

TITULO DE LA TESIS

**MECANISMOS DE DEPRESION SINAPTICA INHIBITORIA A LARGO PLAZO INDUCIDOS
POR SEROTONINA EN LA CORTEZA PREFRONTAL**

Tesis entregada a

LA UNIVERSIDAD DE VALPARAISO

en Cumplimiento Parcial de los requisitos para optar al grado de

Doctor en ciencias con mención en Neurociencia

Facultad De Ciencias

Por

Koyam Morales Weil

Octubre, 2019

Dirigida por: Marco Fuenzalida Núñez

Co-Dirigida por: Pablo Moya Vera

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE VALPARAISO
INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la facultad de Ciencias que la tesis de Doctorado presentada por:

KOYAM MORALES WEIL

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Neurociencia, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día del Mes de de 2019

Director/a de Tesis:

Dr/a.

Co-Director/a de Tesis:

Dr/a.

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr/a.

Dr/a.

Dr/a.

Dr/a.

ÍNDICE DE MATERIAS

I.	LISTA DE FIGURAS	4
II.	ABREVIATURAS	5
III.	RESUMEN	7
IV.	INTRODUCCIÓN	11
V.	METODOLOGÍA	20
VI.	RESULTADOS	27
VII.	DISCUSIÓN	48
VIII.	CONCLUSIONES	57
IX.	REFERENCIAS	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Receptores serotoninérgicos en el SNC	17
Figura 2. 5-HT activa conductancias de potasio en neuronas piramidales de L2/3	28
Figura 3. 5-HT induce una iLTD sobre fibras GABAérgicas de L2/3	29
Figura 4. La iLTD por 5-HT ocurre sobre entradas sinápticas CB1+	30
Figura 5. 5-HT no modifica la eficacia sináptica de los terminales GABAérgicos de interneuronas PV+	32
Figura 6. La activación de los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT₃ son necesarios en la inducción de la iLTD	34
Figura 7. La activación simultánea de 5-HT_{2A} y 5-HT₃ inducen la iLTD	35
Figura 8. Los 5-HT_R presinápticos inducen iLTD vía disminución de AC/cAMP/PKA por activación de CB1_R	36
Figura 9. La inducción de la iLTD requiere de actividad presináptica dependiente de potenciales de acción	37
Figura 10. Se requiere la actividad del GABA_B para que 5-HT induzca iLTD en L2/3	39
Figura 11. Mecanismo de inducción y expresión de la iLTD por 5-HT en L2/3	40
Figura 12. 5-HT induce una iLTD sobre fibras GABAérgicas de L5	42
Figura 13. 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A} inducen iLTD sobre sinapsis de L5	43
Figura 14. La iLTD en L5 ocurre sobre entradas sinápticas CB1+	44
Figura 15. 5-HT activa la vía AC/cAMP/PKA en la postsinapsis para inducir iLTD en L5	45
Figura 16. Mecanismo de inducción y expresión de la iLTD por 5-HT en sinapsis de L5	47

ABREVIATURAS

5-HT: 5-hidroxitriptamina o serotonina

5-HT_R: Receptor de 5-HT

APV: Acido D-2-aminofosfonovalerato, antagonista específico del receptor NMDA

CNQX: Cyanquixaline (6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione)

eCBs: Endocannabinoides

CB1_R: Receptor cannabinoide tipo 1

GABA: Acido γ -Aminobutírico

GABA_A: Deceptor ionotrópico para GABA tipo A

GABA_B: Deceptor metabotrópico para GABA tipo B

LTD: Depresión a Largo Plazo (i.e. Long Term Depression)

LTP: Dotenciación a Largo Plazo (i.e. Long Term Potenciation)

iLTD: Depresión a largo plazo de sinapsis inhibitorias (i.e. inhibitory Long Term Depression).

eIPSC: Corrientes inhibitorias postsinápticas evocadas (i.e. evoked inhibitory postsynaptic currents).

mIPSC: Corrientes inhibitorias postsinápticas en miniatura (i.e. miniature inhibitory postsynaptic currents).

