaciones intrínsecas no dependen de transmisión sináptica -ya que el bloqueo de la transmisión glutamatérgica y GABAérgica no afecta la generación de las oscilaciones- sino que son generadas por la interacción de canales de Na⁺ (el uso de tetrotoxina para bloquear las corrientes de Sodio inhibe las oscilaciones) y de K⁺ (aplicación de Ba²⁺ reduce las oscilaciones) embebidos en la membrana de las interneuronas O-LM. Estas oscilaciones subumbrales favorecen un comportamiento resonante que permite a las neuronas que las generan participar eficientemente en comportamientos oscilatorios rítmicos específicos (Chapman y Lacaille, 1999). Es así que las interneuronas juegan un papel sustancial en las oscilaciones de la red hipocampal (Klausberger, 2009, Freund, 2003 y Packer y Yuste, 2011) ya que regulan el disparo sincrónico de las neuronas principales en el hipocampo mediante disparos específicos a lo largo de las distintas fases de los ritmos theta y gamma y sus

conexiones con distintas zonas de las células piramidales (Tukker, 2007, Olah, *et al*, 2009 y Krook-Magnuson, *et al*, 2012).

2.2 OSCILACIONES HIPOCAMPALES

La actividad rítmica y coordinada de las poblaciones neuronales da origen a oscilaciones en potenciales de campo locales (LFP por sus siglas en inglés de *Local Field Potential*) en un rango amplio de frecuencias (Bullock, Buzsáki y McClune, 1989, Buzsáki, *et al*, 1994 y Cobb, *et al*, 1995). A través del cerebro, estas oscilaciones constituyen un mecanismo de sincronización mediante el cual se referencia y coordina la temporalidad del disparo neuronal (Fox, 1989, Buzsáki, 2002, Hefft y Jonas, 2005 y Benchenane, *et al*, 2010). Una sincronización anormal puede dar origen a interacciones disfuncionales y contribuir al desarrollo de desórdenes cognitivos complejos como los que se observan en la esquizofrenia (Corfas, Roy y Buxbaum, 2004, Mei y Xiong, 2008, Uhlhaas y Singer, 2010 y Neddens, *et al*, 2010) y en la Enfermedad de Alzheimer (Nakazawa, *et al*, 2002, Hunsaker, Lee y Kesner, 2008 y Verret, *et al*, 2012). Ejemplos de esta actividad poblacional coordinada son los ritmos theta que son oscilaciones de 4 a 12 Hz que se encuentran consistentemente asociadas, en conjunto con las oscilaciones gamma (30-80Hz), con comportamientos complejos como la toma de decisiones, la exploración espacial, la memoria de trabajo y la navegación (Amaral, 1993, Wang y Buzsáki, 1996 y Jones y Wilson, 2005). Por su parte las *sharp wave ripples* (100 a 200 Hz) ocurren durante el reposo, la consolidación de la memoria y el sueño de ondas lentas (Buzsáki, *et al*, 1992, Ylinen, *et al*, 1995 y Brunn, *et al*, 2002).

Los ritmos theta se generan en muchas estructuras cerebrales a lo largo del linaje de los mamíferos (Klausberger, *et al*, 2003, Jones y Wilson, 2005 y Benchenane *et al*, 2010). Entre las más estudiadas, se encuentran: el complejo subicular, la corteza entorhinal, la corteza perirhinal, la corteza del cíngulo y la amígdala, que han sido propuestas como los generadores del ritmo theta (Chapman y Lacaille,

1999 y Hefft y Jonas, 2005). Estos ritmos son más prominentes en el hipocampo, particularmente en el estrato lacunosum-moleculare de la región CA1 y se encuentran presentes también en el giro dentado y en la región CA3 del hipocampo (Kubie, Muller y Bostock, 1990, Bullock, Buzsáki y McClune, 1989 y Harris, *et al*, 2002). En el hipocampo, el ritmo theta depende estrechamente de la actividad de las interneuronas GABAérgicas (Buckmaster y Schartzkroin, 1995, Freund y Buzsáki, 1996 y Kamondi, *et al*, 1997) ya que éstas inhiben los potenciales de acción en las células piramidales de manera rítmica, determinando la amplitud y la distribución de fase de las ondas theta en la región CA1 (Chapman y Lacaille, 1999 y Freund, 2003).

Como es bien reconocido, y se describe en la Anexo, en el hipocampo hay cuando menos 21 tipos de interneuronas inhibitorias descritas, estas pueden reconocerse por sus características morfológicas, propiedades funcionales -por ejemplo propiedades electrofisiológicas intrínsecas y disparo específico durante las oscilaciones theta- y sus características moleculares -por ejemplo la expresión de proteínas de unión a calcio, neuropéptidos y factores de transcripción (Heff y Jonas, 2005, Soltresz, 2005, Fuentealba, *et al*, 2008 y Klausber, 2009). Esta última característica de particular importancia cuando se desea estudiar o manipular experimentalmente un subtipo de interneuronas de interés (Kim, *et al*, 2009, Fung, *et al*, 2010 y Lawrence, *et al*, 2010). Las interneuronas positivas para parvalbumina (PV+), las positivas para colecistocinina (CCK+), las axo-axónicas y las positivas para somastatina (SOM) expresan, por ejemplo, el receptor ErbB4 (Ozaki, Kishigami y Yano, 1998, Fox y Kornblum, 2005 y Neddens y Buonanno, 2010) el cual, además, no es expresado por las neuronas piramidales (Vullhorst, *et al*, 2009 y Neddens, *et al*, 2011). Por ello, se ha propuesto que se pueden utilizar agonistas de los receptores ErbB4 para activar de manera selectiva a grupos de interneuronas y no a neuronas piramidales (Wen, *et al*, 2010 y Janssen, Leiva-Salcedo y Buonanno, 2012). Las características del receptor ErbB4, su ligando endógeno y las vías de señalización que desencadena su activación se explicarán más a detalle a continuación.

2.3 EL SISTEMA NEUREGULINA/ERBB4 Y SU IMPORTANCIA EN LA MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD EN EL SISTEMA NERVIOSO.

2.3.1 EXPRESIÓN SELECTIVA DEL RECEPTOR ERBB4

La familia de factores tróficos del tipo Neuregulina 1 (NRG1) actúa estimulando la familia de receptores tirosin quinasa ErbB (Corfas, Roy y Buxbaum 2004). Específicamente, la NRG1 se une únicamente a ErbB3 o 4, siendo el receptor ErbB4 el que presenta una mayor respuesta a la estimulación por NRG1 (Mei y Xiong, 2008). Tanto la NRG1 como sus receptores se encuentran distribuidos a lo largo de las regiones cerebrales críticas para funciones cognitivas y asociativas en los animales adultos (Gerecke, *et al*, 2001), lo que sugiere que este neuromodulador regula la actividad de estos circuitos neuronales en el cerebro adulto (Chen, *et al*, 1994). Durante el desarrollo, las neuregulinas promueven la migración neuronal de las interneuronas e incrementan selectivamente la expresión de receptores para múltiples neurotransmisores como dopamina (Kwon, *et al*, 2008), nicotina (Yang, *et al*, 1998) y glutamato (Li, *et al*, 2007 y Chen, Zhang y Yin, 2010).

Los receptores ErbB2, ErbB3 y ErbB4 son miembros de la subfamilia de receptores tirosin-quinasa EGF (siglas en inglés para “factores de crecimiento epidermal”) (Burden y Yarden, 1997) que comparten una arquitectura molecular común que consiste de un dominio extracelular ampliamente glicosilado al que se unen sus ligandos, las Neuregulinas, (Chang, *et al*, 1997, Higashiyama, *et al*, 1997 y Zhang, *et al*, 1997). Además poseen una región transmembranal hidrofóbica (Gerecke, *et al*, 2001), y un dominio citoplásmico que contiene la actividad tirosin quinasa (Pinkas-Kramarski, *et al*, 1998). A pesar de su similitud estructural y funcionalidad, cada uno de estos receptores muestra una especificidad diferente por las neuregulinas, (Pinkas-Kramarski, *et al*, 1996, Olayioye, *et al*, 1998 y Jones, Akita y Sliwkowski, 1999) NRG-1 y -2 se unen directamente con ErbB-3 y -4 (Carraway, *et al*, 1997) mientras que NRG-3 y -4 se unen preferencialmente con ErbB-4 (Zhang, *et al*, 1997 y Harari, *et al*, 1999) y NRG-1 y -3 muestran todavía

más preferencia por los receptores ErbB-3 y -4 en su estado homodimérico que heterodimérico (Jones, Akita y Sliwkowski, 1999). Las neuregulinas regulan diversas actividades a través de interacciones con los receptores ErbB en su forma homo u heterodimérica con lo cual activan la vía de señalización intracelular de las tirosin quinasas (Buonanno y Fischbach, 2001). Lo anterior desencadena eventos que van desde la maduración y plasticidad de las sinapsis glutamatérgicas (Li, Woo y Malinow, 2007), el desarrollo neuronal (Mei y Xiong, 2008), el desarrollo de sinapsis excitatorias en las interneuronas (Ting, *et al*, 2011) y la potenciación a largo plazo (Chen, Zhang y Yin, 2010). Las alteraciones en esta vía se asocian a desórdenes como la esquizofrenia (Corfas, Roy y Buxbaum, 2004, Kwon, *et al*, 2008 y Mei y Xiong, 2008) y la epilepsia (Iyengar y Mott, 2008 y Li, *et al*, 2012).

Ya desde 1998, Ozaki y colaboradores describieron una expresión constante del receptor ErbB2 y ErbB4 en las células neuronales durante las primeras 2-3 semanas posnatales, sugiriendo que la dimerización de estos receptores (ya sea en la forma heterodimérica ErbB2/ErbB4 u homodimérica ErbB4/ErbB4) debe ser importante para eventos tales como la migración de las células granulares, las conexiones neuronales y la formación de sinapsis (Ozaki, *et al*, 2004). De manera relevante para este proyecto, el mRNA del receptor ErbB4 se encuentra sólo en las interneuronas (Vullhorst, *et al*, 2009, Neddens, *et al*, 2011 y Janssen, Leiva-Salcedo y Buonano, 2012) y las neuronas GAD-positivas del hipocampo expresan altos niveles de ErbB4 (Gerecke, *et al*, 2001, Neddens y Buonanno, 2010 y Wen, *et al*, 2010), indicando que el ErbB4 se encuentra enriquecido en las neuronas GABAérgicas.

Los análisis ultraestructurales realizados por el grupo de Detlef Vullhorst, en las interneuronas utilizando microscopía inmunoelectrónica, muestran una expresión abundante del ErbB4 en el compartimiento somato dendrítico y en sitios adyacentes a receptores postsinápticos glutamatérgicos. Por el contrario, el receptor ErbB4 no se expresa en los botones presinápticos. Estos resultados

indican que el receptor ErbB4 es un marcador postsináptico selectivo para las sinapsis glutamatérgicas en las interneuronas inhibitoras (Vullhorst, *et al*, 2009).

La expresión selectiva de los receptores ErbB4 en las interneuronas se encuentra conservada en distintos linajes, desde los roedores hasta los primates tanto humanos como no humanos (Silberberg, *et al*, 2006, Law, *et al*, 2007 y Neddens, *et al*, 2011). El grupo de Neddens corroboró en 2011 que la expresión del receptor ErbB4 se restringe a las interneuronas en la corteza y en el hipocampo de roedores, mostrando que la proteína del ErbB4 es indetectable en las células piramidales en los roedores y no hay expresión del ErbB presináptica en ninguna de las especies (Neddens, *et al*, 2011). Se argumenta en este artículo que la expresión del ErbB4 de manera interneurona-específica en el área somato dendrítica es consistente con un papel principal de la señalización neuregulina-ErbB4 en la modulación postsináptica de la función de las neuronas GABAérgicas en los roedores y primates (Fox y Kornblum, 2005 y Buonanno, 2010). Como ya se mencionó, el patrón de expresión interneurona-selectivo se demostró similar a lo largo de los linajes de roedores (ratón y rata) (Vullhorst, *et al*, 2009 y Neddens y Buonanno, 2010) y especies primates (Rhesus y humano) (Bernstein, *et al*, 2006 y Thompson, *et al*, 2007), siendo la mayoría de las neuronas ErbB4 positivas, también positivas para GAD (> 90% de las interneuronas caracterizadas electrofisiológicamente). No se detectó el ErbB4 en ningún tipo de terminal presináptica GABAérgica (Neddens, *et al*, 2011).

Importantemente, la expresión del ErbB4 en distintas neuronas GABAérgicas varía regionalmente en el cerebro (Ozaki, *et al*, 2004, Kornblum, *et al*, 1999 y Gerecke, *et al*, 2001). El porcentaje de células PV positivas que expresan al receptor ErbB4 es significativamente mayor en la corteza pre frontal (<98%) comparado con el hipocampo (42%) (Fox y Kornblum, 2005). Incluso el patrón de expresión del ErbB4 en cuatro subtipos neuronales principales del hipocampo es diferente, este es expresado en las células positivas para colecistocinina (CCK, 54%), en las positivas para Parvalbumina (PV, 42%) y en las positivas para la sintetasa de

óxido nítrico neuronal (nNOS, 39%), mientras que las células que expresan somastatina (SOM) son raramente inmunoreactivas para ErbB4 (1%) (Neddens y Buonanno, 2010). La cantidad de expresión del receptor ErbB4 es constante a lo largo de las distintas áreas que constituyen la estructura hipocampal, con excepción del giro dentado, en el cual el 80% de las células que expresan el receptor son CCK positivas (Neddens y Buonanno, 2010). La constancia en la expresión del ErbB4 en las interneuronas parvalbumina positivas a lo largo de toda la estructura hipocampal sugiere que la activación de la vía de señalización NRG1-ErbB4 favorece la inhibición peri-somática a lo largo de toda la red hipocampal (Neddens y Buonanno, 2010).

La activación del ErbB4 mediante la aplicación de NRG1 aumenta la potencia de las oscilaciones hipocampales en la frecuencia gamma en un $710 \pm 229\%$ (Fisahn, *et al*, 2009), aumento que se ve inhibido si se aplican PD158780 o AG1478 que funcionan como antagonistas de ErbB4 (Fisahn, *et al*, 2009). Además, se mostró que ratones transgénicos que carecen de este receptor muestran un número menor de interneuronas PV (-31%) y la potencia de las oscilaciones gamma inducidas por kainato se encuentra reducida (-60%) (Fisahn, *et al*, 2009). Estos resultados, implican a la vía NRG1-ErbB4 en la sincronización de ensamblajes neuronales que regulan la generación de los ritmos gamma. (Gerecke, *et al*, 2001 y Yau, *et al*, 2003)

2.3.2 FUNCIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN NRG1/ERBB4

Al igual que otros receptores de señalización que actúan a través de tirosinquinasa (RTKs), la unión de la NRG1 a su receptor promueve la fosforilación cruzada de los residuos tirosina del mismo (Cadena y Gil, 1992 y Marshal, 1995), la asociación de proteínas que contienen unión a fosfotirosina (Cadena y Gil, 1992 y Van Blesen, *et al*, 2002) o dominios homólogos a Src con residuos fosforilados (Marshall, 1995, y Van Blesen, *et al*, 2002), y la activación de vías intracelulares efectoras que regulan respuestas biológicas específicas (Buonanno y Fischbach, 2001). El dominio de factor de crecimiento epidermal (EGF) de la NRG1 se

requiere para la unión con su receptor y es suficiente por sí mismo para llevar a cabo la dimerización del receptor ErbB, la fosforilación de la tirosina y la activación de las vías de señalización subsecuentes (Buonanno y Fischbach, 2001 y Van Blesen, *et al*, 2002). Este dominio EGF contiene 50 aminoácidos y se caracteriza por tres pares de cisteínas que son importantes para la estructura terciaria de la proteína y su función en la señalización de los procesos de proliferación neuronal (Burden y Yarden, 1997), regulación de la expresión de receptores (Lemke, 1996), migración celular (Meyer, *et al*, 1997), entre otras. Aun cuando el motivo EGF puede mimetizar la mayoría de los efectos biológicos de la proteína completa, los otros dominios contribuyen a funciones biológicas específicas (Buonanno y Fischbach, 2001). Por ejemplo, el dominio rico en Cisteínas (CDR) de NRG1 se requiere para el mantenimiento de las sinapsis periféricas (Wolpowitz, *et al*, 2000). Ratones mutantes que carecen de esta región en el gen NRG1 mueren al nacimiento y los embriones presentan un número reducido de células de Schwann (Riethmacher, *et al*, 1997, Wolpowitz, *et al*, 2000, Garrat, *et al*, 2000 y Sherman, *et al*, 2000). En contraste, ratones con mutaciones en el dominio IgG –en el mismo gen- presentan una pérdida severa de neuronas en las áreas corticales que regulan las funciones sensoriales y motoras (Meyer, *et al*, 1997 y Wolpowitz, *et al*, 2000). Las diferencias en los fenotipos encontrados en las mutaciones del gen que codifica a la NRG1 en los dominios CRD e IgG-like enfatizan la importancia de los dominios diferentes a EGF para regular la función de NRG1 (Buonanno y Fischbach, 2001).

En cultivos organotípicos cerebrales, la NRG1 induce selectivamente la expresión de la subunidad $\beta 2$ del receptor para el ácido γ -amino butírico (GABA-A) en células piramidales (Xie, Raetzman, y Siegel, 2004 y Woo, *et al*, 2007), con lo cual se propone que la activación del sistema NRG1/ErbB4 deprime la actividad neuronal (Iyengar y Mott, 2008). Utilizando registros de campo locales en rebanadas de hipocampo, se mostró que la NRG1 revierte los procesos de actividad epileptiforme producidos por la exposición a 10mM de cloruro de potasio que induce ráfagas epileptiformes y potenciación de las sinapsis en CA1 (Ben-Ari

y Gho, 1988, Abegg, *et al*, 2004 y Debanne, Thompson y Gahwiler, 2006). Por otra parte, se ha demostrado que la neuregulina inhibe el desarrollo de ráfagas espontáneas características de la actividad epileptiforme inducida (Debanne, Thompson y Gahwiler, 2006), las cuales son resultado de la pérdida del balance excitación/inhibición que favorece la actividad sincrónica epiléptica (Bains, Longacher y Staley, 1999, y Staley, *et al*, 2001). Esto indica que la activación del sistema NRG1/ErbB4 en las interneuronas es suficiente para modular a los circuitos incluso cuando se encuentran en estados de hiperexcitabilidad (Kwon, *et al*, 2008).

Con toda la evidencia anterior, se puede concluir que la activación del sistema NRG1/ErbB4 representa una herramienta farmacológica muy eficiente para activar interneuronas inhibitorias en el hipocampo y estudiar su papel en la generación de distintos patrones de actividad en el mismo. Sin embargo, es importante considerar que el análisis de los ritmos hipocampales – y otras dinámicas específicas originadas a partir de la sincronización de poblaciones neuronales en ventanas temporales de la escala de milisegundos- (Fox, 1989, Kubie, Muller y Bostock, 1990, Wang y Buzsáki, 1996, Buzsáki, 2002 y Tukker, 2007) se puede dificultar utilizando técnicas farmacológicas clásicas. De esta forma, la respuesta a la presencia de un fármaco se ve limitada por la cinética del fármaco y la temporalidad de las señales intracelulares desencadenadas (Burden y Yarden, 1997, Corfas, Roy y Buxbaum, 2004 y Bjamadottir, *et al*, 2007). Estas limitaciones resultan en la necesidad de explorar nuevas metodologías que nos permitan modular la actividad de los elementos neuronales implicados en la generación de ritmos hipocampales (Wang y Buzsáki, 1996, Chapman y Lacaille, 1999, Cobb, *et al*, 1995, Freund, 2003, Jonas, *et al*, 2003, Klausberger, *et al*, 2003 y Tukker, 2007) de una manera sincrónica y en ventanas temporales de importancia fisiológica. Una manera de lograr este objetivo es mediante el uso de herramientas optogenéticas, ya que estas superan las limitaciones anteriormente descritas de la manera que se describe a detalle en la siguiente sección.

2.4 OPTOGENÉTICA

Durante los últimos años, la optogenética ha comenzado a revolucionar el campo de las neurociencias así como ha abierto nuevas posibilidades en el campo de la estimulación cerebral (LaLumiere, 2010). La técnica de la optogenética utiliza la luz para controlar la actividad de las neuronas que expresan proteínas sensibles a la luz por lo que evita los efectos no-específicos de la estimulación eléctrica o la manipulación farmacológica (Lin, 2010). La optogenética puede utilizar herramientas de control para activar o inhibir tipos celulares específicos – como la Channelrhodopsina (Zhang, *et al*, 2006) o las Bacteriorhodopsinas y halorhodopsinas, respectivamente (Chow, Han y Dobry, 2010)-.

Especies de múltiples ramas del reino animal han generado mecanismos para censar la radiación electromagnética en sus ambientes (Bogomolni y Spudich, 1982, Tomioka, *et al*, 1986, Spudich, 1998, Bieszke, *et al*, 1999, Bèjà, *et al*, 2001, Wang, *et al*, 2003 y Tsunoda, *et al*, 2006). La existencia de las opsinas de bacterias, hongos y algas se identificó por la presencia de bombas iónicas que transportan varios iones a través de la membrana en respuesta a una estimulación luminosa (Oesterhelt y Stoeckenius, 1971, Racker y Stoeckenius, 1974, Schobert y Lanyi, 1982 y Oesterhelt, Hegemann y Tittor, 1985).

Trabajos pioneros como el de Nagel y su equipo permitieron llevar a cabo la expresión de varios tipos de opsinas para estudiar su activación y su funcionamiento como moduladores del transporte iónico en células de eucariotes superiores –en este estudio oocitos de *Xenopus laevis*- (Nagel, *et al*, 2002). La secuencia de la primer Channelrhodopsina y su estructura, se obtuvo basándose en comparaciones con las secuencias de las rhodopsinas sensoriales de arqueas (Srs), bacteriorhodopsinas (BR) y halorhodopsinas (HR) ya descritas (Lanyi y Oesterhelt, 1982, Schobert y Lanyi, 1982, Luecke, Ritchter y Lanyi, 1998, Matsuno y Mukohata, 1997 y Lanyi, 2006). Utilizando como criterio la homología en secuencia, es decir una comparación uno a uno de los aminoácidos que las

conforman, se definieron los dominios cruciales para el funcionamiento de estas proteínas (aminoácidos conservados en los 4 tipos), (Bogomolni y Spudich, 1982 y Holland, *et al*, 1996) estos fueron posteriormente probados experimentalmente para analizar su importancia en la generación de los fotociclos de las cuatro opsinas hasta entonces descritas (Schobert y Lanyi, 1982, Oesterhelt, Hegemann y Tittor, 1985 y Sasaki, *et al*, 1995) y se corroboró su importancia funcional, mayoritariamente con estudios mutacionales. (Essen, 2002, Berthol, *et al*, 2008, Bamman, *et al*, 2009, Hoffman, *et al*, 2010 y Kato, *et al*, 2012). Posteriormente, se demostró que la introducción de un gen de una opsina microbial en las neuronas de mamíferos, resultaba en la expresión de dicha opsina en la membrana neuronal y en la inducción por luz de potenciales de acción con precisión de milisegundos (Boyden, *et al*, 2005). Para el año 2010, la mayoría de las clases de opsinas conductoras de iones han probado ser funcionales como herramientas de control optogenético en las neuronas de mamíferos como se describe más adelante (Deisseroth, 2010).

2.4.1 GENES DE OPSINAS MICROBIALES

Los genes de las opsinas se dividen en dos superfamilias: opsinas microbiales (Tipo I) y opsinas animales (Tipo II). (Fenno, Yizhar y Deisseroth, 2010). Las proteínas de ambas familias requieren de retinal, un cofactor orgánico derivado de la vitamina A que sirve como antena para los fotones (Béjà, *et al*, 2001, Essen, 2002, Nagel, *et al*, 2002, Várò, *et al*, 2003 y Zhang, *et al*, 2008). Las opsinas tipo I son productos proteicos denominados rhodopsinas cuando se encuentran unidos a retinal. Estas proteínas difieren de su contraparte en mamíferos (tipo II) en que son sistemas de un sólo componente sensor de luz (Oesterhelt y Stoeckenius, 1971). Es decir, tanto la capacidad de captar la luz como la conducción iónica, se realizan por la misma proteína (Banghart, *et al*, 2004).

La primera opsina identificada, es la bomba protónica de *Halobacterium halobium* (Bacteriorhodopsina; BR), que es expresada bajo condiciones de poco oxígeno en

las membranas de las halobacterias (Oesterhelt y Stoeckenius, 1971, 1973, Racker y stoeckenius, 1974 y Michel y Oesterhelt, 1976). *Halobacterium halobium* pertenece a un género de microorganismos pertenecientes al dominio Archaea cuyo metabolismo requiere ambientes con una alta concentración de sal. En estos organismos la BR sirve como parte de un sistema de producción de energía alternativo, pues bombea protones del citoplasma al medio extracelular para generar una fuerza protónica que permite la síntesis de ATP (Racker y Stoeckenius, 1974). Una segunda clase de genes de opsinas, codifican para las halorhodopsinas (HR), que son bombas iónicas descubiertas en archeobacterias (Matsuno-Yagi y Mukohata, 1977). Los principios operacionales de las HR son similares a aquellos de las BR (Lanyi y Oeterhelt, 1982, Sasaki, *et al*, 1995 y Essen, 2002). Sin embargo, cambios en la secuencia de aminoácidos de las halorhodopsinas resultan en una preferencia por la conducción de cloruro (Sasaki, *et al*, 1995 y Essen, 2002,) mientras que las BR expulsan protones H⁺ (Lanyi y Oeterhelt, 1982, Sasaki, *et al*, 1995 y Essen, 2002). Posteriormente se describió una tercera clase de opsina microbial, la channelrhodopsina (ChR), que es una proteína con propiedades de flujo iónico activado por luz obtenida de la secuencia genómica del alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* (Nagel, *et al*, 2002, Nagel, *et al*, 2003 y Zhang, *et al*, 2008).

2.4.2 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA CHR2

La Channelrhodopsina-2 es un canal iónico que se abre rápidamente después de la absorción de un fotón para generar permeabilidad para cationes monovalentes y bivalentes (Nagel, *et al*, 2002). Esta opsina consta de una proteína que forma 7 hélices transmembranales unidas covalentemente a retinal (cromóforo microbial *all-trans-retinal*) (Nagel, *et al*, 2002, Nagel, *et al*, 2003 y Radu, *et al*, 2009). Se ha determinado que la estimulación fotónica de esta opsina toma tan sólo 50µs para iniciar una respuesta medida en fotocorriente, demostrando que la actividad de fotoreceptor y el canal iónico se encuentran en la misma proteína (Holland, *et al*, 1996, Berthold, *et al*, 2008 y Kato, *et al*, 2012). La ChR2 consiste de 737

aminoácidos, cuyos dominios transmembranales (TMs) y la funcionalidad fotosensible se localizan en la región amino-terminal, las regiones transmembranales se encuentran conectadas por 3 anillos citoplásmicos y 3 anillos extracelulares cruciales para el fotociclo de la channelrhodopsina en respuesta a la estimulación fotónica ya que estos definen los poros electronegativos extracelulares e influyen fuertemente en las cinéticas de recuperación de la opsina posterior a los cambios conformacionales de apertura y cerrado del canal iónico. (Kato, *et al*, 2012). El dominio N-terminal consiste de una hélice corta y 2 láminas β y posee 6 moléculas lipídicas y 43 de agua las cuales forman una red mediante enlaces de hidrógeno mediados por agua, que son sustanciales una vez que se da la reacción de isomerización del retinal para comenzar con la serie de pasos de protonación que resultarán en la apertura del canal (Luecke, Richter y Lanyi, 1998, Bamann, *et al*, 2009 y Hoffman, *et al*, 2010). La interacción de las cisteínas Cys73 y Cys75 estabiliza el dominio N-terminal y promueve la dimerización de la ChR2 (Grzesiek y Dencher, 1998, Beckstein, *et al*, 2003). Por su parte, el dominio C-terminal está involucrado en la localización subcelular y el tráfico de la proteína hacia la membrana. (Kato, *et al*, 2012 y Müller, *et al*, 2012).

La función de la ChR2 depende enteramente del “retinal binding pocket”, el cual consiste en la molécula de *all-trans-retinal* (ATR) unida covalentemente a un residuo de lisina (Lys296) que se encuentra en la hélice transmembranal 7 (Kato, *et al*, 2012 y Müller, *et al*, 2011) y la formación de una base de schiff, la cual mediante el doble enlace entre un átomo de Carbono del ATR y el nitrógeno del aminoácido lisina mantienen el canal catiónico cerrado. Cinco residuos aromáticos (Trp163, Phe217, Trp262, Phe265 y Phe269) localizados alrededor del ATR forman un “bolsillo hidrofóbico” responsable de la mayoría de los cambios conformacionales necesarios para la apertura del canal (Nack, *et al*, 2010, Hoffman, *et al*, 2010). Otros residuos (Cys167, Thr198 y Ser295) forman un segundo “bolsillo hidrofóbico” que contribuye a la activación por luz azul (Hoffman, *et al*, 2010 y Kato, *et al*, 2012) mutaciones en estos residuos, cambian el espectro

de luz en el cual es responsiva la ChR. Kato y colaboradores en 2012 describieron que las hélices transmembranales 1, 2, 3 y 7 forman un poro electronegativo que es crucial para el funcionamiento de la ChR2 (Plazzo, *et al*, 2011, Müller, *et al*, 2012 y Kato, *et al*, 2012). Los residuos cargados negativamente (Glu y Asp) se encuentran alineados a lo largo del poro. La conductancia y selectividad iónica están definidas por la segunda hélice transmembranal, mutaciones en los residuos en esta hélice, alteran la selectividad iónica del canal. Ejemplos de estas incluyen la mutación N297D, ácido aspártico por asparagina, la cual aumenta en el doble la preferencia por iones Ca^{2+} . La mutación D292A –alanina por ácido aspártico- triplica la preferencia por iones H^+ y la mutación K132A –alanina por lisina- aumenta la preferencia por iones K^+ al triple (Kato, *et al*, 2012).

En la parte extracelular del poro, un vestíbulo formado por el dominio N-terminal y 3 hélices extracelulares se abre hasta un diámetro de 8 Å en los cuales las Lys154, Lys209 y la Arg213 forman una superficie electropositiva alrededor del vestíbulo, lo que sugiere que esta superficie regula el paso del estado abierto no conductivo al estado conductivo (Sugiyama, *et al*, 2009, Müller, *et al*, 2012 y Kato, *et al*, 2012). Dentro del vestíbulo la Arg159, la Tyr160, el Glu274 y la Ser284 forman una superficie electronegativa débil que fija las posiciones de las hélices transmembranales 3, 6 y 7 mediante enlaces de hidrógeno mediados por agua. Esta superficie provee el ambiente negativo que facilita el movimiento de los iones positivos hacia el interior de la célula (Sasaki, *et al*, 1995, Luecke, Ritcher y Lanyi, 1998 y Kato, *et al*, 2012). Mutaciones en estos residuos, alteran la fotocorriente, el ejemplo más claro es la mutación R159A -Alanina por Arginina- la cual no produce fotocorriente (Kato, *et al*, 2012).

El protón que es liberado por la base de Schiff en respuesta a la activación fotónica es aceptado por el Asp 292, el cual se encuentra desprotonado en el estado “cerrado” de la ChR2 (Wang, *et al*, 2009 y Müller, *et al*, 2012). Este residuo actúa como el aceptor de protones principal del sistema, el protón que es liberado por el ATR en respuesta a la estimulación protónica es aceptado por dicho

residuo. De hecho, mutaciones en este residuo eliminan la actividad, la mutante D292A –alanina por ácido aspártico- no presenta fotocorriente (Kato, *et al*, 2012). Esta respuesta, en la que se elimina la actividad, es la misma que se presenta en la bacteriorhodopsina si se muta el aceptor de protones -que en el caso de BR es el Ácido Glutámico 162- (Luecke, Richter y Lanyi, 1998 y Lanyi, 2006). Mutaciones en cualquiera de estos residuos alteran las fotocorrientes, por ejemplo: al mutar la Serina 102 –S102D, Ácido Aspártico por Serina- se aumenta la magnitud de la corriente fotoinducida al triple y la mutación N297D –Ácido Aspártico por Asparagina- reduce la fotocorriente a la mitad, demostrando la importancia de estos residuos en el paso a los estados abiertos (Kato, *et al*, 2012 y Lórenz-Fonfría, *et al*, 2013). A diferencia de la ChR1 –que muestra selectividad por protones H⁺- (Nagel, *et al*, 2002), las fotocorrientes producidas por la ChR2 varían ampliamente en soluciones que contienen diferentes concentraciones de distintos iones, sugiriendo que ChR2 permea varios cationes. (Holland, *et al*, 1996 y Nagel, *et al*, 2003). Los radios de permeabilidad catiónica de la Channelrhodopsina son los siguientes: H⁺=10⁵; Li⁺=2±0.5; Na⁺=1; K⁺=0.5±0.3; (CH₃)₂NH₂⁺=4±2. (Nagel,*et al*, 2003). Estos se definen como cambios en el potencial reverso de las fotocorrientes cuando se reemplaza el Na⁺ por cada uno de los cationes (Hille, 2001).

La dependencia de las fotocorrientes en diferentes soluciones salinas muestra una relación inversa con el radio atómico del catión, demostrando que el poro “efectivo” de ChR2 debe ser mayor que los canales de Na⁺ dependientes de voltaje (Nagel, *et al*, 2003) ChR2 es permeable tanto a cationes monovalentes como divalentes, en soluciones que contienen 80mM de Ca²⁺ la activación de ChR2 desencadena una corriente amplia con un tiempo de activación menor. Los residuos Arg159 y Glu136 afectan la cinética del canal. Mutantes de estos aminoácidos no producen fotocorriente aun cuando hay amplia expresión de ChR2 en la membrana (Nagel, *et al*, 2003).

Posterior al equilibrio en la luz, la corriente estacionaria es estable (Bamman, *et al*, 2009, Nack, *et al*, 2010, Plazzo, *et al*, 2011, Kato, *et al*, 2012 y Lórenz-Fonfría, *et al*, 2013). La recuperación del pico de la corriente depende del potencial de membrana, es decir, la recuperación es más rápida en voltajes negativos que positivos. La recuperación de la inactivación también depende del pH extracelular (pH_o): es más lenta a un pH_o más alto que un pH_o bajo, sugiriendo que la recuperación del estado inactivo está ligado a la protonación de uno o más aminoácidos del extremo extracelular (N-terminal). ChR2se desensibiliza en presencia de luz continua dando lugar a un estado de conductancia fijo mucho menor a su actividad basal. La recuperación de la desensibilización es acelerado por iones H^+ extracelulares y potenciales de membrana negativos, mientras que el cerrado del canal iónico es desacelerado por iones H^+ intracelulares. (Radu, *et al*, 2009 y Verhoeven, *et al*, 2010).

2.4.3 FOTOCICLO Y PROPIEDADES DE LA CHANELRODOPSINA-2 (CHR2)

La mayoría de las channelrhodopsinas descritas a la fecha poseen una conductancia y una selectividad catiónica baja (Musti, Bamberg y Hegemann, 2002, Ollig, Hegeman y Bamberg, 2003 y Zhang, *et al*, 2006) pero las corrientes fotónicas pueden ser ampliamente mejoradas con estrategias de ingeniería molecular (Adamantidis, *et al*, 2007). En este sentido, el grupo de Boyden (2005), inició esta optimización mediante la introducción de codones humanos. Posterior a estos trabajos, varios grupos se han enfocado en desarrollar y diversificar las channelrhodopsinas utilizando técnicas de ingeniería mutacional (Gradinaru, *et al*, 2010).

John Y. Lin resume las características más importantes de las ChR, las cuales se describen a continuación:

1.- Conductancia: La conductancia estimada de la ChR2 está por debajo de 1pS, que es menor a la conductancia de los canales membranales comunes. (Lin, 2010).

2.- Selectividad iónica: Todas las channelrhodopsinas son permeables a cationes, con una preferencia por Ca^{2+} , Na^{+} , K^{+} y H^{+} (en ese orden) y tienen un potencial de reversión cercano a 0 mV a pH fisiológico. (Lin, 2010).

3.- Sensibilidad a la luz: Las ChRs varían en la sensibilidad a la luz, existen mutaciones que aumentan esta variable, pero generalmente tienen impacto negativo en las cinéticas del canal. (Lin, 2010).

4.- Tráfico membranar y expresión. La baja expresión y/o agregados intracelulares de las ChRs reducen la eficiencia de la despolarización membranar. La sobreexpresión de estas proteínas exógenas puede producir toxicidad y/o efectos adversos en las propiedades membranales. (Lin, 2010).

Estas propiedades cinéticas de la Channelrhodopsina determinan las características de su fotociclo. Desde 1996 se ha observado que las corrientes de ChR2 decaen biexponencialmente (Holland, *et al*, 1996), hecho que sólo puede ser explicado formulando un modelo de su fotociclo que consta de 4 estados.

Para la Channelrhodopsina 2, este fotociclo se compone de 2 estados cerrados (C_1 y C_2) y dos estados abiertos (O_1 y O_2) los cuales representan la adaptación tanto a la oscuridad ($\text{C}_1\text{-O}_1$) como a la luz ($\text{O}_2\text{-C}_2$) (Radu, *et al*, 2009). El primer fotointermediario se detecta inmediatamente posterior a la excitación por luz (P1) tiene un tiempo de reacción (rise time) de 50 ns. P1 decae con una constante de tiempo de 4 μs al siguiente intermediario (P2). Las alteraciones conformacionales en este estado no se asocian con la conducción iónica si no que definen la formación del poro. El pico de absorción máximo de P2 es blue-shifted ($\lambda_{\text{max}}=390$ nm) y la base de Schiff se encuentra desprotonada. El tercer intermediario P3 tiene un máximo de absorción a 520 nm que aumenta con una constante temporal de 150 μs y decae a 10 ms. Sus cinéticas se asocian con la apertura y cerrado del canal respectivamente. El estado P3 representa el estado conductivo de ChR2. P4

tiene el mismo máximo de absorción que el estado inicial y su decaimiento está asociado con la desensibilización del canal. Los cambios estructurales en este estado correlacionan con el estado cerrado/inactivado (o desensibilizado) que sucede al cerrado del canal (Verhoefen, *et al*, 2010).

Dentro del fotociclo existen características especiales del canal que delimitan y especifican las cinéticas de respuesta, estas se resumen en la siguiente lista (Radu, *et al*, 2009):

- Los cambios conformacionales de la proteína son censados por el Ácido Aspártico156 en la hélice D.
- El cambio en los enlaces de hidrógeno del Asp115 en la hélice D se debe a una transferencia de protones con D156 como donador protónico.
- Con esto la proteína lleva a cabo cambios conformacionales que inevitablemente perturban el pKa de residuos específicos.
- El flujo iónico induce cambios en el estado de protonación y los puentes de hidrógeno de los Ácidos Aspártico y Glutámico.
- La mutación C128T altera la vida media del intermediario P3 conductivo, haciendo que se retrase.
- La iluminación continua en el espectro azul genera un estado fotoestacionario del intermediario de larga vida media P4 con menores contribuciones de P3.
- El estado desensibilizado se asocia con grandes distorsiones del esqueleto proteico.

2.4.4 EJEMPLOS DE CONTROL DE LA ACTIVIDAD DE CIRCUÍTOS NEURONALES A TRAVÉS DE LA ACTIVACIÓN OPTOGENÉTICA DE INTERNEURONAS

Posterior a la demostración de la capacidad de las opsinas para controlar fielmente la actividad de las neuronas, se observó un aumento sustancial del número de trabajos que utilizan la optogenética. Dentro de estos, muchos se han enfocado en el papel que juegan las interneuronas en la generación de dinámicas

sincronizadas en distintas estructuras cerebrales. En este apartado, se ejemplifican algunos de ellos y la relevancia de estos estudios para la validación del presente proyecto.

En 2009, Jessica Cardín y colaboradores demostraron que es posible inducir distintos estados de activación en una red mediante la activación *in vivo* de interneuronas a diferentes frecuencias. Basados en la premisa de que las redes de interneuronas “*fast spiking*” (FS) producen potenciales postsinápticos inhibitorios sincrónicos en neuronas excitatorias, y utilizando la expresión de la channelrhodopsina ChR2 en estas células, probaron que la activación de las interneuronas FS en un circuito *in vivo* es suficiente para la inducción de oscilaciones gamma cuando se les activa a altas frecuencias (Cardín, *et al*, 2009). La expresión de ChR2 fue restringida a interneuronas parvalbumino-positivas (PV⁺) mediante la transfección viral utilizando un vector adenoviral con un marco de lectura invertido “double-floxed” (AV DIO ChR2-mCherry) con actividad CRE dependiente, mediante el uso de ratones transgénicos con estas propiedades. En este trabajo, la expresión cubrió una distancia anteroposterior de 1,740 μm , resultando en un marcado robusto de interneuronas PV⁺ a lo largo de las capas corticales (Cardín, *et al*, 2009). Ya que utilizaremos una metodología similar, es sustancial la consideración de que la eficiencia de transfección varía a lo largo de la distancia a partir del sitio de inyección (en el radio del núcleo de inyección >97% de las interneuronas expresan el vector) (Deisseroth, 2010). Al realizarse los registros intracelulares *in vivo* de las células de los ratones PV-Cre, se encontró que un pulso de luz de 1ms es suficiente para evocar potenciales de acción postsinápticos “rápidos” confirmando la inhibición sináptica directa de las células piramidales por las interneuronas FS activadas por luz. De igual manera, para fines de este proyecto la observación de que ambos, el tiempo entre descargas y la variabilidad de la duración de las descargas de los potenciales de acción evocados, decrecen al incrementar la potencia, refleja la consistencia de este tipo de inhibición. Más aún, se observó que la activación de las interneuronas FS bloquea la inducción de respuestas en las células piramidales vecinas.

Reafirmando la hipótesis de que es posible, mediante el uso de esta técnica, el modificar el comportamiento de redes corticales completas (Tukker, 2007 y Cardín, *et al*, 2009).

En el mismo año, el grupo de Sohal corroboró los resultados publicados por Cardín, *et al*; utilizando la halorhodopsina (eNpHR) o la Channelrhodopsina-2 (ChR2) expresadas en interneuronas parvalbumino positivas (definidas como FS) en la corteza de animales transgénicos que expresan la Cre recombinasa. Se analizó el efecto de la activación y la inhibición de este subtipo interneuronal en la generación de las oscilaciones Gamma en un modelo *in vivo*. (Sohal, *et al*, 2009). Al inducir la inhibición de las interneuronas FS (que expresan eNpHR y se inhiben con luz amarilla) se observó una reducción de la potencia de gamma de aproximadamente un 20%, por el contrario al activar este subtipo interneuronal se aumentó considerablemente el poder en el rango gamma (~35%). (Sohal, *et al*, 2009). Utilizando trenes variables (0-500Hz) modulados por ciclos de 25 ms (40Hz; gamma) o de 125-ms (8Hz; theta) se encontró que ambas modulaciones incrementan la coherencia de los disparos en sus ventanas respectivas, es decir la modulación gamma incrementa la coherencia de la trasmisión de las tasas de disparo en relación con los estímulos proporcionados en la ventana temporal de gamma y la modulación en theta incrementa la coherencia en escalas temporales correspondientes a los ciclos theta. Estos resultados fueron similares en neuronas piramidales de la capa V/VI tanto frontales como prefrontales, sugiriendo cierta homogeneidad en los procesos que regulan los ritmos en distintas cortezas. Importantemente, esta respuesta rítmica es cierta exclusivamente para trenes de luz en patrones de estimulación modulados en la frecuencia theta o gamma y no para estimulaciones arrítmicas, sugiriendo una sinergia funcional entre las interneuronas PV-FS y las oscilaciones gamma.

La optogenética ha mostrado ser una de las herramientas más versátiles para el control neuronal al mostrar resultados en prácticamente cualquier estructura donde se analice su efecto. Por ejemplo, en 2010 el grupo de Bardy decidió

estudiar el efecto inhibitorio de interneuronas “nuevas” -es decir que se incorporaron al circuito neuronal del bulbo olfatorio en diferentes etapas post natales-. Se utilizaron, al igual que en los experimentos previos, transfecciones con vectores virales que expresan la Channelrhodopsina-2, pero en este caso bajo el promotor de la Sinapsina en la corriente migratoria rostral. De esta manera obtuvieron una población de neuronas sensibles a la luz generadas durante la adultez -desde 3 días post inyección hasta 5 meses posteriores a la inyección-. Se encontró que estas células recién incorporadas, al ser activadas con la luz azul, inhiben sus blancos postsinápticos, sugiriendo que las neuronas “nuevas” se incorporan rápidamente a la red (3 días post inyección) asumiendo sus papeles regulatorios sobre las células mitrales poco tiempo después (1 semana post inyección). Utilizando registros a diferentes tiempos se estableció la temporalidad de la funcionalidad de las células recién incorporadas al sistema, la transmisión sináptica funcional más temprana se encontró el día 13 post inyección, encontrándose una mayoría de conexiones sinápticas funcionales con las células mitrales entre la cuarta y sexta semana postinyección. Asimismo, se encontró una gran diversidad de blancos de las interneuronas “nuevas” (59 mitrales, 17 de penacho, 18 granulares, 15 juxtaglomerulares y 9 células de axón corto) que fueron moduladas por la activación optogenética de las interneuronas ChR2 positivas (Bardy, *et al*, 2010). Esto demuestra la gran diversidad de análisis que pueden realizarse utilizando el marcado y activación con la técnica “optogenética”. Estudios posteriores se han enfocado al bulbo olfatorio utilizando una comparación de análisis que van desde farmacología, estimulación eléctrica, imágenes con calcio y optogenética, reiterando las ventajas que esta técnica confiere en el análisis de las respuestas de los circuitos a la activación específica y sincrónica de las interneuronas y su efecto en procesos como la olfacción. (Bundschuh, *et al*, 2012, Huang, *et al*, 2012 y Lepousez y Lledo, 2013).

Múltiples artículos han surgido a partir de estos trabajos pioneros, muchos de ellos estudiando las propiedades de respuesta de las interneuronas, por ejemplo el grupo de Bell en 2011 encontró utilizando optogenética, whole cell patch clamp e

imagenología por tinción sensible a voltaje, que los potenciales excitatorios postsinápticos nicotínicos en las interneuronas en CA1 son mediados por los receptores nicotínicos que contienen las subunidades $\alpha 4$ y $\beta 2$ (Bell, *et al*, 2011). Más aún, el control inhibitorio de distintas estructuras puede dar respuesta a varias interrogantes fisiológicas, uno de los ejemplos más claros de esto es el trabajo de Tsubota y colaboradores. Estos demostraron que la manipulación optogenética de la actividad en las células de Purkinje en la úvula cerebelar controla la presión sanguínea (la activación de las células de Purkinje decrece la presión sanguínea y su inhibición la aumenta). Este trabajo reitera las ventajas del uso de la optogenética para realizar manipulaciones fieles y específicas en distintos sistemas neuronales. Urban y colaboradores, en el mismo año, demostraron que la fotoestimulación de las interneuronas parvalbumino positivas resulta en una contracción efectiva de las arteriolas penetrantes (Urban, *et al*, 2011).. Este resultado soporta la hipótesis de un sistema nervioso complejo que controla el flujo sanguíneo cerebral.

Los análisis de los efectos de la actividad neuronal sobre la generación de conductas complejas también se han visto beneficiados del uso de técnicas optogenéticas. De esta forma, algunos estudios han mostrado que la activación de las interneuronas parvalbumino positivas (mediante la activación de ChR2) en la corteza prefrontal de ratones transgénicos que expresan la Cre recombinasa reduce el desempeño en una tarea de discriminación temporal (Rossi, *et al*, 2012). Estos autores recalcan las ventajas de utilizar optogenética comparando lesiones citotóxicas en la corteza prefrontal y en el hipocampo dorsal, el uso de agonistas GABAérgicos como lo es el muscimol y la técnica de optogenética en la obtención de los mecanismos que subyacen el desempeño en la tarea de “delayed alternation”. Las conductas que se pueden analizar van desde las más simples, como el comportamiento quimiotáctico de *C. elegans* (Kocabas, *et al*, 2012), - estudio en el cual se demuestra que la activación optogenética de un solo par interneuronal es suficiente para forzar al animal a localizar, dirigirse y seguir gradientes de luz virtuales-, hasta comportamientos complejos como la valencia y

la motivación (Nieh, *et al*, 2013, Lenz y Lobo, 2013, Kvitsiani, *et al*, 2013), la locomoción en mamíferos (Hägglund, *et al*, 2013 y Dougherty, *et al*, 2013), la modulación de las vías visuales (Pfeffer, *et al*, 2013) y auditivas (Nelson, *et al*, 2013), la integración multisensorial (Olcese, Iurilli y Medini, 2013, Moore y Wehr, 2013 y Lee, *et al*, 2013), las respuestas al miedo (Courtin, *et al*, 2014) y el aprendizaje (Creed, Ntamati y Tan, 2013).

Más allá de la importancia de encontrar los circuitos que subyacen la actividad normal del cerebro, reside la importancia de hacer una relación entre esta actividad y la que se encuentra alterada en condiciones patológicas (Tiesinga, 2012) como la adicción a drogas (Witten, *et al*, 2010 y Dilgen, *et al*, 2012) o desórdenes neurológicos como la esquizofrenia (Peled, 2011 y Wang y Carlén, 2012) y la epilepsia (Peng, *et al*, 2013 y Berglind, *et al*, 2014), para los cuales, la optogenética ha comenzado a esclarecer mecanismos básicos y corroborar algunos de los estudios previamente realizados utilizando técnicas menos específicas como la farmacología o las lesiones físicas o químicas, demostrando nuevamente ser una técnica novedosa pero confiable para el estudio de las dinámicas neuronales en cualquier estructura cerebral y en particular para el estudio del papel de las interneuronas en estas dinámicas.

3. JUSTIFICACIÓN

Los ritmos del hipocampo se han asociado a múltiples actividades desde la locomoción exploratoria hasta la memoria (Ylinen, *et al*, 1995, Mehta, Lee y Wilson, 2002, Jones y Wilson, 2005 y Kesner, Hunsaker y Gilbert, 2005). Durante la generación de estos ritmos, las neuronas en la red entorhino-hipocampal disparan en una manera extremadamente organizada. Alteraciones en estos ritmos correlacionan con múltiples desórdenes cuya característica principal es la interrupción del establecimiento de relaciones temporales precisas entre las respuestas neuronales que son relevantes para la memoria, la percepción y la conciencia (Buzsáki, *et al*, 1994, Debanne, Thompson y Gahwiler, 2006 y Uhlhaas y Singer, 2010). En particular, las interneuronas GABAérgicas del hipocampo juegan un papel sustancial en la generación y mantenimiento de estos ritmos, ya que estas neuronas modulan la actividad de las neuronas piramidales y proveen un marco de referencia espacio-temporal para la sincronización de las estructuras descritas en el “circuito trisináptico de Amaral” (Cobb, *et al*, 1995, Acsády, Göracs y Freund, 1996, Wang y Buzsáki, 1996, Chapman y Lacaille, 1999, Benchenane, *et al*, 2010 y Krook-Magnuson, *et al*, 2012). Anormalidades en las redes generadoras de ritmos de las interneuronas GABAérgicas se han correlacionado con oscilaciones disfuncionales que resultan en alteraciones que caracterizan múltiples desórdenes (Corfas, Roy y Buxbam, 2004, Hahn, *et al*, 2006, Silberberg, *et al*, 2006, Fisahn, *et al*, 2009, Fung, *et al*, 2010, Lawrence, *et al*, 2010 y Verret, *et al*, 2012). A pesar de la importancia de los ritmos neuronales, poco se conoce de los mecanismos que los regulan y los generan. Gracias al desarrollo de nuevas herramientas en los campos de la electrofisiología y la farmacología se ha podido empezar a estudiar el papel de tipos celulares específicos en la generación de estos ritmos. Entre estas herramientas se encuentra la neuregulina, la cual regula la excitabilidad de las interneuronas GABAérgicas preferencialmente, como resultado de la expresión de su receptor ErbB4 en estos tipos neuronales (Buonanno y Fischbach, 2001, Li, *et al*, 2007, Woo, *et al*, 2007, Wen, *et al*, 2010, Ting, *et al*, 2011, Leiva-Salcedo y Buonanno, 2012 y Li, *et al*, 2012). Por otra parte,

la optogenética también es una herramienta que permite controlar la actividad de las neuronas, excitando o inhibiendo los sistemas neuronales, rápida, eficaz y específicamente (Spudich, 1998, Banghart, *et al*, 2004, Zhang, Zhang, *et al*, 2006 y LaLumiere, 2010). Esta herramienta puede ser enfocada a subpoblaciones de neuronas en un tejido heterogéneo, como lo es el caso de las interneuronas GABAérgicas en el hipocampo, representando una estrategia óptima para el estudio del papel de estas neuronas en la generación de ritmos oscilatorios (Boyden, *et al*, 2005, Tukker, 2007 y Chow, Han y Dobry, 2010). Debido a lo anterior, nos proponemos estudiar el papel que tienen las interneuronas del hipocampo sobre la modulación de la actividad hipocampal a través de la activación tanto farmacológicamente como mediante optogenética.

4. HIPÓTESIS

La actividad espontánea del hipocampo será modulada mediante la activación de interneuronas por estimulación optogenética en preparaciones *in vitro* de animales que expresan Channelrhodopsina-2 en interneuronas.

5. OBJETIVOS

Comparar el efecto de la estimulación de las interneuronas GABAérgicas con neuregulina y con estimulación optogenética sobre la actividad eléctrica espontánea poblacional del hipocampo.

5.1 OBJETIVOS PARTICULARES

Caracterizar el efecto de la neuregulina sobre la actividad espontánea poblacional y la generación de ritmos en el hipocampo.

Caracterizar el efecto de la estimulación optogenética de interneuronas GABAérgicas sobre la actividad espontánea poblacional y generación de ritmos theta en el hipocampo.

6. SUJETOS, MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 MODELO EXPERIMENTAL

Para evaluar el efecto de la neuregulina sobre la actividad espontánea del hipocampo y la generación de ritmos theta se utilizaron ratones transgénicos (CRE/GAD65), neonatos de 21 días de edad, obtenidos del Bioterio del Instituto de Neurobiología de la UNAM. También se usaron ratones silvestres. Los animales se mantuvieron en un ciclo luz/obscuridad de 12 horas, con alimentación *ad libitum*. Todas las manipulaciones experimentales se llevaron a cabo siguiendo las disposiciones del Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología.

Para evaluar el efecto de la estimulación óptica sobre la actividad espontánea del hipocampo y la generación de los ritmos theta se utilizaron ratones transgénicos (CRE/GAD65) que expresan la recombinasa CRE con el control del promotor específico para interneuronas GABAérgicas (la Descarboxilasa del ácido glutámico 65; GAD65). (ANEXO 2; Taniguchi, *et al*, 2011)

A manera de control, se utilizaron ratones neonatos de 8 días de edad (con un peso promedio de 4.2 ± 0.5 gramos), a los que se les realizó una microinyección con Lentivirus que inducen la expresión GFP, así como PBS como vector salino para control. Una vez establecidas las condiciones experimentales para la expresión de GFP a través de microinyección de un vector viral, se llevó a cabo la microinyección del vector que contiene la secuencia para la opsina microbial ChR2 flanqueada por secuencias LoXp como se describe más adelante (ANEXO 2; Deisseroth, 2010). La estimulación fótica se llevó a cabo 15 días posteriores a la inyección de los vectores mencionados (21 días de edad). Los experimentos farmacológicos con la aplicación de la neuregulina se hicieron en animales de la misma edad.

6.2 CIRUGÍA ESTEREOTÁXICA Y MICROINYECCIÓN

Para la microinyección, los animales fueron anestesiados por frío (1 minuto por gramo de peso) y fueron colocados en el aparato estereotáxico. Utilizando como referencia la fisura de Bregma se trepanó sobre el punto establecido y se hizo descender la cánula de inyección a través del cerebro. Las coordenadas de inyección fueron las siguientes: Bregma_{anteroposterior} -2.09; Bregma_{medio-lateral} \pm 1.27; Bregma_{dorso-ventral} -1.59. Una vez que la cánula se posicionó en el hipocampo se realizó la microinyección de 0.5 μ L de solución salina a los controles y 0.5 μ L de solución con el vector viral (concentración de 5×10^{11} GC/ml) a los animales experimentales de manera bilateral a una velocidad de 0.2 μ l/min, permitiendo la difusión por 2 minutos adicionales.

6.3 EXTRACCIÓN DE HIPOCAMPO COMPLETO

Para la extracción del hipocampo, los animales fueron sacrificados por decapitación sin anestesia, y el cerebro fue extraído y disecado en frío, siguiendo las disposiciones del Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología. Esta estructura fue colocada en líquido cefalorraquídeo artificial (LCRA) que se mantuvo frío (4°C) y burbujeada con gas carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂) mientras se realizó la extracción del hipocampo. Posteriormente se extrajo el hipocampo y se trasladó a una cámara con LCRA que contiene: 119mM NaCl, 30mM glucosa, 25mM NaHCO₃, 3mM KCl, 1mM MgCl₂ y 1.5mM CaCl₂. El pH (7.4) y la oxigenación se mantuvo constante por gaseo con carbógeno.

6.4 OBTENCIÓN DE REBANADAS DE HIPOCAMPO

Para obtener las rebanadas transversales de 400 μ m de espesor los animales fueron decapitados y los cerebros removidos y puestos en Líquido Cefalorraquídeo Artificial (LCRA) frío que contiene: 119mM NaCl, 3mM KCl, 1.5

mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 25mM NaHCO₃ y 30mM D-glucosa, pH 7.4 y burbujeado con carbógeno. Un solo hemisferio fue montado en un bloque de agar a 30° de inclinación y las rebanadas obtenidas de la formación hipocampal fueron cortadas en un vibratomo. Antes de comenzar el experimento, las rebanadas se dejaron reposar oxigenadas durante una hora a temperatura ambiente.

6.5 REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS

6.5.1 REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS DE CAMPO.

Para el registro electrofisiológico de campo, el hipocampo completo o la rebanada de cerebro fueron transferidos a una cámara de registro perfundida con LCRA, en constante oxigenación con carbógeno y mantenida a 30-32°C. Los registros electrofisiológicos se obtuvieron con electrodos de borosilicato con una resistencia de 0.5-1 MΩ llenos con LCRA. Los electrodos fueron colocados a la altura de la región CA1 con ayuda de un microscopio estereoscópico y un micromanipulador. Se registró por lo menos 30 minutos la condición control de la actividad espontánea poblacional, para posteriormente aplicar a la solución de perfusión, la neuregulina, (1, 3 y 10 nM) o la estimulación fótica en cada uno de los casos. En el caso de la estimulación con luz, ésta se aplicó en trenes de 5 a 50 Hz (Tabla 6.5.1) para reclutar interneuronas con distintas propiedades intrínsecas (Cardín, *et al*, 2009). La señal electrofisiológica obtenida del registro de campo fue amplificada, filtrada (10-3000 Hz), digitalizada a 3 kHz y almacenada en una computadora para su análisis fuera de línea.

Frecuencia (Hz)	Período (ms)	Voltaje	Tasa del tren	Duración de los trenes (ms)	Duración (ms)
5	200	30	0.31	2000	10
10	100	30	0.31	1000	10
20	50	30	0.31	500	10
30	33	30	0.31	250	10
50	20	30	0.31	180	10

Tabla 6.5.1. Características de los pulsos emitidos para la estimulación fótica.

6.6 GENOTIPIFICACIÓN DE ANIMALES TRANSGÉNICOS

Para la Genotipificación de los animales transgénicos para GAD65-Cre, se utilizaron los oligonucleótidos descritos por Hiroki Taniguchi (Taniguchi, *et al*, 2011), los cuales se presentan en la siguiente tabla.

Oligo #	Longitud	Dirección de amplificación	Secuencia
9981	20	Silvestre de avance	CTT CTT CCG CAT GGT CAT CT
9982	20	Común (Reverso)	CAC CCC ACT GGT TTT GAT TT
9983	24	Mutante de avance	AAA GCA ATA GCA TCA CAA ATT TCA

6.6.1 LISIS DEL TEJIDO Y EXTRACCIÓN DE ADN

Para realizar la lisis del tejido, se cortó un pedazo de la oreja de los ratones adultos de aproximadamente 1mm de diámetro.

El pedazo de tejido se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 ml y se adicionaron 400µl de buffer de lisis (que contiene: 2ml de NaCl a 200mM, 1ml de SDS al 0.2%, 5 ml y se añadieron 20µl de pK (20 mg/ml)). Se incubaron a 80°C a 1400rpm por toda la noche.

Se mezclaron 200µl de muestra lisada con 200µl de isopropanol 1:1 y se agitó por inversión. A lo largo de este proceso se observó la formación de una nube blanca que corresponde al material genético que se utilizó para la reacción de PCR.

Se centrifugó a 10, 000 rpm durante 10 minutos.

Se descartó el sobrenadante y se realizaron 2 lavados con EtOH al 70% (500µl), se centrifugó a 10,000 rpm durante 6 minutos y se tiró el sobrenadante.

Se resuspendió la pastilla en 50-100µl de agua inyectable, dependiendo del tamaño de la misma.

Se calentó a 42°C durante 10 minutos.

6.6.2 REACCION DE PCR

Se colocaron 1.5 µl de DNA de cada una de las muestras en el Master Mix de PCR (que contiene: 3µl de buffer, 0.75 µl de dNTPs, 2.25 µl de H₂O libre de RNAsas, 4.5 µl de primer 9981, 9 µl de primer 9982, 4.5µl de primer 9983, 3.75µl de MgCl₂, 0.75µl de Taq polimerasa) y se colocaron en el Termociclador utilizando el programa LHX5 que se muestra en la siguiente tabla:

Tapa precalentada		105.0°C
Precalentar la tapa antes del programa:	Encendido	
Pausa antes del programa:	Apagado	
Desnaturalización inicial	04m 00s	94.0°C
Arranque en caliente	Deshabilitado	
Número de ciclos	30	
Seg Max °C/s	00m 30s	94.0°C
Seg Max °C/s	01m 00s	65.0 °C
Seg Max °C/s	01m 00s	72.0 °C
Extensión final	10m 00s	72.0 °C
Mantenimiento final	4.0 °C	

6.6.3 GEL DE AGAROSA AL 1.6%

Se preparó un gel de agarosa (que contiene: 0.48gr de Agarosa y 30ml de TBE) donde se cargaron 5 µl de la escalera molecular de 100 Kb y 3 µl de colorante con 10 µl de PCR para cada prueba. Se corrió el gel a 80V durante 20 minutos.

6.7 PROTOCOLO DE APLICACIÓN DE LA NRG1 A PREPARACIONES *IN VITRO*.

Para evaluar el efecto de la aplicación de la NRG1 sobre la actividad poblacional en el hipocampo mediante el registro de preparaciones *in vitro* obtenidas de los animales transgénicos y silvestres se utilizaron animales de 21 días a los cuales se les extrajo tanto el hipocampo completo como rebanadas de hipocampo

utilizando los métodos descritos anteriormente. Ambas preparaciones fueron sometidas al siguiente protocolo:

- 1.- Registro de la actividad control de por lo menos 20 minutos.
- 2.- La neuregulina se aplicó con un protocolo de dosis crecientes aditivas:
Neuregulina 1nM durante 30 minutos. (Se agregaron 3 μ l de un stock a 10 μ M en una solución de perfusión de 30mL).
- 3.- Neuregulina 3nM durante 30 minutos. (Se agregaron 6 μ l a la solución de perfusión previa)
- 4.- Neuregulina 10nM durante 30 minutos. (Se agregaron 21 μ l a la solución de perfusión previa)
- 5.- Siendo el efecto de la NRG1 claro, se procedió a lavar el efecto de la neuregulina 10nM por al menos 1 hora con la aplicación continua de LCRA libre de fármaco pre-oxigenado a aproximadamente 30°C.
- 6.- Registro de la actividad en presencia de Cadmio 200 μ M por 10 minutos para eliminar la transmisión sináptica.
- 7.- Registro de la actividad en presencia de Lidocaína 1mM por 10 minutos para corroborar actividad biológica.
- 8.- Registro colocado en el baño de registro sin contacto con la preparación por 1 minuto.

Para comprobar que el efecto de la NRG1 se debe a la activación de interneuronas, se realizaron experimentos utilizando bicuculina (antagonista de los receptores GABAA (Ueno, *et al*, 1997) siguiendo el siguiente protocolo:

- 1.- Registro de la actividad control por lo menos 20 minutos.
- 2.- Registro de la actividad en presencia de Bicuculina 10 μ M durante una hora. (Se agregaron 15 μ l de un stock a 200 μ M en la solución de perfusión de 30mL)
- 3.- Registro de la actividad en presencia de Neuregulina 3nM durante 30 minutos. (Se agregaron 9 μ l de un stock a 10 μ M en la solución de perfusión anterior)

- 5.-Lavado del efecto de la bicuculina+neuregulina 10nM por al menos 1 hora en LCRA pre-oxigenado a aproximadamente 30°C.
- 6.- Cadmio 200 μ M por 10 minutos.
- 7.- Lidocaína 1mM por 10 minutos.
- 8.- Baño por 1 minuto.

6.8 PROTOCOLO DE ESTIMULACIÓN CON LUZ

Para evaluar el efecto de la estimulación con luz en la actividad poblacional en el hipocampo mediante el registro de los animales transgénicos que expresan la ChR2 en las interneuronas, se utilizaron animales de 21 días a los que se les extrajo tanto el hipocampo completo como rebanadas utilizando los métodos descritos anteriormente. Todas las preparaciones fueron sometidas al siguiente protocolo:

- 1.- Actividad control de por lo menos 20 minutos.
- 2.- La primera ronda de estimulación se dio utilizando 5 frecuencias de manera creciente (5, 10, 20, 30 y 50 Hz) con los parámetros descritos en la tabla 6.5.1 y la potencia del LED de aproximadamente 1.41 mW.
- 3.-Se dejaron 5 minutos sin estimulación entre la primera estimulación y la segunda ronda de estimulación, en esta todos los parámetros se mantuvieron constantes, excepto la duración de los trenes la cual fue duplicada. (4000 ms para la frecuencia de 5 Hz, 2000 ms para la frecuencia de 10Hz, 1000 ms; 20 Hz, 500 ms; 30 Hz y 360 ms para la frecuencia de 50 Hz).
- 4.- Se agregaron 30 μ L de CNQX y AP5 de un stock a 20 μ M en una solución de perfusión de 30mL y se registró durante 20 minutos.
- 5.- Se repitió la primera ronda de estimulación a las diferentes frecuencias (5, 10, 20, 30 y 50 Hz) con los parámetros descritos en la tabla 6.5.1.
- 6.- Se dejaron 5 minutos sin estimulación entre la primera estimulación y la segunda ronda de estimulación, nuevamente con parámetros constantes y duración del tren duplicada como en 3.

7.- Se colocaron 60 μL de Bicuculina de un stock a 10 μM en una solución de perfusión de 30mL y se registró la actividad durante 20 minutos.

8.- Se volvió a estimular de acuerdo a lo descrito en 2, parámetros constantes con frecuencias crecientes (5, 10, 20, 30 y 50 Hz).

9.- Nuevamente se dejaron 5 minutos sin estimulación entre la primera estimulación y la segunda ronda de estimulación, de igual manera que lo descrito en 3 y 6, los parámetros descritos en la tabla 6.5.1 se mantuvieron constantes y se duplicó la duración de los trenes de estimulación.

10.- Registro de la actividad en presencia de Lidocaína 1mM por 10 minutos.

11.- Se repitió la ronda de estimulación con frecuencias crecientes (5, 10, 20, 30 y 50 Hz) con los parámetros anteriormente descritos constantes.

12.- Se registraron 5 minutos sin estimulación previo a la segunda ronda de estimulación en la cual los parámetros se mantuvieron constantes y la longitud de los trenes duplicada (4000 ms para la frecuencia de 5 Hz, 2000 ms para la frecuencia de 10Hz, 1000 ms; 20 Hz, 500 ms; 30 Hz y 360 ms para la frecuencia de 50 Hz).

6.9 ANÁLISIS DE LOS ESPECTROS DE POTENCIA

Posterior al registro, la señal amplificada, filtrada (10-3000 Hz), digitalizada a 3 kHz y almacenada fue analizada utilizando el programa ClampFit 9.0 versión para Windows.

Los registros fueron ajustados a la línea base y se tomaron ventanas de 20 segundos para el cálculo de los espectros de potencia el cual se realizó utilizando una Transformada de Fourier por el método de Hamming debido a que esta ventana de análisis es más útil para los parámetros de frecuencia que se desea analizar. Esta ventana comúnmente se utiliza con el fin de evitar que las discontinuidades introducidas al analizar solo una fracción de la señal o al introducir muestras con valor de cero introduzcan componentes de alta frecuencia en el espectro, que son más bien un artificio de las discontinuidades introducidas y no de la señal.

6.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los datos se encuentran representados como la media \pm EEM. Los análisis estadísticos fueron llevados a cabo utilizando el programa GraphPad Prism y corroborados en MiniTab.

Los histogramas correspondientes se realizaron utilizando el programa estadístico GraphPad Prism.

Para evaluar las diferencias entre las muestras se aplicó primeramente el análisis de la normalidad de la distribución Kolmogorov-Smirnov. Debido a que algunos de los datos no pasaron la prueba de normalidad, se compararon los grupos utilizando una prueba no paramétrica, haciendo uso del análisis estadístico por el método de Kruskal-Wallis con una prueba Post-Hoc de Múltiples comparaciones de Dunn.

7. RESULTADOS

7.1 ESTABLECIMIENTO DE LAS COORDENADAS DE MICROINYECCIÓN

Para el establecimiento de las coordenadas de inyección en el hipocampo dorsal, se utilizaron 21 ratones neonatos de 8 días de nacidos de la cepa CD1, machos, con un peso promedio de 4.2 ± 0.5 gramos. Se establecieron las coordenadas: AP: -2.09; ML: ± 1.27 , a partir de Bregma y DV: -1.59 a partir del cráneo, utilizando el atlas de Paxinos y Watson como referencia y realizando los cálculos necesarios para extrapolarlo a ratones neonatos (Paxinos y Franklin, 2001). Una vez establecidas las coordenadas, se inyectaron 19 ratones (machos, promedio de peso: 3.8 ± 0.5 gramos) con estas coordenadas variando la cantidad de tinta inyectada (azul de pontamina) y la velocidad de perfusión (2.0 μL durante 1, 2 o 4 minutos, 1.0 μL durante 1, 2 o 4 minutos y 0.5 μL durante 1, 2 o 4 minutos). Para los animales inyectados con 2 μL , se encontró un exceso de tinta en las estructuras marcadas para las tres velocidades (datos no mostrados; velocidades de 2 $\mu\text{L}/\text{min}$, 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ y 0.5 $\mu\text{L}/\text{min}$), el hecho de inyectar 2 μL de tinta, sin importar la velocidad a la cual se inyectó, resultó en un exceso de tinta en la estructura hipocampal, y en estructuras circundantes.

Aquellos animales inyectados con 1 μL y la velocidad más alta (durante 1 min, es decir a una velocidad de 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ vs 0.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ o 0.25 $\mu\text{L}/\text{min}$), se encontró de igual manera, un exceso de las estructuras marcadas (datos no mostrados). Nuevamente la marca de azul de pontamina se encontró exagerada en el hipocampo y marcó estructuras a los alrededores. La inyección con 0.5 μL y 2.5 minutos de tiempo de inyección (velocidad de 0.2 $\mu\text{L}/\text{min}$) se consideró la condición más adecuada, debido a que esta cantidad fue suficiente para marcar la estructura hipocampal (Figura 7.1.1). Además, con estas condiciones no se observa exceso de marcaje. Todas las microinyecciones posteriores se realizaron a una velocidad de 0.2 $\mu\text{L}/\text{min}$.

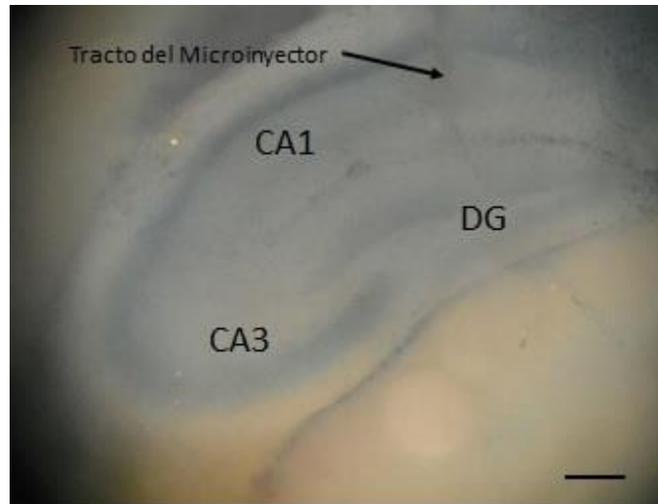


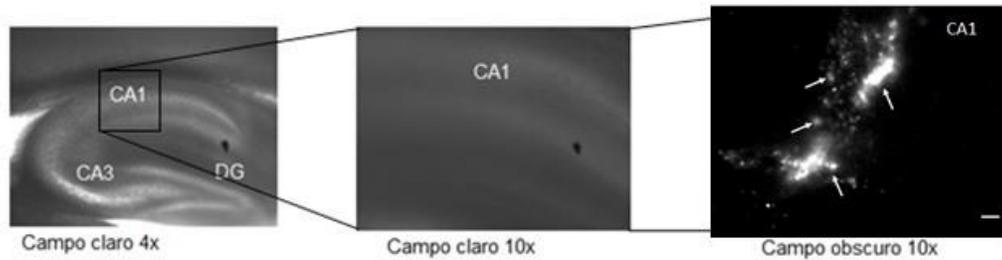
Figura 7.1.1 Microinyección en el hipocampo dorsal.

Se muestra un corte sagital de hipocampo de un ratón CD1 microinyectado con 0.5 μL de azul de pontamina en las coordenadas AP: - 2.09; ML: ± 1.27 y DV: - 1.59 a partir de Bregma a una velocidad de 0.2 $\mu\text{L}/\text{min}$ y 3 días posterior a la microinyección. Se observan los principales campos de la estructura hipocampal, CA1, CA3 y el giro dentado (DG) marcados con la tinta. La barra de escala representa 200 μm .

Posterior a la determinación de las coordenadas de inyección, al volumen y al tiempo de la misma, se inyectaron 11 ratones CD1 y 9 animales transgénicos (machos, neonatos, 8 días) con solución salina de PBS libre de RNAsas y proteasas. Así, se obtuvieron rebanadas de hipocampo de estos animales 15 días después con el fin de realizar registros electrofisiológicos y evaluar si la inyección de solución salina afecta la actividad espontánea de las rebanadas del hipocampo. Se inyectaron, además, 10 animales transgénicos con lentivirus que contienen una secuencia de ADN que permite la expresión de la GFP (Moriyoshi, *et al*, 1996), proporcionado por la unidad de proteogenómica del INB. Estas inyecciones se realizaron en 3 cantidades diferentes (0.5, 1 y 2 μL a una velocidad de 0.2 $\mu\text{L}/\text{min}$) con 2 propósitos:

- Confirmar la inyección y transfección en la estructura deseada.
- Realizar registros de rebanadas e hipocampos de estos animales para realizar pruebas de estimulación óptica como control.

Hipocampo dorsal derecho. Transfección: 8 días postnatal. Corte: 21 días postnatal.



Hipocampo dorsal izquierdo. Transfección: 8 días postnatal. Corte: 21 días postnatal

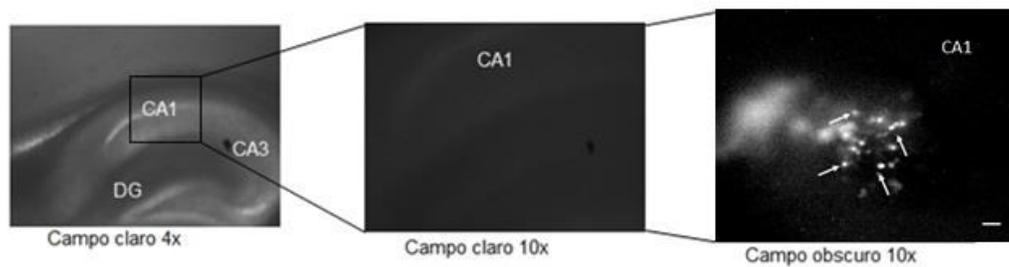


Figura 7.1.2 Transfección viral de proteína verde fluorescente (GFP)

Se observa el hipocampo de dos animales transgénicos microinyectados en las coordenadas AP: -2.09; ML: ± 1.27 y DV: -1.59 a partir de Bregma con $1\mu\text{L}$ de vector viral que expresa la proteína verde fluorescente (GFP), procesado 15 días posteriores a la microinyección. En la micrografía de la izquierda se muestra la estructura hipocampal a 4 aumentos en campo claro, se observan los principales campos del hipocampo CA1, CA3 y el giro dentado (DG), la micrografía del centro muestra un aumento de 10x nuevamente en campo claro, se observa en este acercamiento el área CA1 y en la micrografía de la derecha se muestra la misma imagen que en el centro, pero en campo oscuro, se pueden observar los elementos celulares que expresan la proteína verde fluorescente (GFP). La barra de escala representa $50\mu\text{m}$.

7.2 GENOTIPIFICACIÓN DE LOS RATONES TRANSGÉNICOS

Como preparativo para la expresión dependiente de CRE-recombinasa de la ChR2 en interneuronas, se genotipificaron ratones transgénicos homocigotos de la tercera generación que portan, en todos los casos, la secuencia GAD2-ires-Cre. Algunos de los resultados de la genotipificación se muestran en el gel de Agarosa de la Figura 7.2. Como se puede observar, la genotipificación indica que todos los progenitores son homocigotos para GAD2-ires-Cre utilizando los oligonucleótidos que se describen en “Materiales y métodos”.

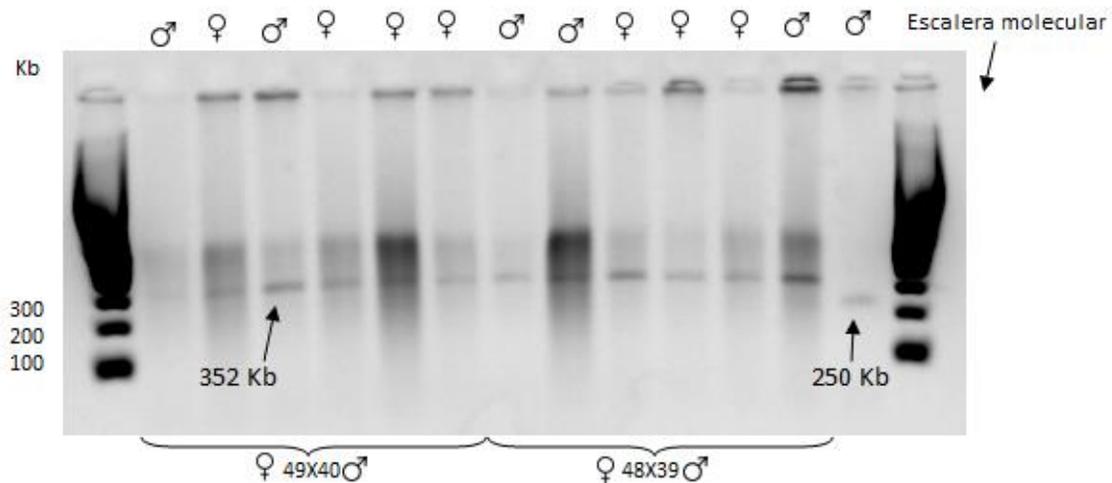


Figura 7.2. Genotipificación de los ratones transgénicos.

Se muestra un gel de agarosa con la escala molecular de 100 pares de bases (pb, carril izquierdo) y los productos de la reacción de PCR para las muestras de tejido de transgénicos de la segunda generación. Se observa el alelo mutante (portador de Cre) de 352pb de tamaño y el alelo normal (250 pb) para cada una de las muestras. En la parte inferior se indican sus progenitores y en la parte superior, el sexo de los sujetos experimentales. Las crías de esta generación se utilizaron para todos los experimentos que se llevaron a cabo.

7.3 REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS DE CAMPO

7.3.1 COMPARACION DE LA ACTIVIDAD CONTROL A LO LARGO DEL TIEMPO

Antes de evaluar el efecto de la Neuregulina y la estimulación óptica sobre la actividad poblacional en el hipocampo, se realizaron controles de tiempo para evaluar la estabilidad de la actividad eléctrica hipocampal en nuestras condiciones de registro y a los mismos tiempos requeridos para los grupos experimentales. Para este análisis se evaluaron ventanas de actividad de 1 minuto a los minutos 30, 60, 90 y 120 minutos que corresponden con los momentos de aplicación de las distintas concentraciones de Neuregulina. Los resultados muestran que la actividad hipocampal se caracteriza por tener $7.8 \pm 0.4 \mu\text{V}$ de amplitud, $5.4 \pm 0.4 \text{ Hz}$ de frecuencia pico y $2.6 \pm 0.7 \text{ nV}^2$ de potencia. En cuanto a la potencia de la actividad hipocampal, no se observaron diferencias significativas en la integración de la misma entre 3 y 60 Hz a lo largo del tiempo en nuestras condiciones de registro (Fig. 7.3.1). En condiciones control las características de la actividad hipocampal se describen en la Tabla 7.3.1. (n=6)

Tiempo	Amplitud	Frecuencia	Potencia
30 min	$8.1 \pm 0.4 \mu\text{V}$	$5.4 \pm 0.4 \text{ Hz}$	$2.4 \pm 1.0 \text{ nV}^2$
60 min	$7.9 \pm 0.3 \mu\text{V}$	$5.3 \pm 0.5 \text{ Hz}$	$2.6 \pm 0.6 \text{ nV}^2$
90 min	$7.7 \pm 0.3 \mu\text{V}$	$5.5 \pm 0.4 \text{ Hz}$	$2.6 \pm 0.8 \text{ nV}^2$
120 min	$7.6 \pm 0.2 \mu\text{V}$	$5.5 \pm 0.5 \text{ Hz}$	$2.6 \pm 0.7 \text{ nV}^2$

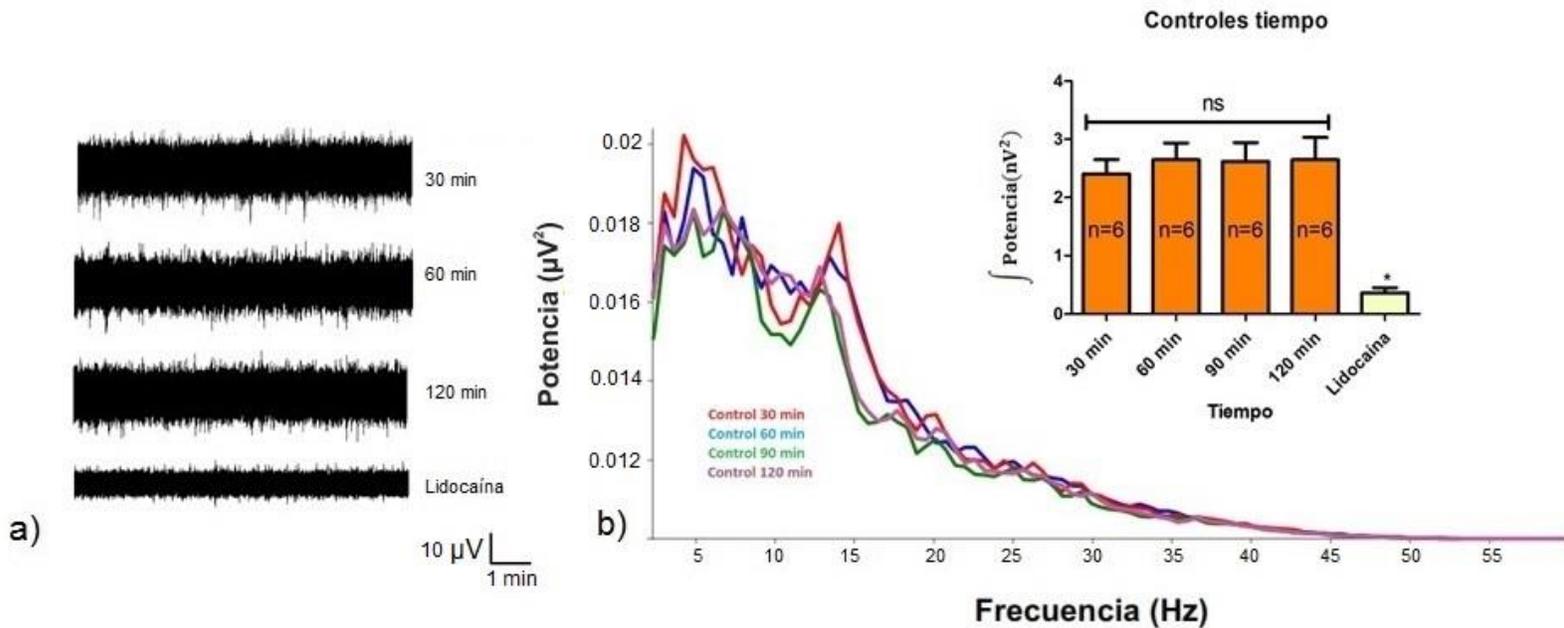


Figura 7.3.1. La actividad espontánea del hipocampo se mantiene estable por al menos 2 horas.

- a) Registros representativos de la actividad espontánea poblacional de la región CA1 del hipocampo en condiciones control y durante dos horas continuas de registro, así como en presencia de Lidocaína 1 mM
- b) Espectros de potencia de la actividad representada en a). El inserto muestra la cuantificación de la potencia de la actividad hipocampal (30 min: $2.4 \pm 1.0 \text{ nV}^2$; 60 min: $2.6 \pm 0.6 \text{ nV}^2$; 90 min: $2.6 \pm 0.8 \text{ nV}^2$ y 120 min: $2.6 \pm 0.7 \text{ nV}^2$) que muestra que no hay cambios en la magnitud de la actividad hipocampal a lo largo del tiempo y que dicha actividad es sensible a la aplicación de lidocaína en la solución de registro.

* denota una diferencia significativa con respecto a la actividad control ($p < 0.05$).

ns denota la ausencia de diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los grupos enmarcados por la línea.

Esta actividad reportada, representa la actividad espontánea “desorganizada” de las rebanadas de hipocampo extraídas, por lo que se observan en algunos de los registros picos de actividad en diferentes frecuencias. Ya que extrajimos las rebanadas de su ambiente “natural” esta actividad difiere de la observada en registros *in vivo*, en los cuales se observa una organización y sincronización neuronal a distintas tareas. Sin embargo, el espectro de potencia mostrado en b) nos indica que no existen cambios significativos de la actividad a lo largo del tiempo registrado. Para uniformizar la información encontrada en estos registros, se realiza un promedio de las potencias obtenidas desde los 3 hasta los 60Hz (área bajo la curva), información que se resume en la cuantificación mostrada en el inserto. Es importante hacer hincapié en que esta actividad es mayoritariamente azarosa y que todos los registros difieren considerablemente en su forma, pero no en la potencia “total”. Parámetro que es un mejor indicativo de la actividad neuronal en este protocolo experimental.

7.3.2 EFECTO DE LA MICROINYECCIÓN VIRAL SOBRE LA ACTIVIDAD HIPOCAMPAL

Como control para estudiar el efecto de la estimulación óptica sobre la actividad poblacional en el hipocampo se utilizaron ratones transgénicos (TRG) transfectados mediante la microinyección de vectores virales (o su vehículo) en el área CA1 de la estructura hipocampal. Para poder realizar una comparación entre la actividad producida por la estimulación fótica se analizaron las potencias de la actividad de animales microinyectados con PBS (TRGPBS) o con lentivirus que contienen el gen que codifica para la GFP (TRGGFP) como vectores y los animales microinyectados con AAV que contiene el gen que codifica para la ChR2 (TRGChR2). No se encontraron diferencias significativas entre grupos. (Fig. 7.3.2) ($p < 0.05$) (TRG: $3.1 \pm 1.0 \text{ nV}^2$; TRGPBS: $3.1 \pm 1.0 \text{ nV}^2$; TRGGFP: $3.2 \pm 1.0 \text{ nV}^2$; TRGChR2: $3.0 \pm 0.5 \text{ nV}^2$).

Al igual que en el apartado anterior -y en los que se presentan posteriormente- la actividad registrada presenta una variabilidad considerable en la forma de su espectro de potencia, (esto puede ser debido a múltiples factores que incluyen desde la manipulación de los sujetos experimentales hasta la preparación del líquido cefalorraquídeo artificial) sin embargo, el parámetro que más nos interesa estudiar -que es la potencia de la actividad generalizada- no presenta diferencias significativas en los controles presentados en la figura 7.3.2.

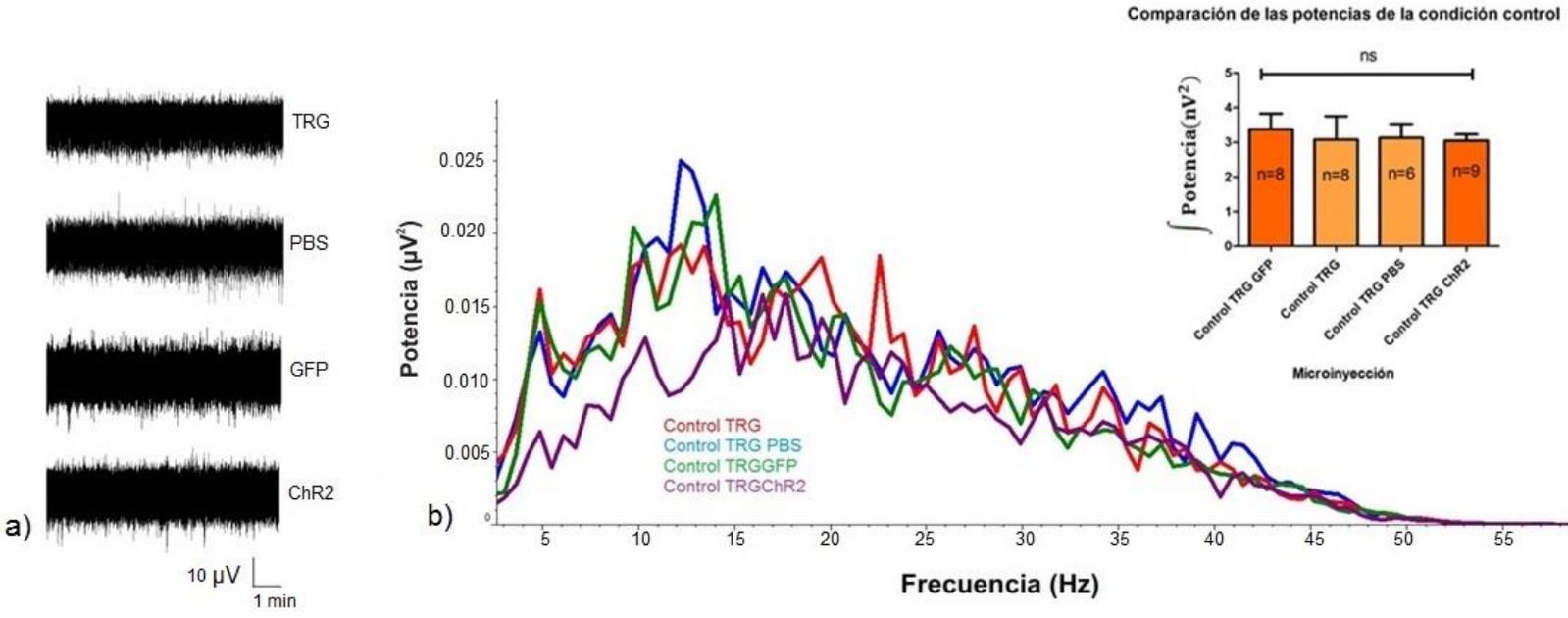


Figura 7.3.2 La microinyección en el hipocampo no afecta la actividad espontánea in vitro

- a) Registros representativos de la actividad espontánea poblacional de la región CA1 del hipocampo en condiciones control de las distintas microinyecciones realizadas 15 días previos al registro. Se observa que no hay diferencia entre la actividad de los ratones intactos, inyectados con solución salina (PBS), transfectados con virus que expresa GFP y aquellos transfectados con el virus que expresa ChR2.
- b) Espectros de potencia de la actividad representada en a). El inserto muestra la cuantificación de la potencia de la actividad hipocampal de 3 a 60 Hz que muestra que no hay cambios en la magnitud de dicha actividad entre los animales experimentales sujetos a las distintas microinyecciones.

ns denota la ausencia de diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los grupos enmarcados por la línea.

7.3.3 EFECTO DE LA NRG1 SOBRE LA ACTIVIDAD HIPOCAMPAL *IN VITRO*

Para estudiar el efecto de la NRG1 sobre la actividad poblacional del hipocampo, se aplicó ésta a distintas concentraciones en el baño de registro (ver “Materiales y Métodos”). Al aplicar NRG1 1 nM se observó una reducción del $42.0 \pm 3.5\%$ de la potencia de la actividad hipocampal (control: $3.8 \pm 2.5 \text{ nV}^2$, NRG1 1nM: $2.3 \pm 1.6 \text{ nV}^2$). La mayor inhibición de la actividad hipocampal se observó al colocar la concentración de 3 nM de la NRG1 (reducción del $73.0 \pm 2.8\%$ de la potencia comparado con el control), sin diferencias significativas entre esta concentración y la concentración de 10 nM (3nM: $1.2 \pm 0.7 \text{ nV}^2$, 10nM: $0.9 \pm 0.6 \text{ nV}^2$). ($n=6$; $p<0.05$) Este efecto puede ser revertido al lavar el fármaco ya que se regresa a los niveles basales de actividad hipocampal después de 30 minutos de aplicación de LCRA pre oxigenado (control: $3.8 \pm 0.4 \text{ nV}^2$, Lavado: $3.2 \pm 0.4 \text{ nV}^2$). Como en todos los experimentos descritos hasta el momento, al final del experimento se corroboró que el efecto fuera resultado de cambios en la actividad neuronal mediante el uso de lidocaína. Se observa que hay diferencias significativas entre la actividad control, la aplicación del fármaco NRG1 y la aplicación de la Lidocaína 1 mM posterior al lavado del tejido. (Figura 7.3.3) ($p<0.05$).

Estos cambios significativos se observan tanto en la potencia de la actividad (7.3.3 b) como en la forma del espectrograma (7.3.3 c). Sin embargo, como ya se mencionó ampliamente, la distribución de las frecuencias no es un parámetro que analizamos ya que esta depende directamente de la actividad de grupos neuronales, que en este protocolo experimental es desorganizada. Nuevamente al cuantificar la actividad en toda la banda de frecuencias analizada (3-60 Hz) encontramos las diferencias que se discuten posteriormente. En la figura 7.3.3 c) se observa la distribución de la potencia “total” en distintas condiciones experimentales, podemos notar una clara diferencia en el comportamiento de esta distribución resultado de una activación “tónica” de las interneuronas, sin embargo los mecanismos específicos que originan cambios en la actividad “espontánea” -y por consiguiente en el espectrograma- no pueden ser descritos a detalle utilizando una técnica farmacológica sobre actividad desorganizada, razón por la cual el

análisis de las distribuciones de frecuencias lo restringimos al protocolo optogenético, donde sí se pueden hacer inferencias respecto al comportamiento de una actividad que deja de ser “desorganizada” para seguir patrones específicos de actividad dirigidos por la activación de las interneuronas en frecuencias determinadas por nosotros.

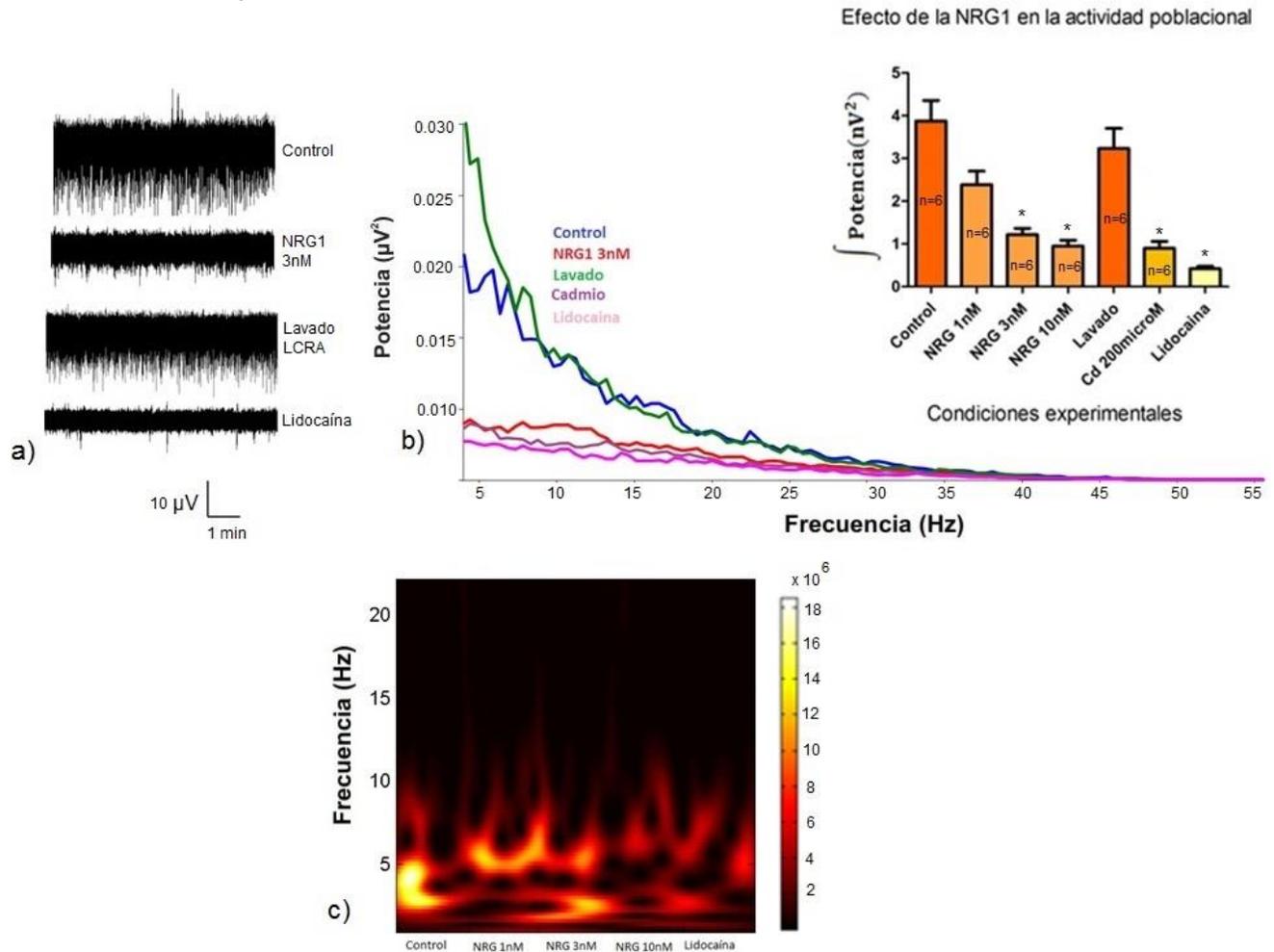


Figura 7.3.3. La Neuregulina 1 (NRG1) reduce la actividad poblacional en el hipocampo in vitro

- Registros representativos de la actividad espontánea poblacional de la región CA1 del hipocampo en las diferentes condiciones experimentales. Se observa la diferencia en la actividad entre el control y la aplicación de NRG1 (1, 3 y 10 nM), la recuperación de la actividad al lavar con LCRA preoxigenado, sin fármaco y en la presencia de lidocaína a 1mM.
- Espectros de potencia de la actividad representada en a). El inserto muestra la cuantificación de la potencia de la actividad hipocampal de 30-60 Hz. Se observa una reducción significativa en la potencia de la señal medida en nanovoltios. El efecto es reversible, ya que al lavar la NRG1 con LCRA se recupera la actividad (no hay diferencias significativas entre los espectros control y lavado). Se corrobora que se trata de actividad biológica con la aplicación de lidocaína, donde se reduce la actividad en más del 50%.
- Espectrograma del registro de un experimento representativo donde se muestran las distintas condiciones experimentales en ventanas de 1 segundo, cada concentración se obtiene de la adición de NRG1 a la solución de perfusión anterior. Se observa una reducción en la potencia y constancia de las bandas de frecuencias.

* denota una diferencia significativa con respecto a la actividad control ($p < 0.05$).

7.3.4 PAPEL DE LA TRANSMISIÓN GABAÉRGICA EN LOS EFECTOS DE LA NRG1

Para determinar si el efecto de la neuregulina involucra la activación de interneuronas, se realizó un protocolo bloqueando la transmisión GABAérgica con bicuculina 10 μ M, un antagonista de los receptores GABA_A (Ueno, *et al*, 1997). No se encontraron diferencias entre los espectros de potencia de la condición control y la aplicación del fármaco posterior a la aplicación de la bicuculina, demostrando que el efecto de la NRG1 es dependiente de la transmisión GABAérgica. (n=6). (Control: 9.6 ± 1.9 nV²; Bicuculina: 11.6 ± 2.0 nV²; NRG3nM: 9.1 ± 1.8 nV²);.

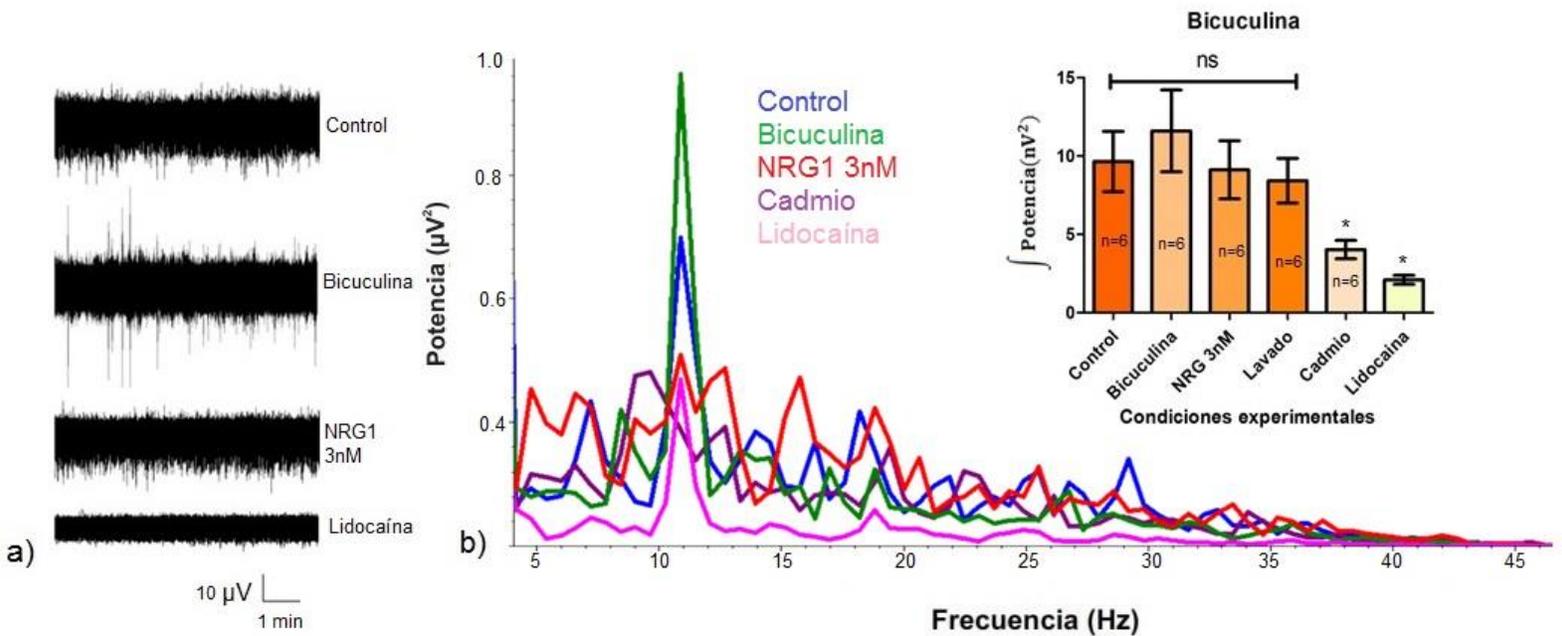


Figura 7.3.4 El efecto de la NRG1 depende de la transmisión GABAérgica

- a) Registros representativos de la actividad espontánea poblacional de la región CA1 del hipocampo en condiciones control y el efecto de la NRG1 posterior a la aplicación del antagonista GABAérgico bicuculina. Se observa que no hay diferencia entre la actividad control y la aplicación de la NRG1 posterior a la aplicación de bicuculina sugiriendo que el efecto de la NRG1 depende de la inhibición mediada por GABA.
- b) Espectros de potencia de la actividad representada en a). El inserto muestra la cuantificación de la potencia de la actividad hipocampal de 3 a 60 Hz que muestra una reducción significativa en la potencia de la señal medida en nanovoltios. Se corrobora que se trata de actividad biológica con la aplicación de lidocaína 1mM, donde se reduce la actividad en más del 50%.

* denota una diferencia significativa con respecto a la actividad control ($p < 0.05$).

ns denota la ausencia de diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los grupos enmarcados por la línea

7.3.5 EFECTO DE LA NRG1 SOBRE LA FRECUENCIA PICO DE LA ACTIVIDAD POBLACIONAL EN EL HIPOCAMPO

Además de la potencia de la actividad poblacional, se decidió observar el efecto de la aplicación del fármaco sobre la “frecuencia pico”, esto es, sobre la frecuencia más alta observada en el espectro de potencia. No se encontraron diferencias significativas en la magnitud (control: $48.4 \pm 0.4 \text{ nV}^2$, NRG1 10nM: $22.3 \pm 0.6 \text{ nV}^2$) ni en la potencia de la frecuencia pico (control: $10.6 \pm 0.3 \text{ Hz}$, NRG1 10nM: $13.1 \pm 0.6 \text{ Hz}$) para ninguna de las condiciones experimentales. ($n=6$; $p < 0.05$).

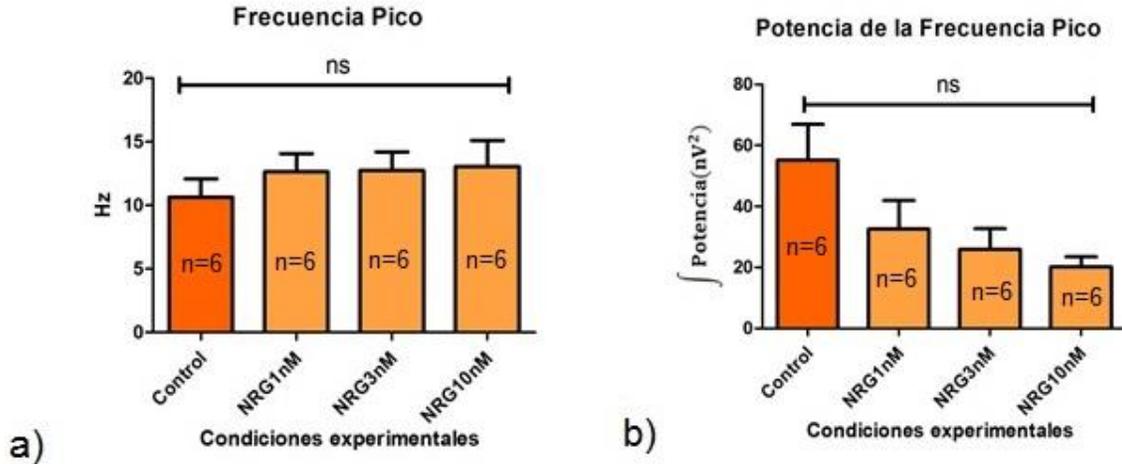


Figura 7.3.5 La NRG1 no tiene efecto sobre la frecuencia pico en el hipocampo in vitro

- Cuantificación de la Frecuencia pico de la actividad espontánea del hipocampo durante la condición control y posterior a la aplicación de NRG1 en concentraciones crecientes (1nM, 3 nM y 10nM). No se encontraron diferencias significativas en la frecuencia pico de ninguna de las condiciones.
- Cuantificación de la potencia de las frecuencias pico de la actividad espontánea del hipocampo durante la condición control y posterior a la aplicación de NRG1 en concentraciones crecientes (1nM, 3nM y 10nM). No se encontraron diferencias significativas en la potencia de las frecuencias pico de cada condición experimental.

ns denota la ausencia de diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los grupos enmarcados por la línea.

7.3.6 EFECTO DE LA NRG1 EN LA GENERACIÓN DE RITMOS THETA

Para estudiar el efecto de la NRG1 sobre la generación de ritmos theta se siguió el protocolo descrito en la sección de “materiales y métodos”. Se encontraron diferencias significativas entre los espectros de potencia de los controles y aquellos tomados al colocar el fármaco (reducción del $17.0 \pm 1.9\%$ de la potencia; control: $171.1 \pm 25.0 \text{ nV}^2$, 1nM: $142.1 \pm 18.0 \text{ nV}^2$), siendo evidente a partir de los primeros minutos de la aplicación de la concentración más baja (1nM). El mayor efecto se observó al colocar la concentración de 10nM de la NRG1 (reducción del $66.0 \pm 2.4\%$ de la potencia comparado con el control), sin diferencias significativas entre esta concentración y la concentración de 3nM (3nM: $86.4 \pm 13.0 \text{ nV}^2$, 10nM: $57.1 \pm 9.4 \text{ nV}^2$) ($n=6$; $p<0.05$). Este efecto puede ser revertido al lavar el fármaco en las rebanadas, sin embargo en el caso de la generación de ritmo theta, la recuperación es menos evidente, siendo la potencia menor incluso en comparación con la aplicación de 1nM de NRG1 (control: $171.1 \pm 25.0 \text{ nV}^2$, Lavado: $114.5 \pm 5.0 \text{ nV}^2$). Se observa que hay diferencias significativas entre la actividad control, la aplicación del fármaco NRG1 y la aplicación de la Lidocaína posterior al lavado del tejido. (Figura 7.3.6) ($n=6$; $p<0.05$).

A diferencia de los experimentos anteriores, la generación del ritmo theta requiere de la estructura hipocampal completa, la cual genera estas oscilaciones de manera espontánea. Al comparar los espectros de potencia de estos registros electrofisiológicos, pues, se observa la predominancia de frecuencias bajas, que corresponden a las oscilaciones lentas en las cuales se encuentra armonizado el hipocampo. Esta actividad observada, en contraste con la obtenida de los registros en rebanadas, no es “desorganizada”, ya que para el mantenimiento de este ritmo se requiere de una interacción neuronal muy precisa, lo que resulta en un espectro de potencia de forma característica para todos los experimentos realizados. Sin embargo ya que la estrategia utilizada para estos experimentos fue la farmacológica, un análisis de la distribución de frecuencias no provee información sobresaliente sobre el cambio en el estado del sistema. Se puede notar una evidente desaparición del ritmo posterior a la aplicación de la NRG1, el cual se

recupera deficientemente posterior al lavado del fármaco debido a las complejas interacciones que se requieren para generarlo. Al cuantificar la “actividad total” –a lo largo de todas las bandas de frecuencia- podemos observar disminuciones en la actividad similares a las presentadas sobre la actividad desorganizada de las rebanadas de hipocampo. Estos resultados reiteran la necesidad de una herramienta de activación interneuronal mucho más precisa que en lugar de abolir el ritmo theta nos permita modularlo para analizar sus dinámicas.

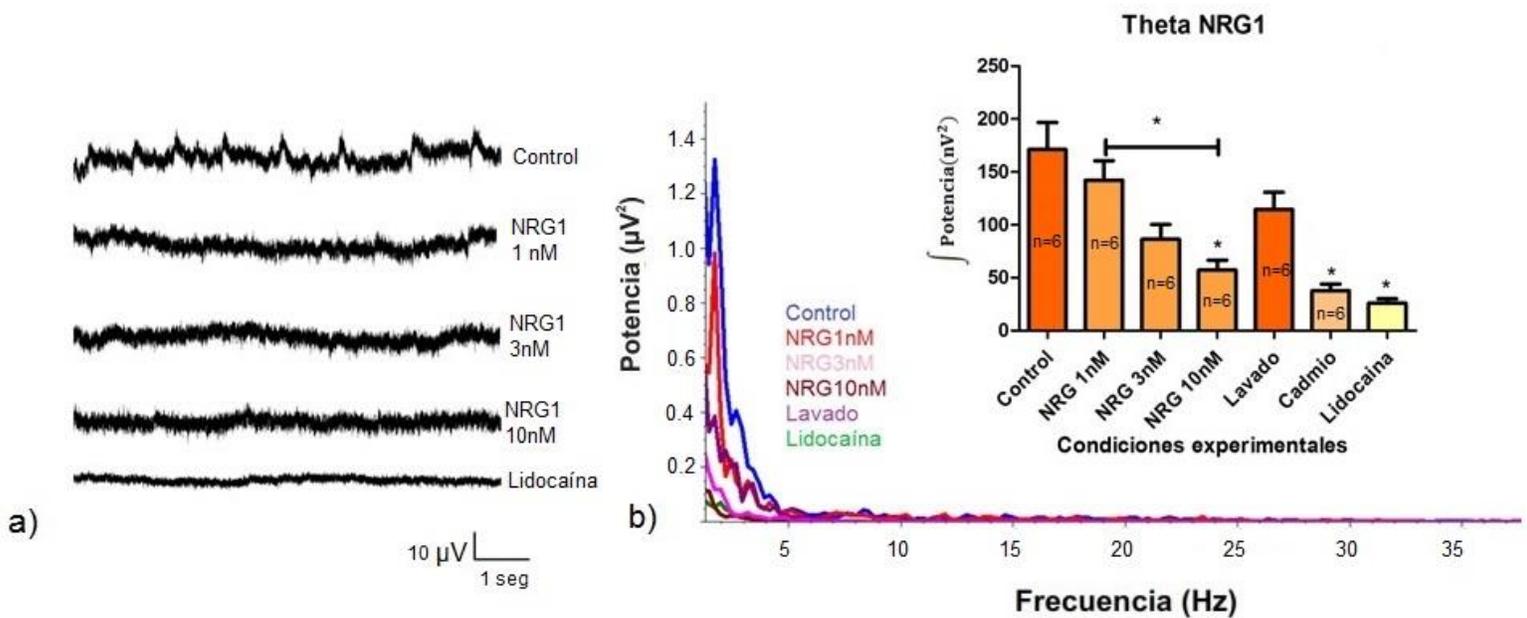


Figura 7.3.7. La NRG1 inhibe la generación de los ritmos theta en el hipocampo in vitro

- a) Registros de la actividad espontánea en las diferentes condiciones experimentales. Se observa la diferencia en la actividad entre el control y la aplicación de la NRG1, la desaparición del ritmo theta y la pérdida de la actividad al colocar lidocaína.
- b) Espectros de potencia de la actividad representada en a). Cuantificación de la potencia de la actividad hipocámpal de 3 a 60 Hz. Se observa una reducción significativa en la potencia de la señal medida en nanovoltios. El efecto es reversible, ya que al lavar la NRG1 con LCRA se recupera la actividad (no hay diferencias significativas entre los espectros control y lavado). Se corrobora que se trata de actividad biológica con la aplicación de lidocaína, donde se reduce la actividad en más del 50%.

* denota una diferencia significativa con respecto a la actividad control ($p < 0.05$).

7.3.7 EFECTO DE LA NRG1 SOBRE LA FRECUENCIA PICO DURANTE LA GENERACIÓN DE RITMOS

Además de la generación de ritmos, se decidió observar el efecto de la aplicación del fármaco sobre la “frecuencia pico” durante la actividad rítmica, esto es, sobre la frecuencia más alta observada en el registro. A diferencia de la actividad poblacional, en la generación de ritmos se encontraron diferencias significativas en la potencia de la frecuencia pico (control: $237.5 \pm 0.4 \text{ nV}^2$, NRG1 3nM: $69.6 \pm 0.4 \text{ nV}^2$, NRG1 10nM: $48.1 \pm 0.6 \text{ nV}^2$) pero no en la magnitud (control: $4.4 \pm 0.9 \text{ Hz}$, NRG1 3nM: $4.9 \pm 0.7 \text{ Hz}$, NRG1 10nM: $5.8 \pm 0.7 \text{ Hz}$) para las concentraciones 3nM y 10nM. ($n=6$; $p < 0.05$).

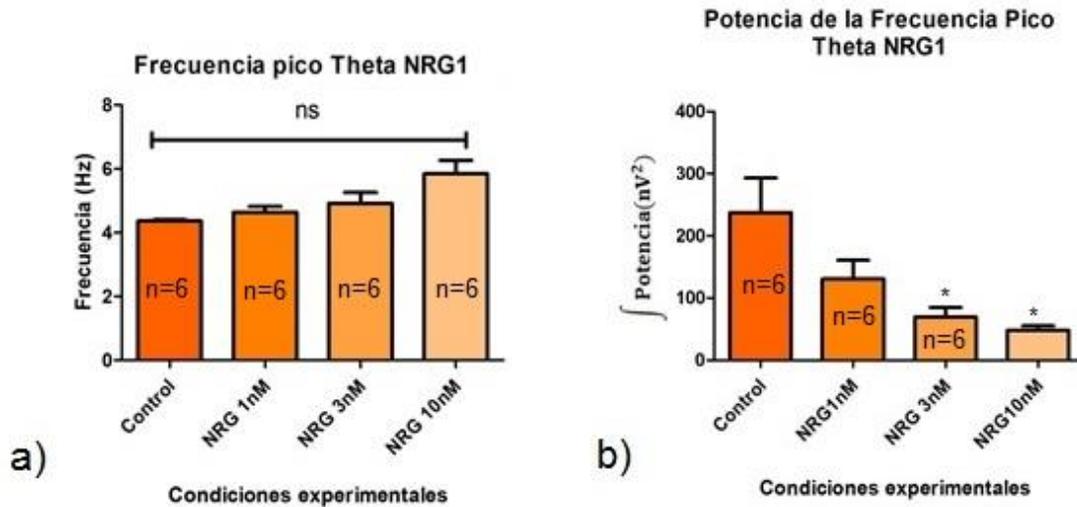


Figura 7.3.7 La NRG1 disminuye la potencia de la frecuencia pico durante la generación de ritmos en el hipocampo in vitro

- Cuantificación de la Frecuencia pico de la actividad en theta in vitro durante la condición control y posterior a la aplicación de NRG1 en dosis crecientes (1nM, 3nM y 10nM). No se encontraron diferencias significativas en la frecuencia pico de ninguna de las condiciones.
- Cuantificación de la potencia de las frecuencias pico de la actividad theta in vitro durante la condición control y posterior a la aplicación de NRG1 en concentraciones crecientes (1nM, 3nM y 10nM). Se observa una clara reducción en la potencia de la frecuencia pico para las concentraciones de 3 y 10 nM.

* denota una diferencia significativa con respecto a la actividad control ($p < 0.05$).
ns denota la ausencia de diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los grupos enmarcados por la línea.

7.3.8 EFECTO DE LA ESTIMULACIÓN CON LUZ

Para determinar si el efecto de la estimulación es exclusivo de los animales que expresan la ChR2 y no se trata de un artefacto del protocolo de estimulación *per se*, se realizaron controles de estimulación de animales microinyectados con PBS y animales transfectados con virus que inducen la expresión de la GFP (ver “Materiales y Métodos”). No se encontraron diferencias entre los espectros de potencia de la condición control y la estimulación con luz azul en los animales inyectados con PBS y con el virus que contiene el gen que codifica para la GFP. (PBS n=8; GFP n=6). (PBS Control: $19.1 \pm 6.0 \text{ nV}^2$; Estimulación: $19.1 \pm 4.0 \text{ nV}^2$; Lidocaína: $6.1 \pm 1.7 \text{ nV}^2$); (GFP Control: $31.1 \pm 5.0 \text{ nV}^2$; Estimulación: $31.6 \pm 8.0 \text{ nV}^2$; Lidocaína: $9.3 \pm 2.1 \text{ nV}^2$;) sugiriendo que el procedimiento experimental seguido para realizar las estimulaciones no resulta en cambios en la actividad del hipocampo, y que los resultados mostrados posteriormente son debido al efecto que se genera al activar las interneuronas que expresan la Channelrhodopsina-2.

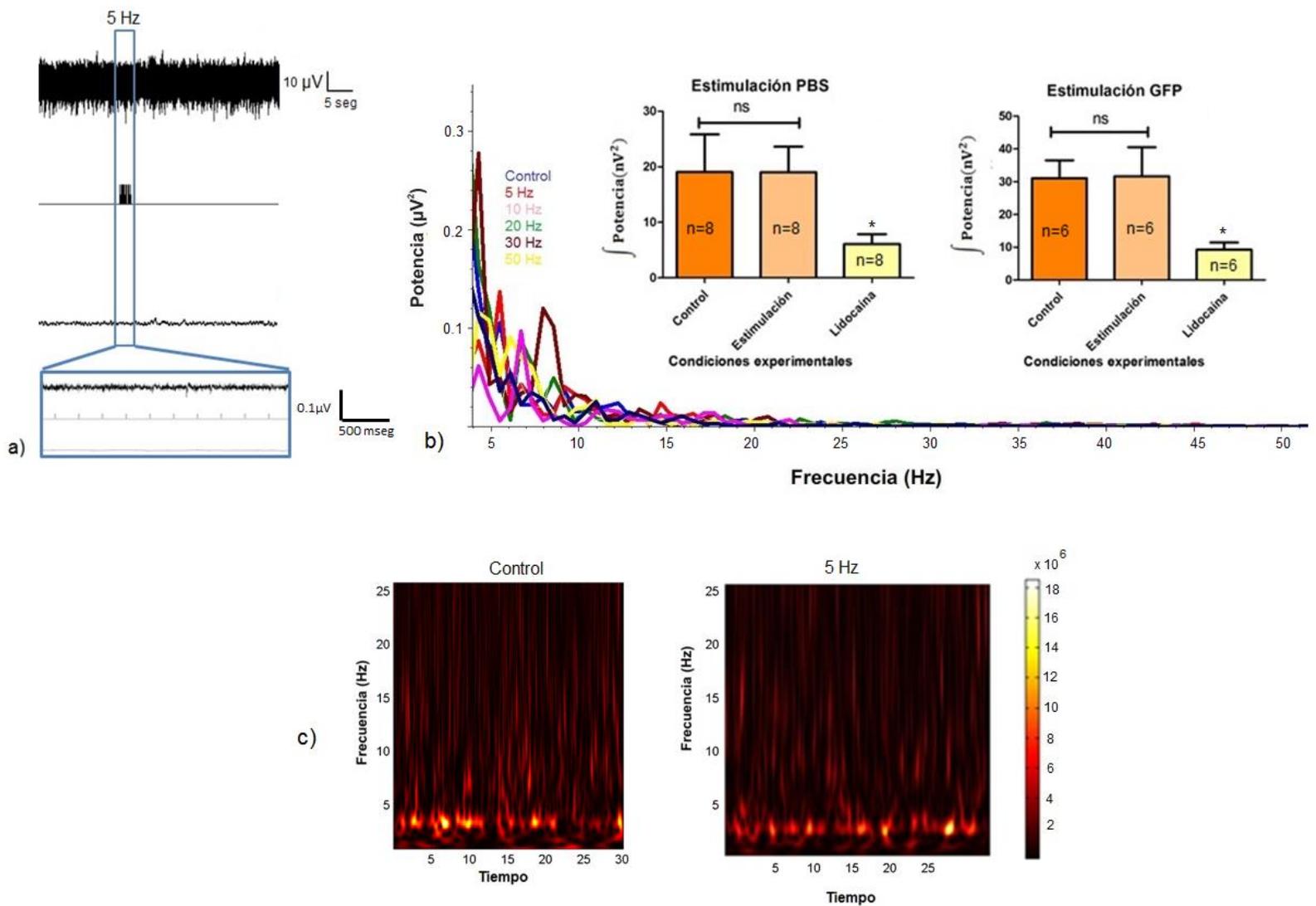


Figura 7.3.8 La estimulación con luz no afecta la actividad espontánea del hipocampo *in vitro* en animales transfectados con virus que expresa la proteína verde fluorescente

- a) Registro representativo de la actividad espontánea poblacional de la región CA1 del hipocampo en condiciones control y durante la estimulación con luz azul a una frecuencia de 5 Hz. El trazo superior representa la señal amplificada, el trazo de en medio representa los pulsos de luz y el trazo inferior representa la señal rectificada e integrada.
- b) Espectro de potencia de la actividad espontánea del hipocampo en un animal transfectado con virus que expresa la proteína verde fluorescente GFP en condiciones control y las distintas frecuencias de estimulación. El inserto muestra la cuantificación de la potencia de la actividad de campo local de 3 a 60 Hz donde se observa que no hay diferencias significativas entre la amplitud de los espectros de potencia entre las condiciones control y las condiciones de estimulación para ninguna de las microinyecciones.
- c) Espectrogramas del registro de campo donde se muestran las bandas de frecuencia y sus potencias durante la actividad control y la estimulación a 5 Hz. Se observa que no hay diferencias entre la actividad control y la actividad durante la estimulación.

* denota una diferencia significativa con respecto a la actividad control ($p < 0.05$).
 ns denota la ausencia de diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los grupos enmarcados por la línea.

7.3.9 ACTIVACIÓN OPTOGENÉTICA

Para determinar el efecto de la estimulación en animales que expresan la ChR2, se analizaron los registros realizados a rebanadas de hipocampo de animales transgénicos de tres semanas de edad al ser estimulados con luz azul. Se encontró que los animales transfectados mostraron una respuesta ante la estimulación a distintas frecuencias (5, 10, 20, 30 y 50 Hz). Se encontró un aumento significativo de la potencia de la actividad hipocampal durante la estimulación optogenética para la condición control, dejando de ser significativa cuando se colocan los antagonistas Glutamatérgicos CNQX y AP5 y el antagonista GABAérgico bicuculina (n=12). (ChR2 Control: $20.3 \pm 4.0 \text{ nV}^2$; Estimulación: $92.9 \pm 5.0 \text{ nV}^2$; Interestimulaciones: $53.1 \pm 5.0 \text{ nV}^2$) (Fig. 7.3.9). Debido a la variabilidad existente, se normalizaron los datos utilizando el control como referencia. Se encontraron diferencias significativas en los períodos de estimulación optogenética de los controles del $272.0 \pm 18.2\%$ (n=12) para el período de estimulación y del $254.0 \pm 26.7\%$ para el período interestimulaciones de los animales que expresan la ChR2. Para los animales control (PBS y GFP) no se encontraron diferencias significativas (PBS estimulación: $97.0 \pm 28.7\%$; PBS interestimulaciones: $98.3 \pm 21.1\%$; n=8; GFP estimulación: $110.0 \pm 33.4\%$ GFP interestimulaciones: $119.9 \pm 45.8\%$; n=6.).

Es interesante notar que tanto para los períodos de estimulación optogenética como para los períodos interestimulaciones, encontramos en el espectro de potencia picos de actividad en las frecuencias de estimulación utilizadas (5, 10, 20, 30 y 50 Hz) estos picos representan la frecuencia a la que se “engancha” el sistema como resultado de la activación de las interneuronas utilizando un patrón de estimulación específico, importantemente esta potencia es mucho mayor durante la estimulación que en los períodos entre estimulaciones, lo cual hace sentido considerando que es el momento en el que se está presentando la activación interneuronal y que esta potencia decae conforme el sistema regresa al equilibrio homeostático representado por la actividad “desorganizada” que se observa en los períodos posteriores a las estimulaciones (20 minutos).

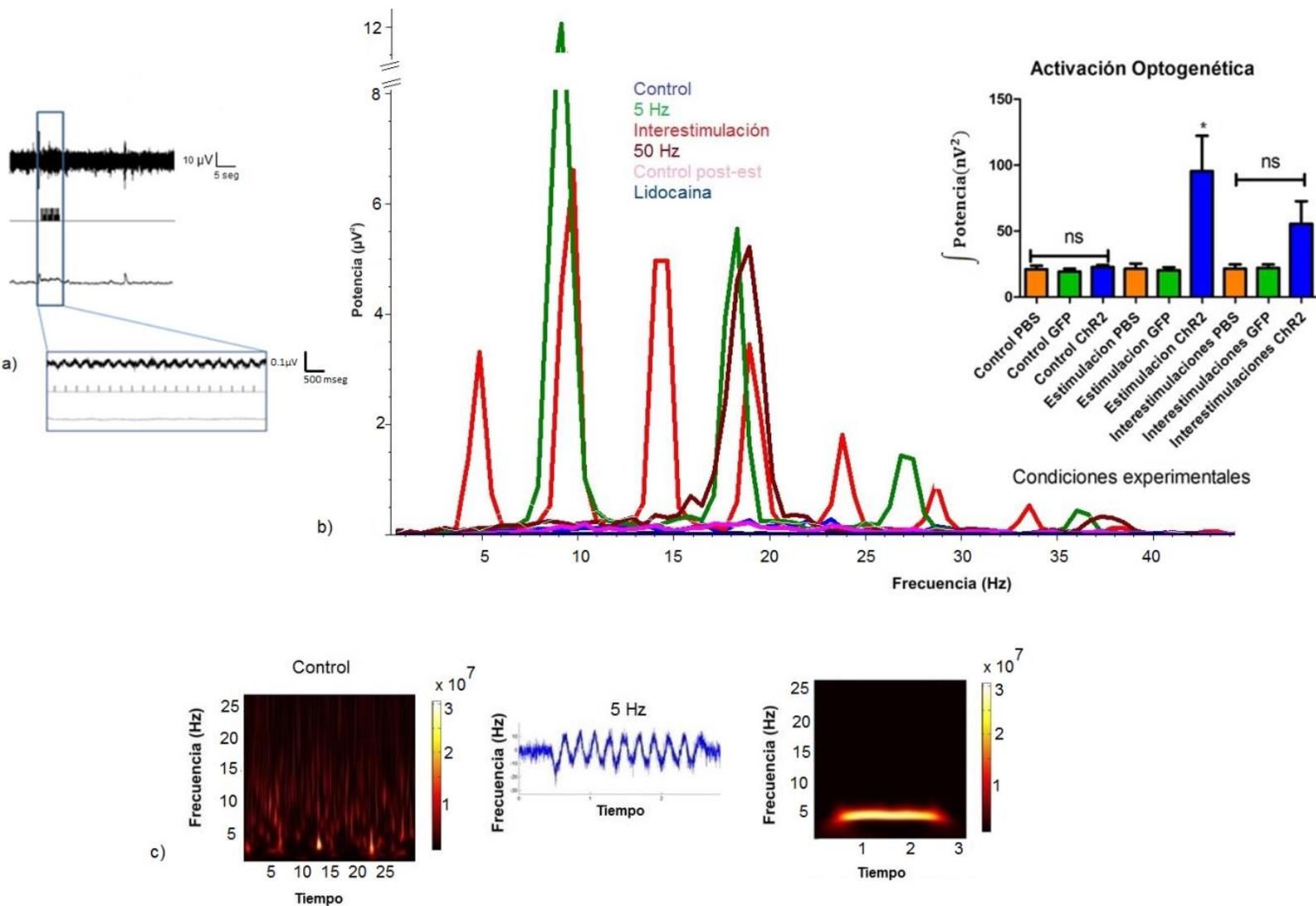


Figura 7.3.9 La activación optogenética de las interneuronas que expresan ChR2 resulta en un aumento de la actividad de campo local durante y después de las estimulaciones.

- a) Registro representativo de la actividad espontánea poblacional de la región CA1 del hipocampo en condiciones control y la estimulación con luz a 5 Hz de frecuencia donde se observa un aumento en la actividad durante la estimulación con luz azul (recuadro azul). El trazo superior representa la señal amplificada, el trazo de en medio representa los pulsos de luz y el trazo inferior representa la señal rectificadada e integrada
- b) Espectro de potencia de la actividad representada en a) en un animal transfectado con virus que expresa la ChR2 en condiciones control y las frecuencias de estimulación de 5 y 50 Hz. El inserto muestra la cuantificación de la potencia de la actividad de campo local de 3 a 60 Hz donde se observan diferencias significativas de la amplitud de los espectros de potencia entre la actividad control y la estimulación para los animales transfectados con ChR2 pero no para los animales microinyectados con GFP y PBS.
- c) Espectrogramas del registro de campo donde se muestran las bandas de frecuencia y sus potencias en la actividad control y durante la estimulación a 5 Hz. Se observan diferencias significativas entre las frecuencias del espectrograma durante la actividad control y la modulación en frecuencias bajas para la estimulación con luz a 5 Hz de frecuencia.

* denota una diferencia significativa con respecto a la actividad control ($p < 0.05$).
 ns denota la ausencia de diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los grupos enmarcados por la línea.

7.3.10 PAPEL DE LA TRANSMISIÓN SINÁPTICA EN LOS EFECTOS DE LA ESTIMULACIÓN OPTOGENÉTICA SOBRE LA ACTIVIDAD DE CAMPO ESPONTÁNEA

Para demostrar que el efecto de la estimulación no era debido a un artefacto producto del protocolo de estimulación, se aplicaron al baño los antagonistas glutamatérgicos CNQX y AP5 (Blake, Brown, y Collingridge, 1988), se repitió el protocolo de estimulación (ver “Materiales y Métodos”). Posteriormente se colocó el antagonista GABAérgico bicuculina (Ueno, *et al*, 1997), se repitió el protocolo de estimulación y finalmente se colocó Lidocaína y se repitió el mismo protocolo de estimulación con luz. Se encontró que la respuesta ante la estimulación optogenética a distintas frecuencias (5, 10, 20, 30 y 50 Hz) es clara antes del tratamiento farmacológico y que esta respuesta se reduce al colocar los antagonistas glutamatérgicos. Asimismo, se ve completamente abolida al colocar bicuculina y lidocaína, lo que demuestra que no se trata de un artefacto de la estimulación si no una respuesta del sistema producido por la activación de la ChR2 (n=12). (ChR2 Control: $25.3 \pm 3.0 \text{ nV}^2$; Estimulación: $57.7 \pm 1.5 \text{ nV}^2$; Interestimulaciones: $31.4 \pm 8.0 \text{ nV}^2$) (Fig. 7.3.10).

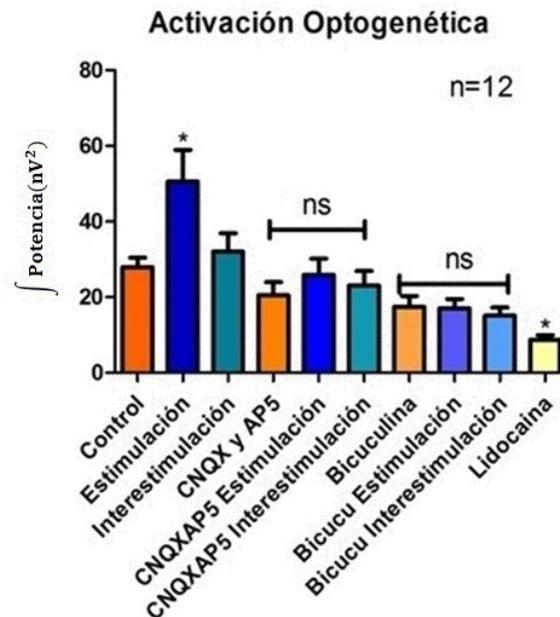


Figura 7.3.10. La respuesta a la estimulación optogenética es dependiente de la transmisión sináptica

a) Cuantificación de la potencia de la actividad hipocampal de 3 a 60 Hz donde se observan diferencias significativas en la amplitud de los espectros de potencia entre la actividad control y la estimulación, pero sin diferencias significativas durante la presencia de los antagonistas glutamatérgicos y GABAérgicos.

* denota una diferencia significativa con respecto a la actividad control ($p < 0.05$).

ns denota la ausencia de diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los grupos enmarcados por la línea.

7.3.11 ANALISIS DEL EFECTO DE LA ACTIVACIÓN OPTOGENÉTICA POR FRECUENCIA DE ESTIMULACIÓN

Una de las principales limitaciones en el estudio del papel de las interneuronas en la generación de ritmos utilizando la NRG1 es que, resultado de esta, se da una inhibición generalizada de la actividad de campo local. La estimulación con luz a distintas frecuencias, por el contrario, permite sincronizar una red neuronal a diferentes frecuencias. Debido a esto, analizamos las estimulaciones optogenéticas en sus distintas frecuencias con el objetivo de ver si alguna frecuencia induce una mayor respuesta del sistema y si es posible que el sistema responda acorde a la frecuencia de estimulación. Se encontró que las estimulaciones de baja frecuencia (5Hz) tienden a inducir mayores incrementos en la potencia comparadas con el control. (n=12) (Fig. 7.3.11 y tabla 7.3.11)

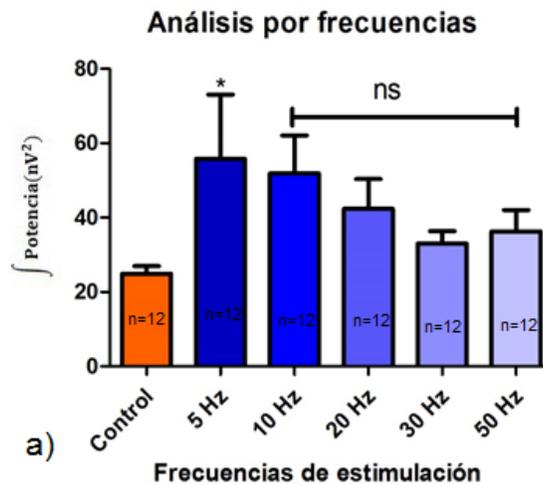


Figura 7.3.11 Las frecuencias bajas inducen una mayor respuesta en la actividad hipocampal

a) Cuantificación de la potencia de la actividad hipocampal de 3 a 60 Hz donde se observa que la estimulación a bajas frecuencias induce una respuesta mayor sobre la actividad de campo local en comparación con la actividad control y la estimulación con frecuencias altas.

* denota una diferencia significativa con respecto a la actividad control ($p < 0.05$).

ns denota la ausencia de diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los grupos enmarcados por la línea.

Control	5Hz	10Hz	20Hz	30Hz	50Hz
26.0±2.0 nV ²	63.0±1.6 nV ²	55.0±1.1 nV ²	42.0±1.0 nV ²	35.0±5.0 nV ²	39.0±10.0 nV ²

Tabla 7.3.11 Análisis por frecuencias.-

Media y desviación estándar de los datos para la estimulación a las distintas frecuencias.

7.3.12 EFECTO DE LA ESTIMULACION SOBRE LA FRECUENCIA PICO DE LA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA HIPOCAMPAL

Además de la potencia de la actividad poblacional, se decidió observar el efecto de la estimulación a distintas frecuencias sobre la “frecuencia pico”. Esto es, sobre la frecuencia más alta observada en el registro. Se encontró que las frecuencias bajas (5 Hz) disminuyen considerablemente la frecuencia pico (control: 12.1 ± 1.9 Hz; 5Hz: 5.1 ± 0.4 Hz) ($n=12$; $p < 0.05$). Interesantemente se observó que la única frecuencia que modulaba la frecuencia pico alrededor del valor de estimulación fue la frecuencia de 5 Hz. (5Hz: 5.1 ± 0.4 Hz). Por otro lado se corroboró que estas frecuencias bajas (5Hz) aumentan significativamente la potencia, en este caso de la frecuencia pico (Control: 11.9 ± 2.8 nV²; 5Hz: 347.4 ± 9.2 nV²). (Fig. 7.3.12).

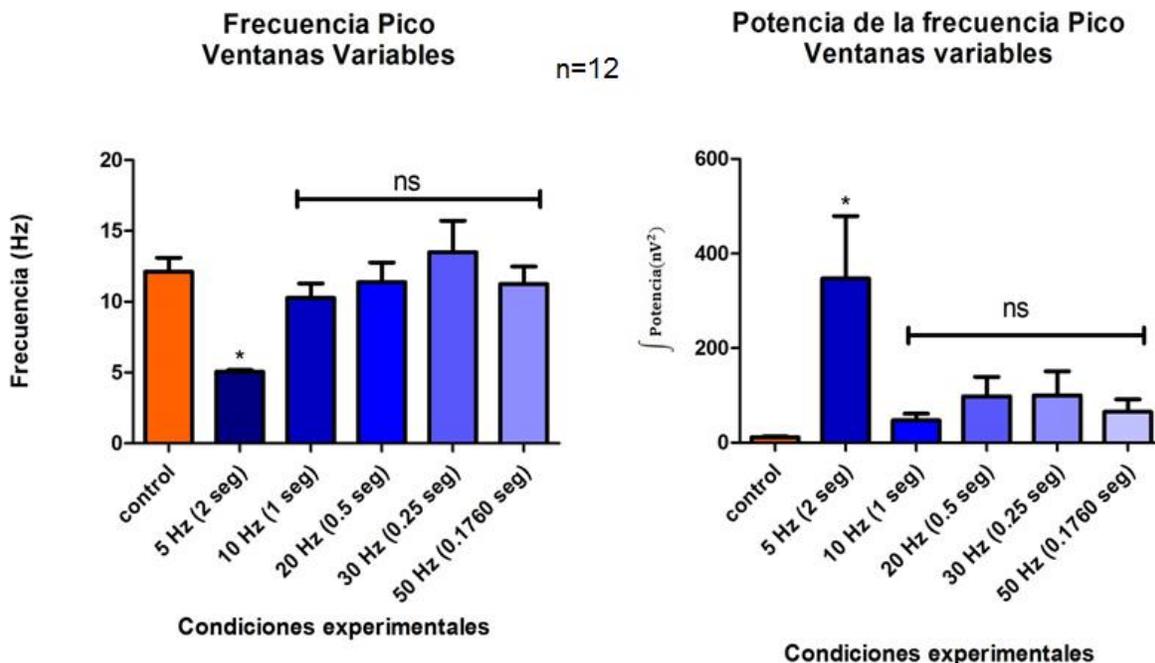


Figura 7.3.12 Las frecuencias bajas tienen un mayor efecto sobre la frecuencia pico de la actividad espontánea hipocampal

- Gráfica de la Frecuencia pico durante las estimulaciones a distintas frecuencias. Las frecuencias bajas (5 Hz) tienen una reducción significativa de la frecuencia pico, y modulan la actividad del sistema alrededor de los 5Hz en ambos casos.
- Gráfica de la potencia de las frecuencias pico. En concordancia con la frecuencia pico, las frecuencias bajas (5 Hz) muestran un aumento significativo de la potencia de la frecuencia pico.

* denota una diferencia significativa con respecto a la actividad control ($p < 0.05$).
 ns denota la ausencia de diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los grupos enmarcados por la línea.

7.3.13 EFECTO DEL AGONISTA GABAÉRGICO MUSCIMOL SOBRE LA ACTIVIDAD DE CAMPO ESPONTÁNEA DE ANIMALES DE 21 DÍAS DE EDAD.

Se ha reportado previamente que en animales de 2 a 3 semanas de edad GABA es capaz de despolarizar sus blancos sinápticos debido al contenido de canales NKCC1 en las células piramidales (Banke y McBain, 2006, Howard, Burger y Rubel, 2007 y Khirug, *et al*, 2008), por lo cual a esta edad la activación de interneuronas GABAérgicas resulta en una activación de las células principales. Este fenómeno se ve revertido posterior a los 21 días postnatales a partir de los cuales GABA hiperpolariza sus células blanco (Howard, Burger y Rubel, 2007 y Khirug, *et al*, 2008), resultando en la inhibición ampliamente descrita en la literatura (Alger y Nicoll, 1979, Hefft y Jonas, 2005). Debido a la observación de que la activación optogenética de las interneuronas GABAérgicas aumentaba la potencia de la actividad de campo local, decidimos explorar la posibilidad de que este resultado se debiera a la edad de nuestros animales experimentales -3 semanas-. Para esto se diseñó una batería de experimentos en los cuales se colocó el agonista GABAérgico muscimol (Guidotti y Costa, 1976 y Snodgrass, 1978). La aplicación de muscimol redujo significativamente la potencia de la actividad control, demostrando que la activación de los receptores GABAérgicos (GABA-A) resulta en una inhibición de las células piramidales que los expresan, reflejado en la reducción de la potencia de la actividad espontánea hipocampal. (n=6) (Control: $35.8 \pm 7.0 \text{ nV}^2$; Muscimol: $8.4 \pm 2.0 \text{ nV}^2$; Lidocaína: $8.1 \pm 2.0 \text{ nV}^2$;). (Fig. 7.3.13). Esto sugiere que los resultados con la estimulación optogenética son respuestas del sistema a una inhibición mediada por la activación de las interneuronas GABAérgicas, y no una despolarización GABAérgica que es común en animales de 1 o dos semanas de nacidos. (Banke y McBain, 2006, Howard, Burger y Rubel, 2007 y Khirug, *et al*, 2008).

Efecto de la aplicación de Muscimol sobre la actividad espontánea

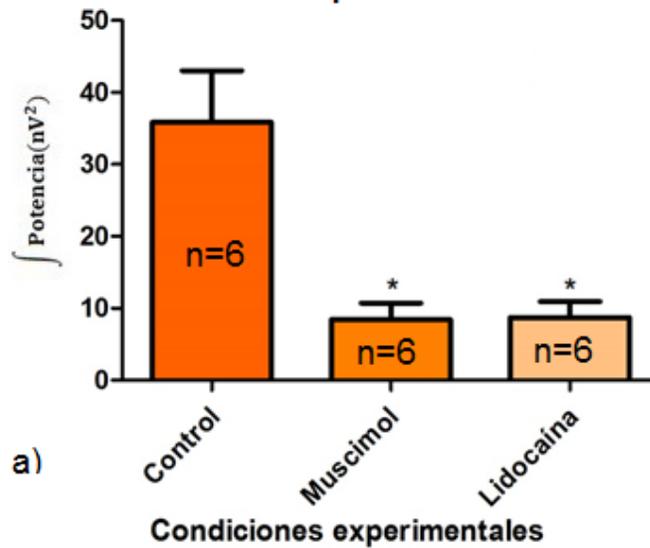


Figura 7.3.13 El agonista GABAérgico muscimol tiene un efecto inhibitorio en animales de 21 días de edad

- a) Cuantificación de la potencia de la actividad hipocampal de 3 a 60 Hz de registros realizados utilizando el Agonista GABAérgico muscimol, se observa que al ser aplicado, este reduce significativamente la actividad espontánea del hipocampo lo que sugiere que a los 21 días de edad, la activación de los receptores GABAérgicos resulta en una respuesta inhibitoria.

* denota una diferencia significativa con respecto a la actividad control ($p < 0.05$).

8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

8.1 OPTOGENÉTICA VS FARMACOLOGÍA. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DEL USO DE AMBAS TÉCNICAS.

La formación hipocampal tiene una red altamente distribuida de conexiones intrínsecas (Amaral, 1978). El estudio de esta región y la forma en la que fluye la información en esta estructura es sustancial para el entendimiento de los procesos cognitivos que dependen del hipocampo (Tamanaki y Nojyo, 1990 y Nakazawa, *et al*, 2002). Ya desde 1978 se había definido el modelo conocido como “circuito trisináptico de Amaral” en el cual se describe la ruta de activación del hipocampo que resultará en la activación de toda la estructura hipocampal por las cuatro rutas, que relacionan los distintos campos del hipocampo, en sucesión (Amaral, 1978). Si bien se conoce mucho acerca de la organización anatómica de sus conexiones intrínsecas (Blackstad, 1956, Andersen, *et al*, 1968, Amaral, 1978, Kohler, 1988, Ishizuka, Weber y Amaral, 1990, Amaral, Dolorfo y Alvarez-Royo, 1991, Cenquizca y Swanson, 2006), se sabe poco de las dinámicas que gobiernan la generación de ritmos específicos en el hipocampo (Bains, Longacher y Staley, 1999, Buzsáki, 2002, Jones y Wilson, 2005 y Benchenane, *et al*, 2010) y de las propiedades intrínsecas y sinápticas de sus componentes neuronales (Fox, 1989, Chapman y Lacaille, 1999, Ben-Ari y Gho 1998, Bell, *et al*, 2011). Más aún, existe información limitada sobre la relación entre los elementos celulares del hipocampo en términos de cómo interactúan para la generación de las dinámicas temporales ya descritas (Lacaille, *et al*, 1987, Bains, Longacher y Staley, 1999 y Fox y Kornblum, 2005). Con el objetivo de estudiar la importancia de la actividad interneuronal en el circuito hipocampal se estudiaron dos estrategias altamente específicas que nos permitieron activar las interneuronas en distintas preparaciones y analizar los efectos de esta activación. La primera estrategia fue una ampliamente explotada en las neurociencias: la estrategia farmacológica.

Se tomó la decisión de utilizar el fármaco neuregulina para activar a neuronas GABAérgicas, ya que se había demostrado que la NRG1 endógena se encuentra ampliamente expresada en el cerebro en condiciones normales, varias

subpoblaciones expresan el receptor para la misma (Lemke, 1996, Pinkas, *et al*, 1996, Burden y Yarden, 1997, Chang, *et al*, 1997, Meyer, *et al*, 1997, Eilam, *et al*, 1998, Corfas, Roy y Buxbaum, 2004 y Esper, Pankonin y Loeb, 2006) y la neuregulina permite la activación selectiva de interneuronas y la liberación del neurotransmisor inhibitorio GABA (Woo, *et al*, 2007, Chen, Zhang y Yin, 2010, Ting, *et al*, 2011 Janssen, Leiva-Salcedo y Buonanno, 2012 y Li, *et al*, 2012).

Esta activación interneuronal resulta en la modulación indirecta de sus neuronas blanco (Xie, Raetzman y Siegel, 2004, Chen, Zhang y Yin, 2010 y Wen, *et al*, 2010), sin efectos directos sobre la actividad de las neuronas piramidales, ya que estas no poseen el receptor ErbB4 (Yau, *et al*, 2003, Thompson, *et al*, 2007, Vullhorst, *et al*, 2009, Neddens y Buonanno, 2010 y Neddens, *et al*, 2011). Debido a lo anterior, se ha propuesto que la neuregulina provee una ventana de análisis del efecto de las interneuronas ErbB4 positivas sobre la actividad generalizada de la red hipocampal (Lemke, 1996, Buonanno y Fischbach, 2001, Esper, Pankonin y Loeb, 2006, Bjarnadottir, *et al*, 2007, Fisahn, *et al*, 2009, Buonanno, 2010 y Chen, Zhang y Yin, 2010).

Similar a lo descrito por Woo y colaboradores, encontramos que la aplicación aguda de NRG1 en rebanadas de cerebro es suficiente para observar una respuesta significativa en la actividad de neuronas hipocampales (Woo, *et al*, 2007). Para analizar si el efecto del fármaco es concentración dependiente, se realizó la aplicación aguda de tres concentraciones distintas de manera creciente (1, 3 y 10nM). En concordancia con lo reportado en la literatura, la concentración de 1 nM de NRG1 es capaz de inducir una reducción considerable de los espectros de potencia (Janssen, Leiva-Salcedo y Buonanno, 2012) de hasta el 40% en los experimentos realizados por nosotros. La concentración máxima fue establecida en 10 nM de acuerdo a lo reportado previamente en rebanadas de cerebro de animales de 4 semanas, en donde la aplicación de la NRG1 reduce los intervalos interespigas e incrementa la frecuencia de disparo de las interneuronas a esta concentración (Li, *et al*, 2012).

Así pues, se realizó la aplicación aguda de la Neuregulina 1 en concentraciones crecientes (1nM, 3nM y 10nM), se encontró que la aplicación de NRG1 3nM es suficiente para provocar una respuesta significativa, reduciendo el potencial de campo local hasta en un 70% (Fig. 7.3.4). Esto concuerda con lo reportado en la literatura donde se sugiere que la actividad de la Neuregulina es concentración dependiente, siendo las concentraciones de la misma altamente reguladas a lo largo del desarrollo como parte del proceso de formación de circuitos interneuronales (Chen, *et al*, 1994, Lemke, 1996, Burden y Yarden, 1997, Eilam, *et al*, 1998, Ozaki, Kishigami y Yano, 1998, Bernstein, *et al*, 2006, Esper, Pankonin y Loeb, 2006 y Ting, *et al*, 2011). La regulación de las concentraciones de NRG1 endógena es sustancial tanto en el desarrollo como en la regulación de los circuitos hipocampales en estadios postnatales (Lemke, 1996, Burden y Yarden, 1997, Eilam, *et al*, 1998, Bernstein, *et al*, 2006 y Meio y Xiong, 2008). La inhibición de la actividad hipocampal producida por la neuregulina es dependiente de la transmisión GABAérgica ya que, como mostramos en este trabajo, la aplicación del antagonista competitivo GABAérgico bicuculina suprimió el efecto inhibitorio de la NRG1 sobre los espectros de potencia (Fig. 7.3.5). Todo lo anterior sugiere que la presencia exógena de la Neuregulina induce la activación de las interneuronas GABAérgicas y la subsecuente inhibición en las neuronas piramidales (Wen, *et al*, 2010).

La estrategia farmacológica resulta en una inhibición “generalizada” de la actividad hipocampal, debido a que la presencia exógena de la NRG1 mantiene activas a un gran número de las interneuronas ErbB4 positivas (Hahn, *et al*, 2006, Li, *et al*, 2007, Chen, Zhang y Yin, 2010, Wen, *et al*, 2010 y Janssen, Leiva-Salcedo y Buonanno, 2012). Se sabe que la generación de ritmos requiere de la sincronización de grupos interneuronales específicos en las distintas fases de la generación de los ciclos oscilatorios (Wang y Buzsáki, 1996, Chapman y Lacaille, 1999, Cobb, *et al*, 1995, Packer y Yuste, 2011 y Courtin, *et al*, 2014), por lo que una activación simultánea de diferentes subtipos de interneuronas que normalmente disparan en distintas fases resulta en la desaparición de los ritmos hipocampales (Acsády Görcs y Freund, 1996, Freund, 2003, Jonas, *et al*, 2003,

Klausber, *et al*, 2003, Heff y Jonas, 2005, Tukker, 2007 y Kvitsiani, *et al*, 2013). Esto explica que la activación con neuregulina de interneuronas positivas para PV, CCK y SOM, que disparan en distintas fases de las oscilaciones theta (Klausberger, 2009, Neddens y Buonanno, 2010, Krook-Magnuson, *et al*, 2012 y Peng, *et al*, 2013), resulte en la abolición de la capacidad del circuito hipocampal para generar oscilaciones.

El ritmo theta es generado por un consorcio de mecanismos que incluyen elementos marcapasos, interacciones sinápticas en el circuito y propiedades intrínsecas de neuronas únicas (Fox, 1989, Kubie, Muller y Bostock, 1990, Kamondi, *et al*, 1997, Chapman y Lacaille, 1999, Buzsáki, 2002, Harris, *et al*, 2002, Jones y Wilson, 2005 y Benchenane, *et al*, 2010). Todos estos elementos son dependientes y/o modificados por la actividad inhibitoria de interneuronas (Buckmaster y Schwartzkroin, 1995, Wang y Buzsáki, 1996, Freund, 2003, Heff y Jonas 2005 y Packer y Yuste 2011) por lo cual no fue una sorpresa el encontrar que una activación generalizada de todos los subtipos de interneuronas que expresan el receptor ErbB4 (Ozaki, Kishigami y Yano, 1998, Yau, *et al*, 2003, Thompson, *et al*, 2007, Vullhorst, *et al*, 2009, Chen, Zhang y Yin, 2010, Neddens y Buonanno, 2010, Neddens, *et al*, 2011 y Janseen, Leiva-Salcedo y Buonanno, 2012) resultara en una completa abolición de la generación del ritmo theta incluso en la concentración más baja de la aplicación del fármaco Neuregulina (1nM). Si bien algunos autores reportan que la NRG1 “modula” la generación de ciertas oscilaciones, como lo son las oscilaciones Gamma (Fisahn, *et al*, 2009), nosotros encontramos que la activación simultánea de una gran cantidad de interneuronas resulta en la pérdida de la generación de ritmos hipocampales. Esto concuerda con otros estudios donde se asocia una desregulación del sistema de señalización NRG1/ErbB con actividad oscilatoria deficiente (Bjarnadottir, *et al*, 2007), actividad sináptica alterada (Iyengar y Mott, 2008, Kwon, *et al*, 2008 y Chen, Zhang y Yin 2010) y marcadores patológicos como la esquizofrenia (Corfas, Roy y Buxbaum, 2004, Hahn, *et al*, 2006, Mei y Xiong, 2008 y Buonanno, 2010).

Una de las principales complicaciones que se encuentran en el análisis de estos resultados es la gran diversidad de subtipos de interneuronas que se han descrito en el hipocampo (Acsády, Görcs y Freund, 1996, Freund y Buzsáki, 1996, Freund, 2003, Jonas, *et al*, 2003, Krook-Magnuson, *et al*, 2011 y Krook-Magnuson, *et al*, 2012) muchas de las cuales expresan el receptor ErbB4 (Yau, *et al*, 2003, Vullhorst, *et al*, 2009, Chen, Zhang y Yin, 2010, Neddens y Buonanno, 2010, Wen, *et al*, 2010, Neddens, *et al*, 2011, Ting, *et al*, 2011 y Janssen, Leiva-Salcedo y Buonanno, 2012), las cuales tienen efectos diversos en la actividad de las neuronas piramidales dependientes de su blanco postsináptico (p.e. dendritas, somas, cono axónico; Acsády, Görcs y Freund, 1996, Freund, 2003, Klausberger, 2009 y Krook-Magnuson, *et al*, 2011). Aun cuando esto representa limitaciones obvias para el análisis de los resultados aquí presentados, no hay duda de que el requerimiento sustancial para la generación de las oscilaciones hipocampales es el disparo sincrónico y modulado de las interneuronas (Fox, 1989, Freund, 2003, Cardín, *et al*, 2009 y Sohal, *et al*, 2009), por lo que al sobreactivarlas durante tiempos largos obtendremos una inhibición del sistema que abole los ritmos hipocampales. Resultados similares se encuentran a lo largo de la literatura, por ejemplo, desde 1992, el grupo de Smythe describía la importancia de la regulación inhibitoria en la generación de ritmos hipocampales. En estos estudios, la inactivación reversible del septum medial abate por completo las oscilaciones theta en CA1, sin embargo la aplicación secuencial de carbacol y bicuculina, en estas condiciones, resulta en oscilaciones *theta-like* similares a las inducidas en el circuito hipocampal intacto únicamente con carbacol, (Smythe, Colom y Bland, 1992). Este grupo demuestra que la inactivación del septum medial resulta en una sobreactivación de los sistemas GABAérgicos en CA1, lo cual aumenta la inhibición intrínseca en el hipocampo aboliendo el ritmo theta inducido por carbacol, mediante la reducción del nivel de inhibición global en el hipocampo con bicuculina,. De igual manera, incrementando el nivel de inhibición en el hipocampo, con el uso de muscimol, se abate la generación del ritmo theta (Smythe, Colom y Bland, 1992). Un año antes, Heynen y Bilkey corroboraron el papel de la transmisión GABAérgica con otro antagonista de los receptores GABA-

A, la picrotoxina, En su estudio, la combinación de carbacol y picrotoxina aplicados secuencialmente fue capaz de generar oscilaciones en theta. Por el contrario, la aplicación únicamente del antagonista GABAérgico resulta en la abolición del ritmo inducido por la aplicación de carbacol (Heyen y Bilkey, 1991) Esto demuestra la importancia del balance entre las entradas excitatorias y la modulación inhibitoria en el circuito hipocampal para la generación de ritmos específicos. Posteriormente en 1997, Konopacki y colaboradores demostraron que la inhibición simultánea de los receptores GABA-A y GABA-B resulta en la inducción de oscilaciones “*theta-like*” *in vitro*. Esta respuesta fue antagonizada utilizando muscimol y baclofeno (agonistas de los receptores GABA-A y GABA-B respectivamente). Todos estos resultados indican que un exceso de la inhibición resulta en un abatimiento de los procesos oscilatorios intrínsecos del circuito hipocampal (Konopacki, *et al*, 1997). Estos trabajos pioneros demuestran que tanto un incremento, como un decremento de la actividad inhibitoria genera una alteración de las dinámicas intrínsecas de los elementos neuronales hipocampales resultando finalmente en la abolición de la capacidad oscilatoria del circuito.

Con la finalidad de analizar las dinámicas del circuito que resultan en la generación de actividad rítmica y coordinada dependiente de la actividad de las interneuronas (Freund, 2003, Jones y Wilson 2005 y Sohal, *et al*, 2009), utilizamos como estrategia la activación de las interneuronas. para ello, usamos a la optogenética, técnica que nos permitió analizar la respuesta del circuito hipocampal provocadas por estimulación de poblaciones de interneuronas en escalas de tiempo de importancia fisiológica. La comparación de la estrategia farmacológica y la optogenética es factible debido que la mayoría de las interneuronas ErbB4 positivas son positivas para la glutamato Descarboxilasa (GAD, por sus siglas en inglés). El 90% de las interneuronas ErbB4 positivas caracterizadas electrofisiológicamente en el estudio de Neddens y colaboradores en 2010 resultaron ser positivas para GAD (Yau, *et al*, 2003, Vullhorst, *et al*, 2009, Chen, Zhang y Yin, 2010, Neddens y Buonanno, 2010, Wen, *et al*, 2010, Neddens, *et al*, 2011 y Janssen, Leiva-Salcedo y Buonanno, 2012), por lo que la activación

optogenética de interneuronas GAD positivas pudiera ofrecer resultados comparables con los obtenidos de la activación farmacológica.

Se eligió al canal iónico inespecífico ChR2 como elemento de control optogenético (Nagel, *et al*, 2003, Berthold, *et al*, 2008, Bamann, *et al*, 2009, Sugiyama, *et al*, 2009, Wang, *et al*, 2009, Lin, 2010, Kato, *et al*, 2012 y Lórenz-Fonfría, *et al*, 2013), ya que se ha mostrado que la ChR2 tiene una capacidad de inducir respuestas fieles en interneuronas bajo distintas circunstancias experimentales (Banghart, *et al*, 2004, Boyden, *et al*, 2005, Zhang, *et al*, 2006, Cardín, *et al*, 2009, Witten, *et al*, 2010, Zao, *et al*, 2011, Urban, *et al*, 2011, Kocabas, *et al*, 2012 y Tsubota, *et al*, 2012). La especificidad celular se produjo con el uso de un sistema de expresión viral ligado a la actividad de la Cre-Recombinasa en ratones transgénicos en los cuales esta enzima se encuentra bajo el control del promotor específico de interneuronas GAD-65 (Potter, *et al*, 2009). Es importante mencionar que la identidad de las interneuronas activadas no puede conocerse con certeza, ya que nuestro sistema de expresión sólo nos asegura que serán positivas para el marcador molecular GAD-65 (Kawaguchi, *et al*, 1987, Sloviter, 1989, Gulyás, *et al*, 1991, Seress, 1993, Aika, *et al*, 1994, Celio, 1996, Lawrence, *et al*, 2010, Lee, *et al*, 2011, Packer y Yuste, 2011, Moore y Wehr, 2013 y Courtin, *et al*, 2014).

Encontramos que es posible inducir una respuesta neuronal al aplicar trenes de luz de diversas frecuencias (5, 10, 20, 30 y 50 Hz) y que esta respuesta no es dependiente de la longitud de los trenes dados (10 y 20 ms). Contrario a nuestras expectativas, la respuesta en el potencial de campo mostró una clara tendencia a aumentar de amplitud y la generación de espigas posteriores a la estimulación. Durante la estimulación, el aumento de la potencia fue superior al 250% en comparación con la actividad control. Durante los intervalos interestimulación también se encontró un aumento de la potencia mayor al 200% en comparación con la actividad control. Este aumento es debido muy probablemente al reclutamiento de poblaciones interneuronales que disparan, fielmente, y en coherencia con los trenes de luz proporcionados (Stark, *et al*, 2013).

Se ha mencionado ya, que una gran variedad de subtipos de interneuronas se encuentran disponibles para modular de los ritmos oscilatorios. Registros en la corteza cerebral han demostrado que las interneuronas PV ejercen una inhibición corta y uniforme sobre sus blancos, mientras que las interneuronas SOM tienen efectos más variables y más largos (Kvitsiani, *et al*, 2013). Sin embargo las contribuciones específicas de cada uno de estos subtipos aún no son claras. Nuestro entendimiento de las funciones de las redes neuronales se ve, entonces, altamente beneficiado con estudios como el presentado en esta tesis, en el cual podemos analizar la actividad de subtipos interneuronales específicos y los efectos de su perturbación de una manera sincrónica, en ventanas de tiempo de importancia fisiológica. Demostrando pues, que la optogenética nos ofrece oportunidades sin precedentes de estimular o silenciar neuronas en múltiples estructuras. Esta manipulación es extremadamente útil para estudiar el papel de las interneuronas en la organización de ensambles y la modulación de su actividad.

Los resultados de esta tesis, sugieren que utilizando la optogenética es posible modular la actividad sincrónica y organizada de los subtipos interneuronales que son responsivos a la estimulación con luz. Esto, en teoría, nos permitiría generar una respuesta tipo ritmos theta en la banda de frecuencia de los 4-10 Hz cuando se estimula optogenéticamente. Por el contrario la activación de las interneuronas con NRG1 o con estimulación optogenética de altas frecuencias favorecería la abolición de los ritmos hipocampales debido a un exceso de inhibición.

8.2 EL USO DE LA OPTOGENÉTICA COMO MÉTODO DE ACTIVACIÓN INTERNEURONAL RESULTA EN UNA ACTIVACIÓN DEL CIRCUÍTO HIPOCAMPAL.

Debido a que la generación de ritmos theta en la preparación de hipocampo completo se obtiene únicamente en animales menores a las 3 semanas de edad (Goutagny, Jackson y Williams, 2009), restringimos los experimentos al día 21 post natal. Dado que el GABA a esta edad produce respuestas GABAérgicas despolarizantes (Alger y Nicoll, 1979, Banke y McBain, 2006, Howard, Burger y Rubel, 2007, Khirug, *et al*, 2008, Romo, *et al*, 2008, Tyzio, *et al*, 2008 y Sauer, Strüber y Bartos, 2012), inicialmente pensamos que la estimulación optogenética de interneuronas GABAérgicas provocaría un aumento en la actividad hipocampal. Así, realizamos una batería de experimentos utilizando el agonista GABAérgico muscimol (Naik, Guidotti y Costa, 1976, Beaumont, *et al*, 1978, Snodgrass, 1978 Brioni *et al*, 1990 y Edeline, *et al*, 2002), el cual fue aplicado a la solución de perfusión durante el registro de la actividad de animales de 21 días postnatales para demostrar que el efecto de GABA en estas condiciones es lo suficientemente hiperpolarizante para inducir una disminución significativa de la actividad de campo. (Fig. 7.3.11). De esta forma, estos experimentos descartan la posibilidad de que el aumento en la actividad de campo durante la activación optogenética se deba a un efecto excitatorio de GABA liberado por las interneuronas responsivas a la estimulación.

Asimismo, los resultados de estos experimentos con muscimol sugieren que la activación optogenética con luz en la longitud de onda azul del espectro visible, induce, efectivamente, una respuesta de activación del sistema durante la estimulación a distintas frecuencias (5, 10, 20, 30 y 50 Hz) que alcanza el 265% de la potencia en comparación con la actividad control. (Fig. 7.3.8) Esta activación depende de la transmisión sináptica GABAérgica ya que cuando se coloca el antagonista GABAérgico bicuculina (Ueno, *et al*, 1997), el efecto de la activación optogenética no presenta diferencias significativas con la potencia de la actividad control a ninguna de las frecuencias (Fig. 7.3.9).

8.3 LA RESPUESTA DEL CIRCUÍTO HIPOCAMPAL DEPENDE DE LAS FRECUENCIAS DE ESTIMULACIÓN OPTOGENÉTICA

En nuestro trabajo encontramos que son las estimulaciones en frecuencias bajas (5 y 10Hz) las que provocan una respuesta mayor en la potencia del hipocampo y que bajo estas frecuencias es posible inducir un estado de activación de la red en la banda theta (Fig. 7.3.9 y 7.3.10) que es la única banda de frecuencias que es modulada durante la estimulación optogenética de interneuronas GABAérgicas (Stark, *et al*, 2013). Estos fenómenos podrían ser explicados por dos mecanismos, el primero es que las interneuronas, aun cuando se han reportado capaces de seguir frecuencias altas -e inducir oscilaciones en la banda gamma- en experimentos de estimulación eléctrica clásicos (Whittington, *et al*, 1995, Traub, *et al*, 1996, Traub, Jefferys y Whittington, 1997 y Whittington, *et al*, 2000) son incapaces de seguir las frecuencias altas utilizando la activación optogenética. Esto debido a las cinéticas intrínsecas de la Channelrhodopsina-2, su fotociclo y su efecto sobre las propiedades de membrana de las interneuronas que la expresan (Nagel, *et al*, 2002, Radu, *et al*, 2009, Sugiyama, *et al*, 2009, Wang, *et al*, 2009, Nagel, *et al*, 2003, Bamman, *et al*, 2009, Lin, 2010, Nack, *et al*, 2010, Verhoefen, *et al*, 2010, Kato, *et al*, 2012 y Lórenz-Fonfría, *et al*, 2013). Si este fuera el caso las interneuronas GABAérgicas no se reclutarían eficientemente a frecuencias altas y no se modularía la actividad de las neuronas piramidales que son mucho más numerosas (Gulyás, *et al*, 1999). El segundo mecanismo implicaría que las células piramidales, debido a sus propiedades intrínsecas son incapaces de seguir la modulación impuesta por las interneuronas – que sí son activadas- a frecuencias altas (Fox, 1989, Kamondi, *et al*, 1997, Harris, *et al*, 2002 y Hu, Vervaeke y Storm, 2002).

El primer mecanismo se descarta debido a resultados como los publicados por el grupo de Jessica Cardín, que indican que se puede inducir actividad de las interneuronas que expresan ChR2 a frecuencias que se encuentran en la banda gamma. Sin embargo, aun cuando las poblaciones definidas como FS y las RS (*Regular Spiking*) muestran una respuesta confiable a los pulsos de luz a frecuencias bajas, las interneuronas de disparo regular (que corresponden a las

células piramidales) pierden la capacidad de seguir fielmente los pulsos a altas frecuencias (Cardín, *et al*, 2009).

Por otro lado, la activación exclusiva de las interneuronas FS en las frecuencias altas (40 Hz) resultó en un aumento en la banda de frecuencia de 35-40 Hz sugiriendo que la activación de las interneuronas FS es suficiente y específica para la inducción de las oscilaciones gamma. De esto podemos concluir que no es la incapacidad de las interneuronas transfectadas con ChR2 de seguir fielmente los pulsos de luz a altas frecuencias, sino que se requiere de una combinación de los subtipos interneuronales, activados cada uno a su frecuencia preferencial, para llevar al sistema a responder de una manera dual (theta vs gamma). Por ello, si en nuestros experimentos se están activando varios de los subtipos de interneuronas GAD positivas, ¿Cómo es que no observamos aumento en el potencial de campo local a altas frecuencias?

La respuesta la encontramos buscando la viabilidad del segundo mecanismo propuesto, en el cual las propiedades intrínsecas de las neuronas piramidales las limita a ser responsivas ante las estimulaciones a altas frecuencias. Es importante hacer hincapié en los estudios que desde 1997 demostraron que la resonancia subumbral en la banda theta en las neuronas piramidales es mediada por los canales HCN (por las siglas en inglés de *hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-sensitive*), que generan una corriente catiónica no selectiva llamada I_h (Gasparini y DiFrancesco, 1997 y Robinson y Siegelbaum, 2003). Los canales HCN1 son especialmente abundantes en las dendritas apicales distales de las células piramidales de CA1 y les permiten resonar exclusivamente en frecuencias de la banda theta (Stuart y Sprutson, 1998, Santoro, *et al*, 2000 y Ulrich, 2002). Por ello, que el circuito hipocampal sea incapaz de seguir las oscilaciones a altas frecuencias impuestas por las interneuronas activadas a estas frecuencias parece factible. Esta opción fue corroborada por el grupo de Stark en 2013, cuando transfectaron neuronas piramidales e interneuronas positivas a parvalbumina con ChR2 para analizar los efectos de la activación de ambos grupos celulares sobre sus blancos postsinápticos *in vivo*. En este estudio encontraron que la

estimulación selectiva de las neuronas piramidales con un patrón de frecuencias crecientes (0-40Hz) induce disparos a lo largo de esta banda de frecuencias con probabilidades similares en las neuronas piramidales, mostrando que estas células son capaces por sí mismas de generar disparos en un rango muy amplio de frecuencias. En este sentido, los blancos postsinápticos de estas neuronas activadas, respondieron con alta fidelidad a los potenciales excitatorios recibidos. Sin embargo, cuando se activaron las interneuronas positivas a parvalbumina a las mismas frecuencias (0-40Hz), se indujeron disparos de las neuronas piramidales limitados en la frecuencia correspondiente a la banda theta (la coherencia entre el estímulo luminoso y los disparos inducidos se encuentra en la banda theta) (Stark, *et al*, 2013) muy similar a los resultados obtenidos en nuestro estudio. Estos resultados se justifican por dos hipótesis. La primera y más evidente es que a altas frecuencias, la alta densidad de potenciales inhibitorios emitidos por las interneuronas puede suprimir tónicamente sus blancos, mientras que a bajas frecuencias las neuronas piramidales aún pueden disparar en ventanas temporales largas (i.e. bajas frecuencias). Esto, gracias a que, la actividad inhibitoria de las interneuronas activadas crea un efecto que atenúa los disparos de alta frecuencia, el cual es compatible con las propiedades de filtro de frecuencia de las sinapsis inhibitorias (Deans, *et al*, 2001, Thompson, *et al*, 2002 y Markram, *et al*, 2004). Una posibilidad adicional reside propiamente en las propiedades activas de las células piramidales (Fiala y Harris, 1999 y Hu, Vervaeke y Storm, 2002) que les permite generar un “rebote” de disparos como respuesta de recuperación de la inhibición cuando esta se presenta a bajas frecuencias (Jahnsen y Llinás, 1983 y Cobb, *et al*, 1995), lo cual también contribuye a la generación de un efecto de atenuación de los disparos de alta frecuencia. Estas hipótesis son muy probables y se corresponden con los resultados encontrados por el grupo de Stark (2013). Con base en lo anterior, proponemos que nuestros resultados son consistentes con una inhibición casi total de las neuronas piramidales a altas frecuencias de estimulación optogenética. Es así que, como resultado de una entrada inhibitoria muy alta y que nuestras observaciones de la generación de espigas de actividad poblacional en los

intervalos de tiempo posteriores a las estimulaciones a altas frecuencias sugieren un efecto de “rebote” por parte circuito hipocampal después de una entrada inhibitoria masiva.

En esta tesis se demostró pues, que ante una estimulación periódica, las unidades neuronales muestran una respuesta confiable (Mainen y Sejnowski, 1995, Mainen, *et al*, 1995, Volgushev, Chistiakova y Singer, 1998, Schreiber, *et al*, 2003 y Galán, Ermentrout y Urban, 2007), que dependerá enteramente de la frecuencia a la cual se realice el estímulo y resultará finalmente en una respuesta específica del circuito hipocampal (Cardín, *et al*, 2009, Dilgen, *et al*, 2012, Häggliind, *et al*, 2013, Peng, *et al*, 2013, Stark, *et al*, 2013 y Berglin, *et al*, 2014). Además, nuestros resultados sugieren que la inhibición “periódica” a bajas frecuencias es crítica para la resonancia en theta. Ésto podría en parte corroborar los resultados sobre la pérdida de la oscilación theta durante la aplicación de neuregulina y su posterior recuperación al quitar el fármaco. Como ya se ha comentado ampliamente en este trabajo, la activación generalizada de las interneuronas responsivas a neuregulina (i.e. aquellas con el receptor ErbB4) resulta en la abolición del ritmo theta. La activación “tónica” de las interneuronas incapacita al circuito hipocampal para engancharse en una oscilación resonante, ya que la actividad periódica, sincrónica y temporalmente regulada de las interneuronas es sustancial para la generación de oscilaciones hipocampales. (Fox, 1989, Kubie, Muller y Bostock, 1990, Wang y Buzsáki, 1996, Traub, Jeffreys y Whittington, 1997, Chapman y Lacaille, 1999, Tukker, 2007, Fisahn, *et al*, 2009, Sohal, *et al*, 2009, Benchenane, *et al*, 2010 y Stark, *et al*, 2013).

8.4 LA GENERACIÓN DE RITMOS HIPOCAMPALES DEPENDE DE LA MODULACIÓN INHIBITORIA Y LAS DINÁMICAS NEURONALES SUBSECUENTES.

Es importante mencionar que, aun cuando nuestros resultados confirman la importancia de la regulación interneuronal en la generación de ritmos, todos estos experimentos fueron llevados a cabo *in vitro*. Si bien, nuestras condiciones intentan asemejarse lo más posible al sistema completo, existen diferencias sustanciales que requieren ser tomadas en cuenta. Por ejemplo, la presencia de mayor actividad sináptica en experimentos registrados *in vivo* modifica las propiedades de membrana de las células piramidales y con esto su capacidad de respuesta ante los estímulos inhibitorios inducidos (Fellous, *et al*, 2003 y Brette, *et al*, 2007). La resistencia de la membrana de las neuronas piramidales *in vitro* es más alta que en animales despiertos debido a la alta actividad sináptica (Fellous, *et al*, 2003, El Boustani, *et al*, 2006 y Brette, *et al*, 2007). Debido a esto, y la ya mencionada regulación *feedback* dentro de las redes neuronales, decidimos analizar el efecto de la estimulación en condiciones en las cuales se bloqueó la transmisión sináptica. Para esto utilizamos los antagonistas de la transmisión glutamatérgica, AP5 y CNQX (Blake, Brown y Coolingridge, 1988, Neuman, *et al*, 1988 y Turski, *et al*, 1990) y de la transmisión GABAérgica, Bicuculina (Ueno, *et al*, 1997). Como era de esperarse, al bloquear la transmisión excitatoria, se encontró una reducción del potencial de campo local del 26.5% e interesantemente la respuesta hipocampal a la activación optogenética de las interneuronas también se redujo considerablemente (reducción del 48.8% en comparación con la actividad inducida en condiciones control). Si bien las interneuronas representan únicamente el 20% de la población neuronal total en el hipocampo. (Kawaguchi, *et al*, 1987, Aika, *et al*, 1994, Celio, 1996, Gulyás, *et al*, 1991, Lawrence, *et al*, 2010 y Neddens y Buonanno, 2010), sus patrones de conectividad pueden determinar una inhibición sostenida o una inhibición corta que genere patrones de reclutamiento de células piramidales, (Sloviter, 1989, Seress, 1993 y Packer y Yuste, 2011). Por estas razones, el encontrar que la activación optogenética en un circuito “inactivado”, por el bloqueo de la transmisión glutamatérgica, no es capaz

de inducir una respuesta significativa resulta lógico. Más aún la inhibición de la transmisión glutamatérgica afectaría la contribución piramidal en la resonancia del circuito (Hu, Vervaeke y Storm, 2002, Ulrich, 2002 y Stark, *et al*, 2013) en la excitabilidad general del circuito (Fox, 1989, Baude, *et al*, 1993, Volgushev, Chistiakova y Singer, 1998 y Hille, 2001) y en las dinámicas establecidas por las conexiones entre las neuronas piramidales (Häusser, Spruston y Stuart, 2000, Harris, *et al*, 2002, Giocomo y Hasselmo, 2007 y Klausberger y Somogyi, 2008). Todos los factores descritos son fundamentales para la modulación en la banda theta (Stark, *et al*, 2013). Aun cuando muchos mecanismos parecen ser responsables de la resonancia hipocampal en la banda theta, nuestros experimentos sugieren que en gran parte este efecto es mediado ampliamente por la transmisión sináptica inhibitoria periódica por parte de los elementos interneuronales disparando sincrónicamente, siempre y cuando las sinapsis excitatorias no se encuentren alteradas.

8.4 POSIBLES IMPLICACIONES FISIOLÓGICAS DE LA GENERACIÓN DE RITMOS MEDIANTE TÉCNICAS OPTOGENÉTICAS

Es interesante que logramos generar actividad “*theta-like*” en rebanadas con actividad neuronal desorganizada y que encontramos un aumento en la potencia de las oscilaciones theta durante la estimulación optogenética a bajas frecuencias. Este resultado nos sugiere que el circuito hipocampal -el cual posee una conformación intrínseca que le permite la generación del ritmo theta durante varios procesos cognitivos complejos (Buzsáki, *et al*, 1994, Börgers, Epstein y Koppell, 2005, Jones y Wilson, 2005, Hunsaker, Lee y Kesner, 2008, Sohal, *et al*, 2009, Dougherty, *et al*, 2013 y Hägglund, *et al*, 2013)- puede ser modulado con manipulaciones experimentales. Se propone que la salida rítmica en la banda theta del hipocampo/corteza entorhinal puede generar excitación *feed-forward* de las interneuronas FS y otros subtipos interneuronales, (Steward y Scoville, 1976, Mainen y Sejnowski, 1995, Stuart y Spruston, 1998, Hasenstaub, *et al*, 2005, Hasselmo, 2005 y Olah, *et al*, 2009) cuyos efectos inhibitorios son amplificados por las propiedades de disparo de las neuronas piramidales de la capa 5 (Kubie, Muller y Bostock, 1990, Sah, Hestrini y Nicill, 1990, Bland y Colom, 1993 y Staff, *et*

al, 2000). Estos mecanismos de amplificación de señales mediados por las interneuronas pueden alinear temporalmente una gran cantidad de ensamblajes corticales implicando muy pocos enlaces axonales (Mainen, *et al*, 1995, Markram, *et al*, 2004, Börgers, Epstein y Kopell, 2005, Hasenstaub, *et al*, 2005, Cenzurca y Swanson, 2006 y El Boustani, *et al*, 2006) y esta resonancia en la neocorteza se utiliza posteriormente para amplificar otros patrones que se sobrelapan en frecuencia con la banda theta como las oscilaciones alfa (Kilmesch, *et al*, 2007) y los husos de sueño (Steriade, *et al*, 1993). Por lo cual, y dado que se ha reportado ya que el poder de las oscilaciones aumenta durante la generación de estas conductas (Whittington, *et al*, 1997, Volgushev, Chistiakova y Singer, 1998 y Thomson, *et al*, 2002), nuestros resultados son consistentes con la idea de que el circuito hipocampal es preferencialmente resonante en ritmo theta, lo que resultaría en la sincronización de estructuras corticales superiores. (El Boustani, *et al*, 2006, Sohal, *et al*, 2009, Rossi, *et al*, 2012 y Wang y Carlén, 2012). En nuestros experimentos *in vitro* las interneuronas activadas por luz, siguen formando parte de un circuito complejo que se encuentra bajo el control de los mecanismos nativos de la red. Por esta razón, podemos observar la generación de ritmos espontáneos en una estructura que ha sido extraída y manipulada experimentalmente. Esto nos permite hacer inferencias sobre la importancia de las interneuronas en distintas condiciones experimentales como lo son el bloqueo de la transmisión sináptica tanto excitatoria como inhibitoria.

Entonces, nuestros resultados sugieren que el procesamiento en las redes neurales se basa en las interacciones dinámicas entre los tipos celulares excitatorios e inhibitorios que forman parte del circuito hipocampal (Alger y Nicoll, 1979, Buhl, Halasy y Somogyi, 1994, Buckmaster y Schwartzkroin, 1995, Gulyás, *et al*, 1999, Deans, *et al*, 2001, Freund, 2003, Markram, *et al*, 2004, Hasenstaub, *et al*, 2005, Hefft y Jonas, 2005 y Lodato, *et al*, 2011). Nuestros resultados sugieren que las interneuronas inhibitorias también aseguran la autonomía transitoria de las neuronas piramidales, mediante la congregación y segregación de ensamblajes neuronales (Buzsáki y Chrobak, 1995 y Csicsvari, *et al*, 1998).

Aun cuando los modelos computacionales indican que la actividad sincrónica de las interneuronas es suficiente para inducir oscilaciones que son estabilizadas y reguladas por una retroalimentación excitatoria de las neuronas piramidales (Traub, Jeffreys y Whittington, 1997, Whittington, *et al*, 1997 y Borgers y Epstein y Kopell, 2005), no se debe perder de vista que en una red activa, cada neurona recibe un bombardeo continuo de entradas sinápticas tanto excitatorias como inhibitorias que resulta en transiciones de estado en estos elementos neuronales (Miles, *et al*, 1996, Gulyás, *et al*, 1999, Giocomo y Hasselmo, 2007, Bell,*et al*, 2011, Lodato, *et al*, 2011, Verret, *et al*, 2012, Pfeffer, *et al*, 2013 y Stark, *et al*, 2013). De la misma manera, cada neurona contribuye con un potencial de salida a la red local que la rodea, por lo que este intercambio recíproco y continuo representa un reto aún mayor al tratar de determinar el papel de clases específicas de neuronas que contribuyen al procesamiento de la información y la generación de patrones oscilatorios de actividad. Así pues, un enfoque integrativo utilizando métodos optogenéticos y electrofisiológicos provee dos ventajas mayores para la exploración de las dinámicas de las redes, la primera es la confiabilidad y precisión de los disparos evocados fóticamente que, en combinación con la expresión célula específica de la ChR2, ofrece un método confiable para la identificación de los elementos neuronales que participan en las dinámicas oscilatorias y su participación en la generación de las mismas. La segunda ventaja, es la habilidad de manipular directamente el nivel de actividad de una clase específica de célula con el propósito de observar la actividad o comportamiento de la red, con el simple hecho de variar la intensidad de la estimulación.

Nuestros resultados confirman pues, la utilidad de la optogenética en el estudio del papel de los distintos tipos neuronales en la generación de oscilaciones en el hipocampo y sus posibles implicaciones fisiológicas en la generación de conductas y procesos cognitivos complejos.

9. CONCLUSIONES

La aplicación aguda de la NRG1 reduce la actividad hipocampal de manera generalizada.

La estimulación de neuronas GABAérgicas del hipocampo mediante optogenética resultó en un aumento en la potencia de la actividad espontánea de campo local.

El efecto de la estimulación optogenética en la generación de ritmos theta mostró una tendencia al aumento de la actividad durante las estimulaciones.

Los resultados del presente proyecto demuestran que la técnica “optogenética” representa una herramienta altamente específica y funcional que nos permite analizar las dinámicas complejas que permiten la generación de ritmos y el papel de las interneuronas en esta estructura. Se muestra además que la técnica farmacológica de activación altamente específica de interneuronas utilizando Neuregulina presenta limitaciones claras para el análisis de relaciones complejas en el circuito hipocampal debido a la lentitud del efecto farmacológico resultado de las cinéticas del fármaco, las cascadas de activación desencadenadas y, sustancialmente, a que la activación interneuronal producida por la neuregulina es “sostenida”.

10. BIBLIOGRAFÍA

Abegg, M.H., Savic, N., Ehrenguber, M.U., McKinney, R.A. & Gahwiler, B.H. 2004. Epileptiform activity in rat hippocampus strengthens excitatory synapses. *J. Physiol.* 554, 439–448.

Acsády, L., Görcs, T.J. & Freund, T.F. 1996. Different populations of vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive interneurons are specialized to control pyramidal cells or interneurons in the hippocampus. *Neuroscience* 73, 317-334.

Adamantidis, A., Zhang, F., Aravanis, A., Deisseroth, K. & de Lecea, L. 2007. Neural substrates of awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons. *Nature* 450, 420–424.

Aika, Y., Ren, J.Q., Kosaka, K. & Kosaka, T. 1994. Quantitative analysis of GABA-like immunoreactivity and parvalbumin containing neurons in the CA1 region of the rat hippocampus using a stereological method, the disector. *Exp Brain Res* 99, 267-276.

Alger, B. & Nicoll, R. 1979. GABA-mediated biphasic inhibitory responses in hippocampus. *Nature* 281, 315–317.

Amaral, D.G. 1978. A Golgi study of the cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat. *J. comp. Neurol* 182, 851-914.

Amaral, D.G. 1993. Emerging principles of intrinsic hippocampal organization. *Current Opinion in Neurobiology* 3, 225-229.

Amaral, D.G., Dolorfo, C. & Alvarez-Royo, P. 1991. Organization of CA1 Projections to the Subiculum: a PHA-L Analysis in the Rat. *Hippocampus* 1, 415-436.

Amaral, D.G. & Witter, M. 1989. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* 31, 571–591.

Andersen, P., Bliss, T., Lomo, T., Olsen, L. & Skrede, K. 1968. Lamellar organization of hippocampal excitatory pathways. *Acta physiologica Scandinavica* 76, 4A–5A.

Bains, J.S., Longacher, J.M. & Staley, K.J. 1999. Reciprocal interactions between CA3 network activity and strength of recurrent collateral synapses. *Nat. Neurosci.* 2, 720–726.

Banghart, M., Borges, K., Isacoff, E., Trauner, D. & Kramer, R. 2004. Light-activated ion channels for remote control of neuronal firing. *Nat. Neurosci.* 7, 1381–1386.

Banke, T. & McBain, C. 2006. GABAergic input onto CA3 hippocampal interneurons remains shunting throughout development. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26, 11720–11725.

Bamann, C., Gueta, R., Kleinlogel, S., Nagel, G. & Bamberg, E. 2009. Structural guidance of the photocycle of channelrhodopsin-2 by an interhelical hydrogen bond. *Biochemistry*, 49, 267–278.

Bardy, C., Alonso, M., Bouthour, W. & Lledo, P.-M. 2010. How, when, and where new inhibitory neurons release neurotransmitters in the adult olfactory bulb. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30, 17023–17034.

Baude, A., Nuesser, Z., Roberts, J.D.V., Mulvihill, E., McIlhinney, R.A.J. & Somogyi, P. 1993. The metabotropic glutamate receptor (mGluR1a) is concentrated at perisynaptic membrane of neuronal subpopulations as detected by immunogold reaction. *Neuron* 11, 771-787.

Beaumont, K., Chilton, W., Yamamura, H. & Enna, S. 1978. Muscimol binding in rat brain: association with synaptic GABA receptors. *Brain Research* 148, 153-162.

Beckstein, O., Biggin, P. C., Bond, P., Bright, J. N., Domene, C. & Grottesi, A. 2003. Ion channel gating: insights via molecular simulations. *FEBS Lett.* 555, 85–90.

Béjà, O., Spudich, E.N., Spudich, J.L., Leclerc, M., & DeLong, E.F. 2001. Proteorhodopsin phototrophy in the ocean. *Nature* 411, 786–789.

Bell, K., Shim, H., Chen, C.-K. & McQuiston, A. 2011. Nicotinic excitatory postsynaptic potentials in hippocampal CA1 interneurons are predominantly mediated by nicotinic receptors that contain $\alpha 4$ and $\beta 2$ subunits. *Neuropharmacology* 61, 1379–88.

Ben-Ari, Y. & Gho, M., 1988. Long-lasting modification of the synaptic properties of rat CA3 hippocampal neurones induced by kainic acid. *J. Physiol.* 404, 365–384.

Benchenane, K., Peyrache, A., Khamassi, M., Tierney, P., Gioanni, Y., Battaglia, F. & Wiener, S. 2010. Coherent theta oscillations and reorganization of spike timing in the hippocampal- prefrontal network upon learning. *Neuron* 66, 921–936.

Berglind, F., Ledria, M., Sørensen, A., Nikitidou, L., Melisa, M., Bielefeldt, P., Kirikb, D., Deisseroth, K., Andersson, M. & Kokaia, M. 2014. Optogenetic inhibition of chemically induced hypersynchronized bursting in mice. *Neurobiology of disease* 65, 133-141.

Bernstein, H.G., Lendeckel, U., Bertram, I., Bukowska, A., Kanakis, D. & Dobrowolny, H. 2006. Localization of neuregulin-1alpha (heregulin alpha) and one of its receptors, ErbB-4 tyrosine kinase, in developing and adult human brain. *Brain Res Bull* 69, 546–559.

Berthold, P., Tsunoda, S. P., Ernst, O. P., Mages, W., Gradmann, D. & Hegemann, P. 2008. Channelrhodopsin-1 initiates phototaxis and photophobic responses in *Chlamydomonas* by immediate light-induced depolarization. *Plant Cell* 20, 1665–1677.

Bieszke, J.A., Braun, E.L., Bean, L.E., Kang, S., Natvig, D.O., & Borkovich, K.A. 1999. The *nop-1* gene of *Neurospora crassa* encodes a seven transmembrane helix retinal-binding protein homologous to archaeal rhodopsins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 8034–8039.

Bjarnadottir, M., Misner, D.L., Haverfield-Gross, S., Bruun, S., Helgason, V.G., Stefansson, H., Sigmundsson, A., Firth, D.R., Nielsen, B., Stefansdottir, R., Novak, T.J., Stefansson, K., Gurney, M.E. & Andresson, T. 2007. Neuregulin1 (NRG1) signaling through Fyn modulates NMDA receptor phosphorylation: differential synaptic function in NRG1 knock-outs compared with wild-type mice. *J Neurosci* 27, 4519–4529.

Blackstad, T. W. 1956. Commissural connections of the hippocampal region in the rat, with special reference to their mode of termination. *J. Comp. Neural.* 105, 417–537.

Blake, J., Brown, M. & Collingridge, G. 1988. CNQX blocks acidic amino acid induced depolarizations and synaptic components mediated by non-NMDA receptors in rat hippocampal slices. *Neuroscience letters* 89, 182–186.

Bland, B.H. & Colom, L.V. 1993. Extrinsic and intrinsic properties underlying oscillation and synchrony in limbic cortex, *Prog. Neurobiol.* 41, 157–208.

Bogomolni, R.A., & Spudich, J.L. 1982. Identification of a third rhodopsin- like pigment in phototactic *Halobacterium halobium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 6250–6254.

Boyden, E., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G. & Deisseroth, K. 2005. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat. Neurosci.* 8, 1263–1268.

Börgers, C., Epstein, S. & Kopell, N. 2005. Background gamma rhythmicity and attention in cortical local circuits: a computational study. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 7002–7007.

Braak, H. 1974. On the structure of the human archicortex. I. The cornu ammonis. A Golgi and pigmentarchitectonic study. *Cell Tissue Res* 152, 349-383.

Braak, H. 1983. Transparent Golgi impregnations: a way to examine both details of cellular processes and components of the cell body. *Stain Technol* 58, 91-95.

Braitenberg, V. & Schiiz, A. 1983. Some anatomical comments on the hippocampus. *Academic press, New York*, 21-37.

Brette, R., Rudolph, M., Carnevale, T., Hines, M., Beeman, D., Bower, J. M., Diesmann, M., Morrison, A., Goodman, P. H., Harris, F. C., Zirpe, M., Natschläger, T., Pecevski, D., Ermentrout, B., Djurfeldt, M., Lansner, A., Rochel, O., Vieville, T., Muller, E., Davison, A., El Boustani, S., & Destexhe, A. 2007. Simulation of

networks of spiking neurons: a review of tools and strategies. *Journal of computational neuroscience* 23, 349–98.

Brioni, J., Decker, M., Gamboa, L. & Izquierdo, I. 1990. Muscimol injections in the medial septum impair spatial learning. *Brain Research* 522, 227–234.

Brunn, V., Otnaess, M., Molden, S., Steffenach, H., Witter, M., Moser, M. & Moser, E. 2002. Place cells and place recognition maintained by direct entorhinal-hippocampal circuitry. *Science* 296, 2243-2246.

Buckmaster, P.S. & Schwartzkroin, P.A. 1995. Interneurons and inhibition in the dentate gyrus of the rat *in vivo*. *J Neurosci* 15, 774-789.

Buhl, E., Halasy, K. & Somogyi, P. 1994. Hippocampal unitary inhibitory postsynaptic potentials: diverse sources and number of synaptic release sites. *Nature* 371, 823-828.

Bullock, T., Buzsáki, G. & McClune, M. 1989. Coherence of compound field potentials reveals discontinuities in the CA1-subiculum of the hippocampus in freely-moving rats. *Neuroscience* 38, 609–619.

Bundschuh, S., Zhu, P., Schärer, Y.P. Z. & Friedrich, R. 2012. Dopaminergic modulation of mitral cells and odor responses in the zebrafish olfactory bulb. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32, 6830–6840.

Buonanno, A. & Fischbach, G. 2001. Neuregulin and ErbB receptor signaling pathways in the nervous system. *Current opinion in neurobiology* 11, 287–296.

Buonanno, A. 2010. The neuregulin signaling pathway and schizophrenia: From genes to synapses and neural circuits. *Brain Res Bull* 83,122–131.

Burden, S. & Yarden, Y. 1997. Neuregulins and their receptors: a versatile signaling module in organogenesis and oncogenesis. *Neuron* 18, 847-855.

Buzsáki, G., Horvath, Z., Urioste, R., Hetke, J. & Wise, K. 1992. High-frequency network oscillation in the hippocampus. *Science* 256, 1025-1027.

Buzsáki, G., Bragin, A., Chrobak, J.J., Nádasdy, Z., Sik, A., Hsu, M. & Ylinen, A. 1994. Oscillatory and Intermittent Synchrony in the Hippocampus: Relevance to Memory Trace Formation. *Research and Perspectives in Neurosciences* 145-172.

Buzsáki, G. & Chrobak, J. 1995. Temporal structure in spatially organized neuronal ensembles: a role for interneuronal networks. *Current opinion in neurobiology* 5, 504–510.

Buzsáki, G. 2002. Theta Oscillations in the Hippocampus. *Neuron* 33, 325-340.

Cadena, D. & Gill, G. 1992. Receptor tyrosine kinases. *The FASEB Journal* 6, 2332-2337.

Carraway, K.L., Weber, J.L., Unger, M.J., Ledesma, J., Yu, N., Gassmann, M. & Lai, C. 1997. Neuregulin-2, a new ligand of ErbB3/ErbB4-receptor tyrosine kinases. *Nature* 387, 512-516.

Cardin, J., Carlén, M., Meletis, K., Knoblich, U., Zhang, F., Deisseroth, K., Tsai, L.-H. & Moore, C. 2009. Driving fast-spiking cells induces gamma rhythm and controls sensory responses. *Nature* 459, 663–667.

Casper, S. & Holt, C. 1995. Expression of the green fluorescent protein-encoding gene from a tobacco mosaic virus-based vector. *Gene* 173, 69–73.

Cassell, M. & Brown, M. 1977. Cell counts for the stratum pyramidale of the hippocampus of the rat. *Life sciences* 21, 1187–1191.

Celio, MR. 1996. Parvalbumin in most γ -aminobutyric acid-containing neurons of the rat cerebral cortex. *Science* 231, 995-997.

Cenquizca, L. & Swanson, L. 2006. Analysis of direct hippocampal cortical field CA1 axonal projections to diencephalon in the rat. *The Journal of comparative neurology* 497, 101–114.

Chang, H., Riese, D.J., Gilbert, W., Stern, D.F. & McMahan, U.J. 1997. Ligands for ErbB-family receptors encoded by a neuregulin-like gene. *Nature* 387, 509-512.

Chapman, C. & Lacaille, J. 1999. Intrinsic theta-frequency membrane potential oscillations in hippocampal CA1 interneurons of stratum lacunosum-moleculare. *Journal of neurophysiology* 81, 1296–1307.

Chen, M., Bermingham-McDonogh, O., Danehy, F., Nolan, C., Scherer, S., Lucas, J., Gwynne, D. & Marchionni, M. 1994. Expression of multiple neuregulin transcripts in postnatal rat brains. *The Journal of comparative neurology* 349, 389–400.

Chen, Y.J., Zhang, M. & Yin, D.M. 2010. ErbB4 in parvalbumin-positive interneurons is critical for neuregulin 1 regulation of long-term potentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 21818–21823.

Chow, B.Y., Han, X. & Dobry, A.S. 2010. High-performance genetically targetable optical neural silencing by light-driven proton pumps. *Nature* 463, 98-102.

Cobb, S., Buhl, E., Halasy, K., Paulsen, O. & Somogyi, P. 1995. Synchronization of neuronal activity in hippocampus by individual GABAergic interneurons. *Nature* 378, 75–78.

Corfas, G., Roy, K. & Buxbaum, J. 2004. Neuregulin 1-erbB signaling and the molecular/cellular basis of schizophrenia. *Nat. Neurosci.* 7, 575–580.

Courtin, J., Chaudun, F., Rozeske, R.R., Karalis, N., Gonzalez-Campo, C., Wurtz, H., Abdi, A., Baufreton, J., Bienvenu, T. & Herry, C. 2014. Prefrontal parvalbumin interneurons shape neuronal activity to drive fear expression. *Nature* 505, 92–96.

Creed, M., Ntamati, N. & Tan, K. 2013. VTA GABA neurons modulate specific learning behaviors through the control of dopamine and cholinergic systems. *Frontiers in behavioral neuroscience* 8, 8.

Csicsvari, J., Hirase, H., Czurkó, A., Mamiya, A. & Buzsáki, G. 1998. Oscillatory coupling of hippocampal pyramidal cells and interneurons in the behaving Rat. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19, 274–287.

Deans, M., Gibson, J., Sellitto, C., Connors, B. & Paul, D. 2001. Synchronous activity of inhibitory networks in neocortex requires electrical synapses containing connexin36. *Neuron* 31, 477–485.

Debanne, D., Thompson, S.M. & Gahwiler, B.H., 2006. A brief period of epileptiform activity strengthens excitatory synapses in the rat hippocampus in vitro. *Epilepsia* 47, 247–256.

Deisseroth, K. 2010. Optogenetics. *Nature methods* 8, 26–29.

Dembrow, N.C., Chitwood, R.A., & Johnston, D. 2010. Projection-specific neuromodulation of medial prefrontal cortex neurons. *J. Neurosci.* 30, 16922–16937.

Dilgen, J., Tompa, T., Saggi, S., Naselaris, T. & Lavin, A. 2012. Optogenetically evoked gamma oscillations are disturbed by cocaine administration. *Frontiers in cellular neuroscience* 7, 213-222.

Dougherty, K. Zagoraïou, L., Satoh, D., Rozani, I., Doobar, S., Arber, S., Jessell, T.M. & Kiehn, O. 2013. Locomotor rhythm generation linked to the output of spinal *shox2* excitatory interneurons. *Neuron* 80, 920–933.

Edeline, J.M., Hars, B., Hennevin, E. & Cotillon, N. 2002. Muscimol diffusion after intracerebral microinjections: a reevaluation based on electrophysiological and autoradiographic quantifications. *Neurobiology of learning and memory* 78, 100–124.

Eilam, R., Pinkas-Kramarski, R., Ratzkin, B., Segal, M. & Yarden, Y. 1998. Activity-dependent regulation of Neu differentiation factor/neuregulin expression in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 1888–1893.

El Boustani, S., Pospischil, M., Rudolph-Lilith, M. & Destexhe, A. 2006. Activated cortical states: experiments, analyses and models. *Journal of physiology* 101, 99–109.

Esper, R.M., Pankonin, M.S. & Loeb, J.A. 2006. Neuregulins: versatile growth and differentiation factors in nervous system development and human disease. *Brain Res. Rev.* 51, 161–175.

Essen, L.O. 2002. Halorhodopsin: light-driven ion pumping made simple? *Current opinion in structural biology* 12, 516–522.

Fellous, J., Rudolph, M., Destexhe, A. & Sejnowski, T.J. 2003. Synaptic background noise controls the input/output characteristics of single cells in an *in vitro* model of *in vivo* activity. *Neuroscience* 122, 811–829.

Fenko, L., Yizhar, O. & Deisseroth, K. 2010. The development and application of optogenetics. *Annual review of neuroscience* 34, 389–412.

Fiala, J.C. & Harris, K.M. 1999. Dendritic structures. In: Stuart, G., Sprutson, N. & Hausser, M. Eds *Dendrites*. New York, NY: Oxford University Press.

Fisahn A., Neddens J., Yan L. & Buonanno, A. 2009. Neuregulin-1 Modulates Hippocampal Gamma Oscillations: Implications for Schizophrenia. *Cerebral Cortex* 19, 612-618.

Földy, C., Lee, S.Y., Szabadics, J., Neu, A. & Soltesz, I. 2007. Cell type-specific gating of perisomatic inhibition by cholecystokinin. *Nat. Neurosci.* 10, 1128-1130.

Fox, S.E. 1989. Membrane potential and impedance changes in hippocampal pyramidal cells during theta rhythm. *Exp. Brain Res* 77, 283-294.

Fox, I. & Kornblum, H. 2005. Developmental profile of ErbB receptors in murine central nervous system: implications for functional interactions. *Journal of neuroscience research* 79, 584–597.

Freund, T.F. & Buzsáki, G. 1996. Interneurons of the Hippocampus. *Hippocampus* 6, 347-470.

Freund T.F. 2003. Interneuron Diversity series: Rhythm and mood in perisomatic inhibition. *Trends in Neurosci* 26, 489–495.

Fries, P., Neuenschwander, S., Engel, A., Goebel, R. & Singer, W. 2001. Rapid feature selective neuronal synchronization through correlated latency shifting. *Nat. Neurosci.* 4, 194–200.

Fuentealba, P., Begum, R., Capogna, M., Jinno, S., Márton, L.F., Csicsvari, J., Thomson, A., Somogyi, P. & Klausberger, T. 2008. Ivy cells: a population of nitric-oxide-producing, slow-spiking GABAergic neurons and their involvement in hippocampal network activity. *Neuron* 57, 917–929.

Fung, S.J., Webster, M.J., Sivagnanasundaram, S., Duncan, C., Elashoff, M. & Weickert, C.S. 2010. Expression of interneuron markers in the dorsolateral prefrontal cortex of the developing human and in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 167, 1479–1488.

Gaarskjaer, F. B. 1978. Organization of the mossy fiber system of the rat studied in extended hippocampi. I. Terminal area related to number of granule and pyramidal cells. *Brain* 101, 49-72.

Galán, R., Ermentrout, G. & Urban, N. 2007. Optimal time scale for spike-time reliability: theory, simulations, and experiments. *Journal of neurophysiology* 99, 277–283.

Gasparini, S. & DiFrancesco, D. 1997. Action of the hyperpolarization-activated current (I_h) blocker ZD 7288 in hippocampal CA1 neurons. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 435, 99–106.

Gerecke, K., Wyss, J., Karavanova, I., Buonanno, A. & Carroll, S. 2001. ErbB transmembrane tyrosine kinase receptors are differentially expressed throughout the adult rat central nervous system. *The Journal of comparative neurology* 433, 86–100.

Giocomo, L.M., & Hasselmo, M.E. 2007. Neuromodulation by glutamate and acetylcholine can change circuit dynamics by regulating the relative influence of afferent input and excitatory feedback. *Mol. Neurobiol* 36, 184–200

Goutagny, R., Jackson, J. & Williams, S. 2009. Self-generated theta oscillations in the hippocampus. *Nat. Neurosci.* 12, 1491–1493.

Gradinaru, V., Zhang, F., Ramakrishnan, C., Mattis, J., Prakash, R., Diester, I., Goshen, I., Thompson, K. & Deisseroth, K. 2010. Molecular and cellular approaches for diversifying and extending optogenetics. *Cell* 141, 154-165.

Graves, A., Moore, S., Bloss, E., Mensh, B., Kath, W. & Spruston, N. 2012. Hippocampal pyramidal neurons comprise two distinct cell types that are countermodulated by metabotropic receptors. *Neuron* 76, 776–789.

Gulyás, A., Megias, M., Emri, Z. & Freund, T.F. 1999. Total number and ratio of excitatory and inhibitory synapses converging onto single interneurons of different types in the CA1 area of the rat hippocampus. *J Neurosci* 19, 10082-10097.

Gulyás, A., Tóth, K., Danos, P. & Freund, T.F. 1991. Subpopulations of GABAergic neurons containing parvalbumin, calbindin D28k, and cholecystinin in the rat hippocampus. *J Comp Neurol* 321, 371-378.

Hägglund, M., Dougherty, K.J., Borgius, L., Itohara, S., Iwasato, T. & Kiehn, O. 2013. Optogenetic dissection reveals multiple rhythmogenic modules underlying locomotion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 11589–11594.

Hahn, C.G., Wang, H.Y., Cho, D.S., Talbot, K., Gur, R.E., Berrettini, W.H., Bakshi, K., Kamins, J., Borgmann-Winter, K.E., Siegel, S.J., Gallop, R.J. & Arnold, S.E.

2006. Altered neuregulin 1-ErbB4 signaling contributes to NMDA receptor hypofunction in schizophrenia. *Nat. Med* 12, 824–828.

Han, Z.S., Buhl, E.H., Lörinczi, Z. & Somogyi, P. 1993. A high degree of spatial selectivity in the axonal and dendritic domains of physiologically identified local-circuit neurons in the dentate gyrus of the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 5, 395-410.

Harari, D., Tzahar, E., Romano, J., Shelly, M., Pierce, J.H., Andrews, G.C. & Yarden, Y. 1999. Neuregulin-4: a novel growth factor that acts through the ErbB-4 receptor tyrosine kinase. *Oncogene* 18, 2681-2689.

Harris, K. D., Hirase, H., Leinekugel, X., Henze, D. A. & Buzsáki, G. 2001. Temporal interaction between single spikes and complex spike bursts in hippocampal pyramidal cells. *Neuron* 32, 141-149.

Harris, K.D., Henze, D.A., Hirase, H., Leinekugel, X., Dragoi, G., Czurkó, A. & Buzsáki, G. 2002. Spike train dynamics predicts theta-related phase precession in hippocampal pyramidal cells. *Nature* 417, 738-741.

Hasenstaub, A., Shu, Y., Haider, B., Kraushaar, U., Duque, A. & McCormick, D.A. 2005. Inhibitory postsynaptic potentials carry synchronized frequency information in active cortical networks. *Neuron* 47, 423–435.

Hasselmo, E. 2005. The role of hippocampal Regions CA3 and CA1 in matching Entorhinal Input With Retrieval of Associations Between Objects and Context: Theoretical Comment on Lee *et al.* *Behavioral Neuroscience* 119, 342-345.

Häusser, M., Spruston, N., & Stuart, G.J. 2000. Diversity and dynamics of dendritic signaling. *Science* 290, 739–744.

Hefft, S. & Jonas, P. 2005. Asynchronous GABA release generates long-lasting inhibition at a hippocampal interneuron-principal neuron synapse. *Nat. Neurosci.* 8, 1319–1328.

Higashiyama, S., Horikawa, M., Yamada, K., Ichino, N., Nakano, N., Nakagawa, T., Miyagawa, J., Matsushita, N., Nagatsu, T., Taniguchi, N. & Ishiguro, H. 1997. A novel brain-derived member of the epidermal growth factor family that interacts with ErbB3 and ErbB4. *J Biochem (Tokyo)* 122, 675-680.

Hille, B. 2001. *Ion Channels of Excitable Membranes*. Sinauer Associates, Inc. Third Edition.

Hjorth-Simonsen, A. 1973. Some intrinsic connections of the hippocampus in the rat: an experimental analysis. *J. Comp. Neural* 147, 141-162.

Hoffman, J., Aslimovska, L., Bamann, C., Glaubitz, C., Bamberg, E. & Brutschy, B. 2010. Studying the stoichiometries of membrane proteins by mass spectrometry: microbial rhodopsins and a potassium ion channel. *Phys. Chem* 12, 3480–3485.

Holland, E., Braun, F., Nonnengässer, C., Harz, H. & Hegemann, P. 1996. The nature of rhodopsin-triggered photocurrents in *Chlamydomonas*. I. Kinetics and influence of divalent ions. *Biophysical journal* 70, 924–931.

Howard, M., Burger, R. & Rubel, E. 2007. A developmental switch to GABAergic inhibition dependent on increases in Kv1-type K⁺ currents. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27, 2112–2123.

Hu, H., Vervaeke, K. & Storm, J.F. 2002. Two forms of electrical resonance at theta frequencies, generated by M current, h current and persistent Na⁺ current in rat hippocampal pyramidal cells. *The Journal of physiology* 545, 783–805.

Huang, L., Garcia, I., Jen, H.I. & Arenkiel, B. 2012. Reciprocal connectivity between mitral cells and external plexiform layer interneurons in the mouse olfactory bulb. *Frontiers in neural circuits* 7, 32-48.

Hunsaker, M.R., Lee, B. & Kesner, R.P. 2008. Evaluating the temporal context of episodic memory: The role of CA3 and CA1. *Behav Brain Res* 188, 310–315

Ishizuka, N., Weber, J. & Amaral, D.G. 1990. Organization of Intrahippocampal Projections Originating from CA3 Pyramidal Cells in the Rat. *J comp Neurol* 295, 580-623.

Iyengar, S. & Mott, D. 2008. Neuregulin blocks synaptic strengthening after epileptiform activity in the rat hippocampus. *Brain research* 1208, 67–73

Jahnsen, H. & Llinás, R. 1983. Ionic basis for the electroresponsiveness and oscillatory properties of Guinea-Pig thalamic neurons *in vitro*. *J. Physiol* 349, 227-247.

Janssen, M., Leiva-Salcedo, E. & Buonanno, A. 2012. Neuregulin directly decreases voltage-gated sodium current in hippocampal ErbB4-expressing interneurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32, 13889–13895.

Jonas, P., Bischofberger, J., Fricker, D. & Miles, R. 2003. Interneuron Diversity series: Fast in, fast out--temporal and spatial signal processing in hippocampal interneurons. *Trends in neurosciences* 27, 30–40.

Jones, J.T., Akita, R.W. & Sliwkowski, M.X. 1999. Binding specificities and affinities of egf domains for ErbB receptors. *FEBS Lett* 447, 227-231.

Jones, M. & Wilson, M. 2005. Theta rhythms coordinate hippocampal-prefrontal interactions in a spatial memory task. *PLoS biology* 3, 2187-2199.

Kamondi, A., Acsády, L., Wang, X. & Buzsáki, G. 1997. Theta oscillations in somata and dendrites of hippocampal pyramidal cells in vivo: activity-dependent phase-precession of action potentials. *Hippocampus* 8, 244–261.

Kato, H., Zhang, F., Yizhar, O., Ramakrishnan, C., Nishizawa, T., Hirata, K., Ito, J., Aita, Y., Tsukazaki, T., Hayashi, S., Hegemann, P., Maturana, A.D., Ishitani, R., Deisseroth, K. & Nureki, O. 2012. Crystal structure of the channelrhodopsin light-gated cation channel. *Nature* 482, 369–374.

Kawaguchi, Y., Katsumaru, H., Kisaka, T., Heizmann, C.W. & Hama, K. 1987. Fast spiking cells in rat hippocampus (CA1 region) contain the calcium binding protein parvalbumin. *Brain Res* 416, 369-374.

Kesner, R.P., Hunsaker, M.R. & Gilbert, P.E. 2005 The role of CA1 in the acquisition of an object trace-odor paired associate task. *Behav Neurosci* 119, 781–786.

Khirug, S., Yamada, J., Afzalov, R., Voipio, J., Khiroug, L. & Kaila, K. 2008. GABAergic depolarization of the axon initial segment in cortical principal neurons is caused by the Na–K–2Cl cotransporter NKCC1. *The Journal of Neuroscience* 28, 4635–4639.

Kim, J.C., Cook, M.N., Carey, M.R., Shen, C., Regehr, W.G. & Dymecki, S.M. 2009. Linking genetically defined neurons to behavior through a broadly applicable silencing allele. *Neuron* 63, 305–315.

Klausberger, T. 2009. GABAergic interneurons targeting dendrites of pyramidal cells in the CA1 area of the hippocampus. *Eur J Neurosci* 3, 947-957.

Klausberger, T., Magill, P., Márton, L., Roberts, J., Cobden, P., Buzsáki, G. & Somogyi, P. 2003. Brain-state- and cell-type-specific firing of hippocampal interneurons in vivo. *Nature* 421, 844–848.

Klausberger, T. & Somogyi, P. 2008. Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. *Science* 321, 53–57.

Kocabas, A., Shen, C.H., Guo, Z. & Ramanathan, S. 2012. Controlling interneuron activity in *Caenorhabditis elegans* to evoke chemotactic behaviour. *Nature* 490, 273–277.

Kohara, K., Pignatelli, M., Rivest, A.J., Jung, H.Y., Kitamura, T., Suh, J., Frank, D., Kajikawa, K., Mise, N., Obata, Y., Wickersham, I.R. & Tonegawa, S. 2014. Cell type-specific genetic and optogenetic tools reveal hippocampal CA2 circuits. *Nat. Neurosci.* 17, 269–279.

Kohler, C. 1988. Intrinsic connections of the retrohippocampal region in the rat brain. III. The lateral entorhinal area. *J. Comp. Neurol* 271, 208-228.

Konopacki, J., Gołębiewski, H., Eckersdorf, B., Błaszczuk, M. & Grabowski, R. 1997. Theta-like activity in hippocampal formation slices: the effect of strong disinhibition of GABAA and GABAB receptors. *Brain research* 775, 91–98.

Krook-Magnuson, E., Luu, L., Lee, S.H., Varga, C. & Soltesz, I. 2011. Ivy and Neurogliaform Interneurons Are a Major Target of μ -Opioid Receptor Modulation. *J Neurosci* 31, 14861-14870.

Krook-Magnuson, E., Varga, C., Lee, S.H. & Soltesz, I. 2012. New dimensions of interneuronal specialization unmasked by principal cell heterogeneity. *Trends in neurosciences* 35, 175–184.

Kubie, J., Muller, R. & Bostock, E. 1990. Spatial firing properties of hippocampal theta cells. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 10, 1110–1123.

Kvitsiani, D., Ranade, S., Hangya, B., Taniguchi, H., Huang, J.Z. & Kepecs, A. 2013. Distinct behavioural and network correlates of two interneuron types in prefrontal cortex. *Nature* 498, 363–366.

Kwon, O., Paredes, D., Gonzalez, C., Neddens, J., Hernandez, L., Vullhorst, D. & Buonanno, A. 2008. Neuregulin-1 regulates LTP at CA1 hippocampal synapses through activation of dopamine D4 receptors. *PNAS* 105, 15587-15592.

Lacaille, J.C., Mueller, A., Kundel, D.D. & Schwartzkroin, P.A. 1987. Local circuit interactions between oriens/alveus interneurons and CA1 pyramidal cells in hippocampal slices: electrophysiology and morphology. *J Neurosci* 7, 1979-1993.

LaLumiere, R. 2010. A new technique for controlling the brain: optogenetics and its potential for use in research and the clinic. *Brain stimulation* 4, 1–6.

Lanyi, J.K., & Oesterhelt, D. 1982. Identification of the retinal-binding protein in halorhodopsin. *J. Biol. Chem.* 257, 2674–2677.

Lanyi, J. K. 2006. Proton transfers in the bacteriorhodopsin photocycle. *Biochim. Biophys. Acta* 1757, 1012–1018.

Law, A.J., Kleinman, J.E., Weinberger, D.R. & Weickert, C.S. 2007. Disease-associated intronic variants in the ErbB4 gene are related to altered ErbB4 splice-variant expression in the brain in schizophrenia. *Hum Mol Genet* 16,129 –141.

Lawrence, Y.A., Kemper, T.L., Bauman, M.L. & Blatt, G.J. 2010. Parvalbumin-, calbindin-, and calretinin-immunoreactive hippocampal interneuron density in autism. *Acta Neurol Scand* 121, 99–108.

Lee, S.Y. & Soltesz, I. 2011. Cholecystokinin: a multi-functional molecular switch of neuronal circuits. *Dev Neurobiol* 71, 83-91.

Lee, S.Y., Földy, C., Szabadics, J., & Soltesz, I. 2011. Cell-Type-Specific CCK2 Receptor Signaling Underlies the Cholecystokinin-Mediated Selective Excitation of Hippocampal Parvalbumin-Positive Fast-Spiking Basket Cells. *J Neurosci* 31, 10993-11002.

Lee, S., Kruglikov, I., Huang, Z., Fishell, G. & Rudy, B. 2013. A disinhibitory circuit mediates motor integration in the somatosensory cortex. *Nat. Neurosci.* 16, 1662–1670.

Lemke, G. 1996. Neuregulins in development. *Mol Cell Neurosci.* 7, 247-262.

Lenz, J. & Lobo, M. 2013. Optogenetic insights into striatal function and behavior. *Behavioural brain research* 255, 44–54.

Lepousez, G. & Lledo, P.-M. 2013. Odor discrimination requires proper olfactory fast oscillations in awake mice. *Neuron* 80, 1010–1024.

Li, B., Woo, R.-S., Mei, L. & Malinow, R. 2007. The neuregulin-1 receptor erbB4 controls glutamatergic synapse maturation and plasticity. *Neuron* 54, 583–597.

Li, K.X., Lu, Y.M., Xu, Z.H., Zhang, J., Zhu, J.M., Zhang, J.M., Cao, S.X., Chen, X.J., Chen, Z., Luo, J.H., Duan, S. & Li, X.M. 2012. Neuregulin 1 regulates excitability of fast-spiking neurons through Kv1.1 and acts in epilepsy. *Nat. Neurosci.* 15, 267–273.

Lin, J. 2010. A user's guide to channelrhodopsin variants: features, limitations and future developments. *Experimental physiology* 96, 19–25.

Lodato, S., Rouaux, C., Quast, K.B., Jantrachotechatchawan, C., Studer, M., Hensch, T.K. & Arlotta, P. 2011. Excitatory projection neuron subtypes control the distribution of local inhibitory interneurons in the cerebral cortex. *Neuron* 69, 763-779.

Lorente de Nó, R. 1934. Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system. *J Psychol Neurol* 46, 113-177.

Lórenz-Fonfría, V., Resler, T., Krause, N., Nack, M., Gossing, M., Fischer von Mollard, G., Bamann, C., Bamberg, E., Schlesinger, R. & Heberle, J. 2013. Transient protonation changes in channelrhodopsin-2 and their relevance to channel gating. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 1273–1281.

Lu, B. 2003. Pro-region of neurotrophins: role in synaptic modulation. *Neuron* 39, 735–738.

Luecke, H., Richter, H., & Lanyi, J. 1998. Proton transfer pathways in bacteriorhodopsin at 2.3 angstrom resolution. *Science* 280, 1934–1937.

Mainen, Z. & Sejnowski, T. 1995. Reliability of spike timing in neocortical neurons. *Science* 268, 1503–1506.

Mainen, Z., Joerges, J., Huguenard, J. & Sejnowski, T. 1995. A model of spike initiation in neocortical pyramidal neurons. *Neuron* 15, 1427–1439.

Matsuno-Yagi, A. & Mukohata, Y. 1977. Two possible roles of bacteriorhodopsin; a comparative study of strains of *Halobacterium halobium* differing in pigmentation. *Biochemical and biophysical research communications* 78, 237–243.

Markram, H., Toledo-Rodriguez, M., Wang, Y., Gupta, A., Silberberg, G. & Wu, C. 2004. Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nature reviews. Neuroscience* 5, 793–807.

Marshall, C.J. 1995. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: Transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation 80, 179–185.

Mehta, M. R., Lee, A. K. & Wilson, M. A. 2002. Role of experience and oscillations in transforming a rate code into a temporal code. *Nature* 417, 741-746.

Mei, L. & Xiong, W.-C. 2008. Neuregulin 1 in neural development, synaptic plasticity and schizophrenia. *Nature reviews. Neuroscience* 9, 437–452.

Meyer, D., Yamaai, T., Garratt, A., Riethmacher-Sonnenberg, E., Kane, D., Theill, L.E. & Birchmeier, C. 1997. Isoform-specific expression and function of neuregulin. *Development* 124, 3575-3586.

Michel, H., & Oesterhelt, D. 1976. Light-induced changes of the pH gradient and the membrane potential in *H. halobium*. *FEBS Lett.* 65, 175–178.

Miles, R., Tóth, K., Gulyás, A., Hájos, N. & Freund, T.F. 1996. Distinct functional roles for somatic and dendritic inhibition in hippocampus. *Neuron* 16, 815-823.

Moore, S.J., Cooper, D.C., & Spruston, N. 2009. Plasticity of burst firing induced by synergistic activation of metabotropic glutamate and acetylcholine receptors. *Neuron* 61, 287–300.

Moore, A. & Wehr, M. 2013. Parvalbumin-expressing inhibitory interneurons in auditory cortex are well-tuned for frequency. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 33, 13713–13723.

Moriyoshi, K., Richards, L., Akazawa, C., O’Leary, D. & Nakanishi, S. 1996. Labeling neural cells using adenoviral gene transfer of membrane-targeted GFP. *Neuron* 16, 255–260.

Nack, M., Radu, I., Gossing, M., Bamann, C., Bamberg, E., Mollard, G.F. & Heberle, J. 2010. The DC gate in channelrhodopsin-2: crucial hydrogen bonding interaction between C128 and D156. *Photochem. Photobiol. Sci* 9, 194–198.

Nagel, G., Ollig, D., Fuhrmann, M., Kateriya, S., Musti, A., Bamberg, E. & Hegemann, P. 2002. Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae. *Science* 296, 2395–2398.

Nagel, G., Szellas, T., Huhn, W., Kateriya, S., Adeishvili, N., Berthold, P., Ollig, D., Hegemann, P. & Bamberg, E. 2003. Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 13940–13945.

Nakazawa N., Quirk M., Chitwood R., Watanabé M., Yeckel M., Sun L., Kato A., Carr C., Johnston D., Wilson M. & Tonegawa S. 2002. Requirement for hippocampal CA3 NMDA receptors in associative memory recall. *Science* 297, 211-218.

Naik, S., Guidotti, A. & Costa, E. 1976. Central GABA receptor agonists: comparison of muscimol and baclofen. *Neuropharmacology* 15, 479-484.

Neddens, J. & Buonanno, A. 2010. Selective populations of hippocampal interneurons express ErbB4 and their number and distribution is altered in ErbB4 knockout mice. *Hippocampus* 20, 724–744.

Neddens, J., Fish, K., Tricoire, L., Vullhorst, D., Shamir, A., Chung, W., Lewis, D., McBain, C. & Buonanno, A. 2011. Conserved interneuron-specific ErbB4 expression in frontal cortex of rodents, monkeys, and humans: implications for schizophrenia. *Biological psychiatry* 70, 636–645.

Nelson, A., Schneider, D.M., Takatoh, J., Sakurai, K., Wang, F. & Mooney, R. 2013. A circuit for motor cortical modulation of auditory cortical activity. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 33, 14342–14353.

Neu, A. 2007. Postsynaptic origin of CB1-dependent tonic inhibition of GABA release at cholecystinin-positive basket cell to pyramidal cell synapses in the CA1 region of the rat hippocampus. *J Physiol* 578, 233-247.

Neuman, R., Ben-Ari, Y., Gho, M. & Cherubini, E. 1988. Blockade of excitatory synaptic transmission by 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2, 3-dione (CNQX) in the hippocampus in vitro. *Neurosci Lett* 92, 64-68.

Nieh, E., Kim, S.-Y., Namburi, P. & Tye, K. 2013. Optogenetic dissection of neural circuits underlying emotional valence and motivated behaviors. *Brain research* 1511, 73–92.

Niswender, C.M., & Conn, P.J. 2010. Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 50, 295–322.

Oesterhelt, D. & Stoeckenius, W. 1971. Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*. *Nature: New biology* 233, 149-152.

Oesterhelt, D. & Stoeckenius, W. 1973. Functions of a new photoreceptor membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 2853–2857.

Oesterhelt, D., Hegemann, P. & Tittor, J. 1985. The photocycle of the chloride pump halorhodopsin. II: Quantum yields and a kinetic model. *EMBO J.* 4, 2351–2356.

Olah, S., Füle, M., Komlósi, G., Varga, C., Báldi, R., Barzó, P. & Tamás, G. 2009. Regulation of cortical microcircuits by unitary GABA-mediated volumen transmission. *Nature* 461, 1278–1281.

Olayioye, M.A., Graus-Porta, D., Beerli, R.R., Rohrer, J., Gay, B. & Hynes, N.E. 1998. ErbB-1 and ErbB-2 acquire distinct signaling properties dependent upon their dimerization partner. *Mol Cell Biol.* 18, 5042-5051.

Olbrich, H. & Braak, H. 1985. Ratio of pyramidal cells versus non-pyramidal cells in sector CA1 of the human Ammon's horn. *Anat. Embryol.* 173, 105-110.

Olcese, U., Iurilli, G. & Medini, P. 2013. Cellular and synaptic architecture of multisensory integration in the mouse neocortex. *Neuron* 79, 579–593.

Ozaki, M., Kishigami, S. & Yano, R. 1998. Expression of receptors for neuregulins, ErbB2, ErbB3 and ErbB4, in developing mouse cerebellum. *Neuroscience research* 30, 351–354.

Ozaki, M., Itoh, K., Miyakawa, Y., Kishida, H. & Hashikawa, T. 2004. Protein processing and releases of neuregulin-1 are regulated in an activity depending manner. *J. Neurochem* 91, 176–188.

Packer, A.M. & Yuste, R. 2011. Dense, unspecific connectivity of neocortical parvalbumin-positive interneurons: a canonical microcircuit for inhibition? *Journal of Neuroscience* 31, 13260–13271.

Paxinos, G. & Franklin, K.B.J. 2001. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Second Edition, Academic Press, San Diego.

Peled, A. 2011. Optogenetic neuronal control in schizophrenia. *Medical hypotheses* 76, 914–921.

Peng, Z., Zhang, N., Wei, W., Huang, C.S., Cetina, Y., Otis, T.S. & Houser, C.R. 2013. A reorganized GABAergic circuit in a model of epilepsy: evidence from optogenetic labeling and stimulation of somatostatin interneurons. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 33, 14392–14405.

Pfeffer, C., Xue, M., He, M., Huang, Z. & Scanziani, M. 2013. Inhibition of inhibition in visual cortex: the logic of connections between molecularly distinct interneurons. *Nat. Neurosci.* 16, 1068–1076.

Pinkas-Kramarski, R., Shelly, M., Glathe, S., Ratzkin, B.J. & Yarden, Y. 1996. Neu differentiation factor/neuregulin isoforms activate distinct receptor combinations. *J Biol Chem* 271, 19029-19032.

Pinkas-Kramarski, R., Shelly, M., Guarino, B.C., Wang, L.M., Lyass, L., Alroy, I., Alimandi, M., Kuo, A., Moyer, J.D. & Lavi, S. 1998. ErbB tyrosine kinases and the two neuregulin families constitute a ligand-receptor network. *Mol Cell Biol* 18, 6090-6101.

Plautz, J., Day, R.N., Dailey, G.M., Welsh, S.B., Hall, J.C., Halpain, S. & Kay, S.A. 1995. Green fluorescent protein and its derivatives as versatile markers for gene

expression in living *Drosophila melanogaster*, plant and mammalian cells. *Gene* 173, 83–87.

Plazzo, A.P., De Franceschi, N., Da Broi, F., Zonta, F., Sanasi, M.F., Filippini, F. & Mongillo, M. 2011. Bioinformatic and mutational analysis of channelrhodopsin-cation conducting pathway. *J. Biol. Chem.* 287, 4818-4825.

Potter, G., Petryniak, M., Schevchenko, E., McKinsey, G., Ekker, M. & Rubenstein, J. 2009. Generation of Cre-transgenic mice using *Dlx1/Dlx2* enhancers and their characterization in GABAergic interneurons. *Molecular and Cellular Neuroscience* 40, 167-186.

Povysheva, N., Zaitsev, A., Gonzalez-Burgos, G. & Lewis, D. 2012. Electrophysiological heterogeneity of fast-spiking interneurons: chandelier versus basket cells. *PloS one* 8, 553-566.

Raisman, G., Cowan, W.M. & Powell T.P.S. 1965. The extrinsic afferent, commissural and association fibres of the hippocampus. *Brain* 88, 963-997.

Racker, E. & Stoeckenius, W. 1974. Reconstitution of purple membrane vesicles catalyzing light-driven proton uptake and adenosine triphosphate formation. *The Journal of biological chemistry* 249, 662–663.

Ramón y Cajal, S. 1893. Estructura del asta de Ammon y fascia dentata. *Ann. Sac. Esp. Hist. Nat.* 22.

Ramón y Cajal, S. 1911. *Histologie du Système Nerveux de l'Homme et des Vertébrés*. Paris: Maloine.

Radu, I., Bamann, C., Nack, M., Nagel, G., Bamberg, E. & Heberle, J. 2009. Conformational changes of channelrhodopsin-2. *Journal of the American Chemical Society* 131, 7313–7319.

Riethmacher, D., Sonnenberg-Riethmacher, E., Brinkmann, V., Yamaai, T., Lewin, G.R. & Birchmeier, C. 1997. Severe neuropathies in mice with targeted mutations in the ErbB3 receptor. *Nature*, 389, 725-730.

Romo-Parra, H., Treviño, M., Heinemann, U. & Gutiérrez, R. 2008. GABA actions in hippocampal area CA3 during postnatal development: differential shift from depolarizing to hyperpolarizing in somatic and dendritic compartments. *Journal of neurophysiology* 99, 1523–1534.

Rossi, M., Hayrapetyan, V.Y., Maimon, B., Mak, K., Je, H.S. & Yin, H.H. 2012. Prefrontal cortical mechanisms underlying delayed alternation in mice. *Journal of neurophysiology* 108, 1211–1222.

Sah, P., Hestrin, S. & Nicoll, R.A. 1990. Properties of excitatory postsynaptic currents recorded in vitro from rat hippocampal interneurons. *J Physiol (Lond)* 430, 605-616.

Santoro, B. Chen, S., Luthi, A., Pavlidis, P., Shumyatsky, G.P., Tibbs, G.R. & Siegelbaum, S.A. 2000. Molecular and functional heterogeneity of hyperpolarization-activated pacemaker channels in the mouse CNS. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20, 5264–5275.

Sasaki, J., Brown, L.S., Chon, Y.S., Kandori, H., Maeda, A., Needleman, R., & Lanyi, J.K. 1995. Conversion of bacteriorhodopsin into a chloride ion pump. *Science* 269, 73–75.

Sauer, J.-F., Strüber, M. & Bartos, M. 2012. Interneurons provide circuit-specific depolarization and hyperpolarization. *The Journal of Neuroscience* 32, 4224–4229.

Schobert, B., & Lanyi, J.K. 1982. Halorhodopsin is a light-driven chloride pump. *J. Biol. Chem.* 257, 10306–10313.

Schreiber, S., Fellous, J., Whitmer, D. & Tiesina, P. 2003. A new correlation-based measure of spike timing reliability. *Neurocomputing* 54, 925-931.

Schwartzkroin, P.A. & Mathers, L.H. 1978. Physiological and morphological identification of a non-pyramidal hippocampal cell type. *Brain Res* 157, 1-10.

Seress, L. 1993. Distribution, morphological features, and synaptic connections of parvalbumin and calbindin D28k-immunoreactive neurons in the human hippocampal formation. *J Comp Neurol* 337, 208-230.

Sherman, L.S., Rizvi, T.A., Karyala, S. & Ratner, N. 2000. CD44 enhances neuregulin signaling by Schwann cells. *J Cell Biol*, 150, 1071-1084.

Sik, A., Penttonen, M., Ylinen, A. & Buzsáki, G. 1995. Hippocampal CA1 interneurons: an in vivo intracellular labeling study. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 15, 6651–6665.

Sik, A., Penttonen, M., Ylinen, A., Horvath, Z. & Buzsáki, G. 1994. Intracellularly labeled hippocampal interneurons *in vivo*. *Soc Neurosci Abstr* 19, 148-150.

Silberberg, G., Darvasi, A., Pinkas-Kramarski, R. & Navon, R. 2006. The involvement of ErbB4 with schizophrenia: Association and expression studies. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 141,142–148.

Sloviter, R. 1989. Calcium-binding protein (Calbindin-D28k) and parvalbumin immunocytochemistry: localization in the rat hippocampus with specific reference to the selective vulnerability of hippocampal neurons to seizure activity. *J Comp Neurol* 280, 183-196.

Smear, M., Resulaj, A., Zhang, J., Bozza, T. & Rinberg, D. 2013. Multiple perceptible signals from a single olfactory glomerulus. *Nat. Neurosci.* 16, 1687–1691.

Smythe, J.W., Colom, L.V. & Bland, B.H. 1992. The extrinsic modulation of hippocampal theta depends on the coactivation of cholinergic and GABAergic medial septal inputs, *Neurosci. Biobehav. Rev* 16, 289–308.

Snodgrass, S. 1978. Use of 3H-muscimol for GABA receptor studies. *Nature* 273, 392-394.

Sohal, V., Zhang, F., Yizhar, O. & Deisseroth, K. 2009. Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. *Nature* 459, 698-702.

Soltesz, I. 2005. *Diversity in the Neuronal Machine*. Oxford University Press.

Somogyi, P., Nunzi, M.G., Gorio, A. & Smith, A.D. 1983. A new type of specific interneuron in the monkey hippocampus forming synapses exclusively with the axón initial segments of piramidal cells. *Brain Res* 259, 137-142.

Spudich, J.L. 1998. Variations on a molecular switch: transport and sensory signalling by archaeal rhodopsins. *Mol. Microbiol.* 28, 1051–1058.

Staff, N.P., Jung, H.Y., Thiagarajan, T., Yao, M., & Spruston, N. 2000. Resting and active properties of pyramidal neurons in subiculum and CA1 of rat hippocampus. *J. Neurophysiol.* 84, 2398–2408.

Staley, K.J., Bains, J.S., Yee, A., Hellier, J. & Longacher, J.M. 2001. Statistical model relating CA3 burst probability to recovery from burst-induced depression at recurrent colateral synapses. *J. Neurophysiol.* 86, 2736–2747

Stark, E., Eichler, R., Roux, L., Fujisawa, S., Rotstein, H.G. & Buzsáki, G. 2013. Inhibition-induced theta resonance in cortical circuits. *Neuron* 80, 1263–1276.

Steriade, M., McCormick, D.A. & Sejnowski, T. 1993. Thalamocortical oscillations in the sleeping and aroused brain. *Science* 262, 679-685.

Steward, O. & Scoville, S.A. 1976. Cells of Origin of Entorhinal Cortical Afferents to the Hippocampus and Fascia Dentata of the rat. *J Comp Neurol* 169, 347-370.

Stuart, G. & Spruston, N. 1998. Determinants of voltage attenuation in neocortical pyramidal neuron dendrites. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18, 3501–3510.

Sugiyama, Y., Wang, H., Hikima, T., Sato, M., Kuroda, J., Takahashi, T., Ishizuka, T. & Yawo, H. 2009. Photocurrent attenuation by a single polar-to-nonpolar point mutation of channelrhodopsin-2. *Photochem. Photobiol. Sci.* 8, 328–336.

Tamanaki, N., Abe, K. & Nojyo, Y. 1988. Three-Dimensional Analysis of the Whole Axonal Arbors Originating from Single CA2 Pyramidal Neurons in the Rat Hippocampus with the Aid of a Computer Graphic Technique. *Brain Research* 452, 255-272.

Tamanaki, N. & Nojyo, Y. 1990. Organization of Intrahipocampal Projections Originating from CA3 Pyramidal Cells in the Rat. *J Comp Neurol* 295, 580-623.

Tamanaki, N. & Nojyo, Y. 1990. Disposition of the slab-like modules formed by axon branches originating from single CA1 pyramidal neurons in the rat hippocampus. *J Comp Neurol* 291, 509-519.

Taniguchi, H., He, M., Wu, P., Kim, S., Paik, R., Sugino, K., Kvitsani, D., Fu, Y., Lu, J., Lin, Y., Miyoshi, G., Shima, Y., Fishell, G., Nelson, B. & Huang. J. 2011. A resource of Cre Driver Lines for Genetic targeting of GABAergic Neurons in Cerebral Cortex. *Neuron*. 71, 995-1013.

Taniguchi, H., Lu, J. & Huang, Z. 2013. The spatial and temporal origin of chandelier cells in mouse neocortex. *Science* 339, 70–74.

Thomson, A. M., Bannister, A. P., Mercer, A. & Morris, O. T. 2002. Target and temporal pattern selection at neocortical synapses. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 357, 1781–1791.

Thompson, M., Lauderdale, S., Webster, M.J., Chong, V.Z., McClintock, B. & Saunders, R. 2007. Widespread expression of ErbB2, ErbB3 and ErbB4 in non-human primate brain. *Brain Res* 1139, 95–109.

Tiesinga, P. 2012. Motifs in health and disease: the promise of circuit interrogation by optogenetics. *The European journal of neuroscience* 36, 2260–2272.

Ting, A., Chen, Y., Wen, L., Yin, D.M., Shen, C., Tao, Y., Liu, X., Xiong, W.C. & Mei, L. 2011. Neuregulin 1 promotes excitatory synapse development and function in GABAergic interneurons. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 31, 15–25.

Tomioka, H., Takahashi, T., Kamo, N., & Kobatake, Y. 1986. Flash spectrophotometric identification of a fourth rhodopsin-like pigment in *Halobacterium halobium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 139, 389–395.

Tóth, K. & Freund, T.F. 1992. Calbindin D28k-containing nonpyramidal cells in the rat hippocampus: their immunoreactivity for GABA and projection to the medial septum. *Neuroscience* 49, 793-805.

Traub, R., Whittington, M., Stanford, I. & Jefferys, J.A. 1996. mechanism for generation of long-range synchronous fast oscillations in the cortex. *Nature* 383, 621–624.

Traub, R., Jefferys, J. & Whittington, M. 1997. Simulation of gamma rhythms in networks of interneurons and pyramidal cells. *Journal of computational neuroscience* 4, 141–150.

Tsunoda, S.P., Ewers, D., Gazzarrini, S., Moroni, A., Gradmann, D., & Hegemann, P. 2006. H⁺-pumping rhodopsin from the marine alga *Acetabularia*. *Biophys. J.* 91, 1471–1479.

Tsubota, T., Ohashi, Y., Tamura, K. & Miyashita, Y. 2012. Optogenetic inhibition of Purkinje cell activity reveals cerebellar control of blood pressure during postural alterations in anesthetized rats. *Neuroscience* 210, 137–144.

Tukker, J.J. 2007. Cell type-specific tuning of hippocampal interneuron firing during gamma oscillations in vivo. *J. Neuroscience* 27, 8184-8189.

Turski, L., Bressler, K., Klockgether, T. & Stephens, D. 1990. Differential effects of the excitatory amino acid antagonists, 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX) and 3-((+)-2-carboxypiperazin-4-yl)-propyl-1-phosphonic acid (CPP), on spinal reflex activity in mice. *Neuroscience letters* 113, 66–71.

Tyzio, R., Minlebaev, M., Rheims, S., Ivanov, A., Jorquera, I., Holmes, G.L., Zilberter, Y., Ben-Ari, Y. & Khazipov, R. 2008. Postnatal changes in somatic

gamma-aminobutyric acid signalling in the rat hippocampus. *The European journal of neuroscience* 27, 2515–2528.

Ueno, S., Bracamontes, J., Zorumski, C., Weiss, D. & Steinbach, J. 1997. Bicuculline and gabazine are allosteric inhibitors of channel opening of the GABAA receptor. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 17, 625–634.

Uhlhaas, P. & Singer, W. 2010. Abnormal neural oscillations and synchrony in schizophrenia. *Nature reviews. Neuroscience* 11, 100–113.

Ulrich, D. 2002. Dendritic resonance in rat neocortical pyramidal cells. *Journal of neurophysiology* 87, 2753–2759.

Urban, A., Rancillac, A., Martinez, L. & Rossier, J. 2011. Deciphering the Neuronal Circuitry Controlling Local Blood Flow in the Cerebral Cortex with Optogenetics in PV::Cre Transgenic Mice. *Frontiers in pharmacology* 3, 105.

Van Bleson, T., Hawes, B., Luttrell, D., Krueger, K., Touhara, K., Porfflri, E., Sakaue, M., Luttrell, L. & Lefkowitz, R. 2002. Receptor-tyrosine-kinase- and G β γ -mediated MAP kinase activation by a common signalling pathway. *Nature* 376, 781-784

Várò, G., Brown, L.S., Lakatos, M., & Lanyi, J.K. 2003. Characterization of the photochemical reaction cycle of proteorhodopsin. *Biophys. J.* 84, 1202–1207.

Verhoefen, M.K., Bamann, C., Blöcher, R., Förster, U., Bamberg, E. & Wachtveitl, J. 2010. The photocycle of channelrhodopsin-2: ultrafast reaction dynamics and subsequent reaction steps. *Chemphyschem: a European journal of chemical physics and physical chemistry* 11, 3113–3122.

Verret, L., Mann, E., Hang, G., Barth, A., Cobos, I., Ho, K., Devidze, N., Masliah, E., Kreitzer, A., Mody, I., Mucke, L. & Palop, J. 2012. Inhibitory interneuron deficit links altered network activity and cognitive dysfunction in Alzheimer model. *Cell* 149, 708–721.

Volgushev, M., Chistiakova, M. & Singer, W. 1998. Modification of discharge patterns of neocortical neurons by induced oscillations of the membrane potential. *Neuroscience* 83, 15-25.

Vullhorst, D., Neddens, J., Karavanova, I., Tricoire, L., Petralia, R., McBain, C. & Buonanno, A. 2009. Selective expression of ErbB4 in interneurons, but not pyramidal cells, of the rodent hippocampus. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 29, 12255–12264

Wang, X. & Carlén, M. 2012. Optogenetic dissection of cortical information processing-shining light on schizophrenia. *Brain research* 1476, 31–37.

Wang, X. & Buzsáki, G. 1996. Gamma oscillation by synaptic inhibition in a hippocampal interneuronal network model. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 16, 6402–6413.

Wang, W.W., Sineshchekov, O.A., Spudich, E.N., & Spudich, J.L. 2003. Spectroscopic and photochemical characterization of a deep ocean proteorhodopsin. *J. Biol. Chem* 278, 33985–33991.

Wang, H., Sugiyama, Y., Hikima, T., Sugano, E., Tomita, H., Takahashi, T., Ishizuka, T. & Yawo, H. 2009. Molecular determinants differentiating photocurrent properties of two channelrhodopsins from *Chlamydomonas*. *J. Biol. Chem.* 284, 5685–5696.

Wen, L., Lu, Y.S., Zhu, X.H., Li, X.M., Woo, R.S., Chen, Y.J., Yin, D.M., Lai, C., Terry, A., Vazdarjanova, A., Xiong, W.C. & Mei, L. 2010. Neuregulin 1 regulates pyramidal neuron activity via ErbB4 in parvalbumin-positive interneurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 1211–1216.

Whittington, M., Traub, R. & Jefferys, J. 1995. Synchronized oscillations in interneuron networks driven by metabotropic glutamate receptor activation. *Nature* 373, 612–615.

Whittington, M., Traub, R., Faulkner, H., Stanford, I. & Jefferys, J. 1997. Recurrent excitatory postsynaptic potentials induced by synchronized fast cortical oscillations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 12198–12203.

Whittington, M., Faulkner, H., Doheny, H. & Traub, R. 2000. Neuronal fast oscillations as a target site for psychoactive drugs. *Pharmacology & therapeutics* 86, 171–190.

Witten, I., Lin, S.C., Brodsky, M., Prakash, R., Diester, I., Anikeeva, P., Gradinaru, V., Ramakrishnan, C. & Deisseroth, K. 2010. Cholinergic interneurons control local circuit activity and cocaine conditioning. *Science* 330, 1677–1681.

Witter, M.P. & Amaral, D.G. 1991. Entorhinal Cortex of the Monkey: V. Projections to the Dentate Gyrus, Hippocampus and Subicular Complex. *J Comp Neurol* 307, 437-459.

Wolpowitz, D., Mason, T.B., Dietrich, P., Mendelsohn, M., Talmage, D.A. & Role, L.W. 2000. Cysteine-rich domain isoforms of the neuregulin-1 gene are required for maintenance of peripheral synapses. *Neuron* 25, 79-91.

Woo, R.S., Li, X.M., Tao, Y., Carpenter-Hyland, E., Huang, Y., Weber, J., Neiswender, H., Dong, X.P., Wu, J., Gassmann, M., Lai, C., Xiong, W.C., Gao, T.M. & Mei, L. 2007. Neuregulin-1 enhances depolarization-induced GABA release. *Neuron* 54, 599–610.

Xie, F., Raetzman, L. & Siegel, R. 2004. Neuregulin induces GABAA receptor beta2 subunit expression in cultured rat cerebellar granule neurons by activating multiple signaling pathways. *Journal of neurochemistry* 90, 1521–1529.

Yang, X., Kuo, Y., Devay, P., Yu, C. & Role, L. 1998. A cysteine-rich isoform of neuregulin controls the level of expression of neuronal nicotinic receptor channels during synaptogenesis. *Neuron* 20, 255–270.

Yau, H.J., Wang, H.F., Lai, C. & Liu, F.C. 2003. Neural development of the neuregulin receptor ErbB4 in the cerebral cortex and the hippocampus: preferential expression by interneurons tangentially migrating from the ganglionic eminences. *Cereb Cortex* 13, 252-264.

Ylinen, A., Bragin, A., Nadasdy, Z., Jando, G., Szabo, I., Sik, A. & Buzsáki, G. 1995. Sharp wave associated high frequency oscillation (200 Hz) in the intact hippocampus: network and intracellular mechanisms. *J Neurosci* 15, 30-46.

Zhang, D., Sliwkowski, M.X., Mark, M., Frantz, G., Akita, R., Sun, Y., Hillan, K., Crowley, C., Brush, J. & Godowski, P.J. 1997. Neuregulin-3 (NRG3): a novel neural tissue-enriched protein that binds and activates ErbB4. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94, 9562-9567.

Zhang, F., Wang, L.P., Boyden, E.S. & Deisseroth, K. 2006. Channelrhodopsin-2 and optical control of excitable cells. *Nat Methods*. 3, 785-792.

Zhang, F., Prigge, M., Beyrière, F., Tsunoda, S., Mattis, J., Yizhar, O., Hegemann, P. & Deisseroth, K. 2008. Red-shifted optogenetic excitation: a tool for fast neural control derived from *Volvox carteri*. *Nat. Neurosci.* 11, 631–633.

Zhao, S., Ting, J.T., Atallah, H.E., Qiu, L., Tan, J., Gloss, B., Augustine, G.J., Deisseroth, K., Luo, M., Graybiel, A.M. & Feng, G. 2011. Cell type-specific channelrhodopsin-2 transgenic mice for optogenetic dissection of neural circuitry function. *Nature Methods* 1668, 745-752.

Tipo neuronal	Morfología	Marcadores Moleculares	Propiedades de disparo	Entrada sináptica	Inervación sobre la célula principal.	Patrón de actividad en la generación de ritmos
Neurona Principal	Piramidal. (Tamamaki, <i>et al</i> , 1988, Amaral y Witter, 1989, López da Silva, <i>et al</i> , 1990) Presencia de dendritas basales y apicales características. (Ramón y Cajal, 1911, Tamamaki y Nojyo, 1990)	VgluT1 (Baude, <i>et al</i> , 1993)	Descargas de baja frecuencia. Muestran adaptación. Post-Hiperpolarizaciones de baja amplitud. Potenciales de acción largos. (Acsády, Görcs y Freund, 1996 y Klausber, 2009)	>3000 inervaciones distintas. (Krook-Magnuson, <i>et al</i> , 2012)	Representan las entradas excitatorias sobre otras células piramidales. (Acsády, Görcs y Freund, 1996 y Klausber, 2009)	Aumentan su frecuencia de disparo durante las "Sharp-wave ripples" (Klausberg, <i>et al</i> , 2003).
Interneuronas de canasta PV positivas.	No piramidal (Buckmaster y Schwartzkroin, 1995, Sik, <i>et al</i> , 1994) Proyecciones locales. (Finch, Nowlin y Babb 1983, Han, <i>et al</i> , 1993 y Freund y Buzsáki, 1996)	Parvalbumina (Aika, <i>et al</i> , 1994, Celio, 1986 y Gulyás, <i>et al</i> , 1991)	Descargas de alta frecuencia (>100 Hz). Baja adaptación. Potenciales de acción cortos. Post-hiperpolarizaciones de gran amplitud. (Kawaguchi, <i>et al</i> , 1987, Buzsáki, <i>et al</i> , 1992, Kawaguchi y Hama, 1987, Buhl, halasy y Somgyi, 1994)	Células piramidales (Freund y Buzsáki, 1996)	Cuerpos celulares y dendritas proximales. (Miles, <i>et al</i> , 1994, Klausberger, 2009, Seress, 1993)	Descargas rítmicas en la fase descendiente de las oscilaciones theta (Cobb, <i>et al</i> , 1995 y Klausberg, <i>et al</i> , 2003). Descargas de alta frecuencia durante las "Sharp wave ripples" (Klausberg, <i>et al</i> , 2003). No hay diferencias en la frecuencia de descarga en ambos episodios. Descargas en la frecuencia gamma dentro de la oscilación theta (Schwartzkroin y Mathers, 1978 y Klausberg, <i>et al</i> , 2003)
Interneuronas O-LM	No piramidal (Kunkel, Lacaille y Schwartzkroin, 1988, Proyecciones locales. Confinadas al estratum oriens. (Han, <i>et al</i> , 1993, Terminales axónicas densas.	mGluR7a y mGluR1a (Baude, <i>et al</i> , 1993)	Rectificación larga tiempo-dependiente evidente en inyecciones de corriente muy pequeñas. Potenciales de corta latencia. (Lacaille y Scharzkroin, 1988)	Células piramidales de CA1. (Gulyas, <i>et al</i> , 1999, Lodato, <i>et al</i> , 2011)	Penacho dendrítico alineado con la corteza entorhinal. (Lacaille, <i>et al</i> , 1987, Klausberger, 2009, Varga, <i>et al</i> , 2010)	Descargas rítmicas a través de las oscilaciones theta. (Lacaille y Schwartzkroin, 1998 y Klausberg, <i>et al</i> , 2003) Silentes durante las "Sharp-wave ripples" (Krook-Magnuson, <i>et al</i> , 2012)
Interneuronas biestratificadas.	No piramidal (Slovite, 1989)	Calbindina (Sloviter, 1989, Tóth y Freund, 1992, Seress, <i>et al</i> , 1993)	Disparos de alta frecuencia (>300Hz) (Ylinen, <i>et al</i> , 1995)	Mayoritaria de colaterales de Schaffer (Gulyas, <i>et al</i> , 1999, Lodato, <i>et al</i> , 2011)	Dendritas oblicuas coalineado con la entrada glutamatérgica de CA3. (Klausberger, 2009)	
Interneuronas trilaminares	No piramidal Células de largo alcance. Proyecciones a los estratos radiatum, oriens y piramidal. (Krook-Magnuson, <i>et al</i> , 2012)		Umbrales de estimulación muy bajos. Potenciales excitatorios post-sinápticos muy largos. Respuesta con ráfagas de amplitud decreciente. Intervalos interespigas cortos. (Sah, Hestrin y Nicill, 1990)			
Interneuronas CCK	No piramidal. (Gulyás, <i>et al</i> , 1991, Foldy, <i>et al</i> , 2007, Lee y Soltesz, 2011 y Lee, <i>et al</i> , 2011)	Cholecistoquinina (Sloviter y Nilaver, 1987, Lee y Soltesz, 2011)	Liberación asincrónica de GABA Disparos preferenciales en episodios de Sharp wave ripples. (Heff y Jonas, 2005, Katona, <i>et al</i> , 1999 y Matyas, <i>et al</i> , 2004)	Núcleos del tallo cerebral. (Foldy, <i>et al</i> , 2007, Lee y Soltesz, 2011 y Lee, <i>et al</i> , 2011)	Soma y dendritas proximales, dendritas apicales y penacho apical. (Neu, <i>et al</i> , 2007, Földy, <i>et al</i> , 2007 y Lee, <i>et al</i> , 2011)	

Interneuronas axo-axónicas	No piramidal. (Han, <i>et al</i> , 1993, Tamanaki, Abe y Nojyo, 1998 y Povysheva, <i>et al</i> , 2012)	Parvalbumina positivas (Klausberg, <i>et al</i> , 2003)	Disparos de altas frecuencias (>300 Hz) exclusivos de episodios de sharpwave ripples. (Krook-Magnuson, <i>et al</i> , 2012)	Células piramidales de CA1 en el segmento del cono axonal. (Gulyas, <i>et al</i> , 1999, Lodato, <i>et al</i> , 2011)	Segmentos iniciales del axón. (Somogyi, <i>et al</i> , 1983, Khirug, <i>et al</i> , 2008)	Disparos preferenciales posteriores al pico de los ciclos theta. (Klausberg, <i>et al</i> , 2003, Woodruff, <i>et al</i> , 2011 y Povysheva, <i>et al</i> , 2012) Descargas transitorias al inicio de las "Sharp-wave ripples" (Klausberg, <i>et al</i> , 2003, Woodruff, <i>et al</i> , 2011 y Povysheva, <i>et al</i> , 2012) Descargas en la frecuencia gamma dentro de la oscilación theta (Klausberg, <i>et al</i> , 2003, Woodruff, <i>et al</i> , 2011 y Povysheva, <i>et al</i> , 2012)
Interneuronas Ivy	No piramidal (Fuentealba, <i>et al</i> , 2008, Krook-Magnuson, <i>et al</i> , 2011 y Krook-Magnuson, <i>et al</i> , 2012)	Oxidasa de óxido nítrico, Neuropéptido Y. (Fuentealba, <i>et al</i> , 2008, Krook-Magnuson, <i>et al</i> , 2011 y Krook-Magnuson, <i>et al</i> , 2012)	Modulan la excitabilidad pre y postsináptica a escalas temporales lentas. (Acsady, <i>et al</i> , 1996, Fuentealba, <i>et al</i> , 2008, Krook-Magnuson, <i>et al</i> , 2011 y Krook-Magnuson, <i>et al</i> , 2012)			

ANEXO 1.- Propiedades de las interneuronas

Se describen en esta tabla las principales propiedades (Morfología, Marcadores moleculares, propiedades de disparo, entrada sináptica, Inervación sobre la célula principal y patrón de actividad en la generación de ritmos) de los principales subtipos de interneuronas descritas en el hipocampo.

ANEXO 2.- Vector viral y Recombinación CRE-Dependiente.

Se utilizaron ratones transgénicos que expresan la recombinasa CRE bajo el promotor GAD65, esta línea fue desarrollada por el laboratorio de Hiroki Taniguchi (Taniguchi, *et al*, 2011). Driver Line: Gad2-ires-Cre Jax 010802 (IRES: Internal Ribosome Entry Site)

Overview of Cre Recombination Patterns in Major Adult Brain Regions in Selected Lines										
	OB	CX	HP	AMYG	STR	SC	CB	THAL	HT	BS
Gad2-ires-Cre	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	Reticular nucleus	++++	++++

El patrón de recombinación se refiere a la expresión de mRNA exógeno medido por hibridación *in situ*. Los patrones de recombinación son “++++” en todas o casi todas; “+++” en muchas; “++” en algunas; “+” en pocas. OB, olfactory bulb; AOB, accessory olfactory bulb; CX, neocortex, piriform cortex; HP, hippocampus; AMYG, amygdala; SC, superior colliculus; CB, cerebellum; STR, striatum; THAL, thalamus; HT, hypothalamus; BS, brainstem; SCN, suprachiasmatic nucleus; PVN, paraventricular nucleus.
Eficiencia de marcaje: 15%; Especificidad de recombinación: ~92.2%; Eficiencia de recombinación: ~91%.
(Tomado de Taniguchi, *et al*, 2011)

En la línea Gad2-ires-Cre, la recombinasa Cre se coexpresa con Gad2 en las interneuronas GABAérgicas. La recombinación Cre/loxP convierte la actividad transitoria de CRE en la activación permanente de un reportero, en todas las regiones examinadas, la expresión del reportero RCE se restringe a las interneuronas GABAérgicas y las incluye prácticamente todas.

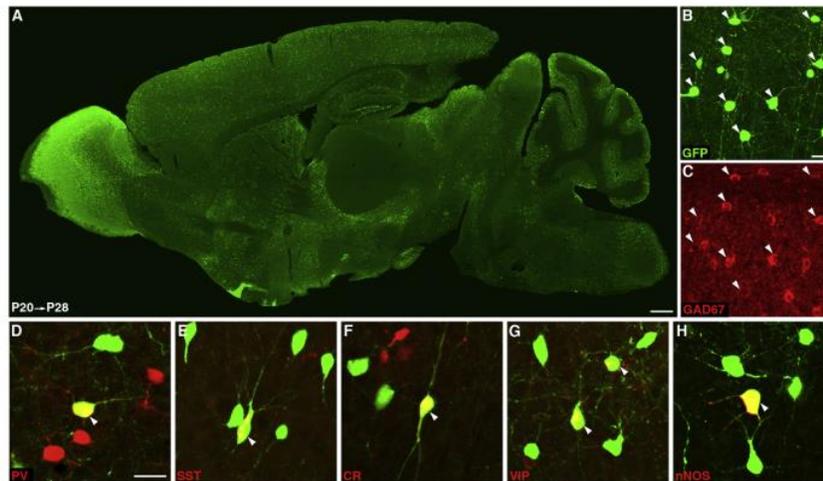


Figura Anexa 2.1.- La expresión Gad2-Cre dependiente

(A) Sección sagital de un animal en P28 con la inducción de tamoxifen en el día P20.
(B y C) Expresión de GFP activada por la recombinación Cre dependiente restringida a las neuronas GABAérgicas (Gad67, rojo) en la corteza.
(D-H) Las neuronas marcadas con GFP en la corteza incluyen poblaciones de interneuronas que son positivas para parvalbumina (PV), somatostatina (SST), calretinina (CR), Péptido vasointestinal (VIP) o nNOS.
(Tomado de Taniguchi, *et al*, 2011)

Vector viral.

Se utilizó el virus pAAV-Ef1a-DIO-hChR2(H134R)-EYFP-WPRE-pA desarrollado por el laboratorio de Deisseroth (<http://www.stanford.edu/group/dlab/optogenetics/>) y distribuido por PennCore con las siguientes características: (<http://www.med.upenn.edu/gtp/vectorcore/Catalogue.shtml>; número de catálogo AV-5-20298P)

Serotipo de la cápside AAV: 5

pBR322: Es un vector de clonación viral que contiene un origen de replicación que regula la replicación de un plásmido, manteniendo el número de copias en 20 por célula.

Promotor EF1a: Factor de elongación humano alfa (EF-1 alpha) promotor constitutivo que se usa para dirigir expresión génica ectópica. Se utiliza en condiciones donde otros promotores (como CMV) han disminuído su actividad o se han silenciado. Vectores de expresión exclusivos de mamíferos.

YFP: Mutante de la Green Fluorescent protein extraída de *Aequorea Victoria*. Su pico de excitación es de 514nm y su pico de emisión es 527nm.

WPRE: (WHP posttranscriptional Regulatory Element) Secuencia génica que cuando es transcrita forma una estructura terciaria que potencia la expresión, se utiliza para incrementar la expresión de los genes dirigidos por un vector viral.

hGHpA: Human growth hormone polyA terminator, polyA como señal de terminación

ChR2 (H134R): Channelrhodopsina humanizada con la mutación H134R que le confiere fotocorrientes celulares incrementadas en comparación con la ChR2 wild type.

Ampicilin: Resistencia a Ampicilina

F1 origin: Origen de replicación de cadena simple y empaquetamiento de las partículas virales.

pGEX3: Primer de secuenciación

ampR: Ampicilin resistance gene, se usa como un marcador para indicar el éxito de una transfección.

pAAV-EF1a-DIO-hChR2(H134R)-EYFP-WPRE

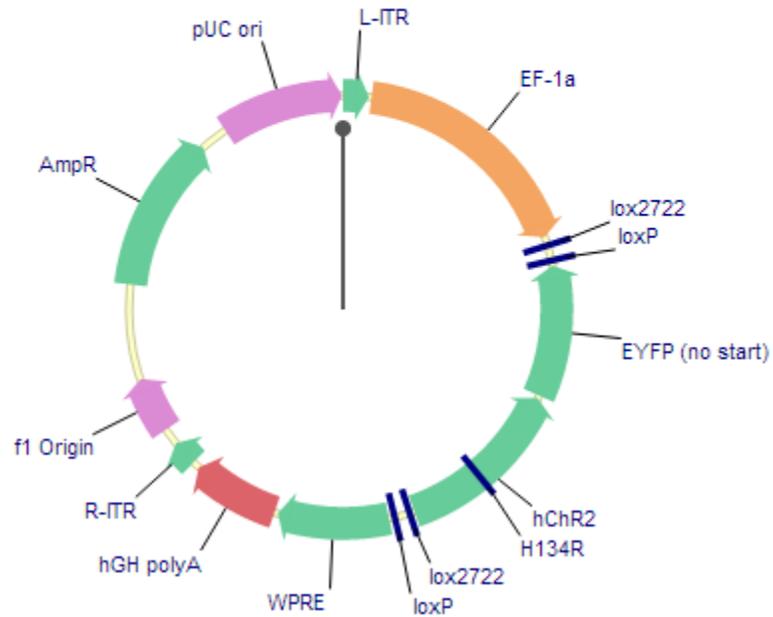


Figura Anexa 2.2.- Composición del Vector viral
(Tomado de http://www.everyvector.com/sequences/show_public/2491)