LCA: Líquido cefalorraquídeo artificial.

PKA: Proteína quinasa A (i.e. proteine kinase A)

PPR: Razón de pulsos pareados (i.e. Paired Pulse Ratio)

PV: Parvalbúmina

SOM: Somatostatina

VIP: Péptido intestinal vasoactivo

CCK: Colecistoquinina

RESUMEN

La corteza prefrontal (PFC) constituye el nivel más alto en la jerarquía cortical en el cerebro. Es, una estructura clave en funciones sociales y cognitivas, como el aprendizaje y la memoria, y cuya disfunción se ha asociado a diversos trastornos neuropsiquiátricos. Para una adecuada integración de la información y lograr una capacidad funcional óptima en la PFC, resulta esencial el rol del sistema GABAérgico para la mantención de un apropiado balance excitación-inhibición. Al respecto, la serotonina (5-HT) es un neuromodulador que controla fuertemente la fisiología de la PFC; diversos antecedentes indican que la compleja acción de 5-HT sobre la función sináptica depende de la activación de distintos subtipos de receptores serotoninérgicos (5-HT_R). Sin embargo, aún se desconoce la contribución relativa de cada subtipo de 5-HT_R en el control de la eficacia sináptica inhibitoria en PFC. Utilizando una combinación de técnicas de electrofisiología, optogenética y farmacología, estudiamos los mecanismos de inducción y expresión de la plasticidad sináptica a largo plazo en sinapsis GABAérgicas inducidos por la activación de 5-HT_R en la PFC de ratón. Nuestros resultados muestran que la 5-HT induce depresión a largo plazo (iLTD) de las corrientes inhibitorias evocadas (eIPSC) en neuronas piramidales de capa 2/3. El mecanismo de inducción de iLTD por 5-HT en PFC fue dependiente de la capa de las cuales provengan las fibras GABAérgicas, ya sean de capa 2/3 (L2/3) o capa 5 (L5). La inducción de la iLTD sobre las fibras provenientes de L2/3 requirió la activación conjunta de los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT₃. Se observó que la activación de 5-HT_{2A} induce la liberación de endocannabinoides (eCBs) para activar CB1_R en el terminal presináptico, disminuyendo la probabilidad de liberación de GABA. Esta forma de iLTD es completamente bloqueada por el agonista inverso de CB1_R AM251. También observamos que la activación de 5-HT₃ aumentó la liberación de GABA sobre el terminal presináptico inhibitorio, activando receptores GABA_B en esta terminal reduciendo la

liberación de GABA. Esta depresión es inhibida por el antagonista de GABA_B CGP. Nuestros resultados muestran que la iLTD inducida por 5-HT requiere de la coactivación de CB1_R y GABA_B en el terminal presináptico, generando una disminución en la probabilidad de liberación de GABA desde terminales inhibitorias de la L2/3. En paralelo, la 5-HT induce iLTD sobre las fibras GABAérgicas provenientes de L5 mediante dos mecanismos diferentes. El primero es por activación de 5-HT_{1A} en la postsinapsis mediante la disminución de la vía AC/cAMP/PKA, la cual induce depresión de la transmisión GABAérgica a largo plazo. El segundo mecanismo depende de la activación de 5-HT_{2A} postsináptico, el cual induce la liberación de eCBs, activando CB1_R en el terminal presináptico y generando una disminución a largo plazo en la probabilidad de liberación de GABA. Ambos mecanismos de iLTD de fibras GABAérgicas provenientes de L5 se bloquean totalmente al inactivar la PKA con H89, bloquear la actividad de proteínas G postsinápticas con GDPβS o al utilizar un antagonista para 5-HT_{1A} (WAY100635) y 5-HT_{2A} (MDL100907) simultáneamente. Por lo tanto, 5-HT en la PFC ejerce un fuerte control sobre la transmisión sináptica GABAérgica con especificidad anatómica, sináptica y de receptores, lo que forma parte de la fisiología cortical, ayudando a entender las bases neuronales en procesos cognitivos y neuropatológicos.

ABSTRACT

The prefrontal cortex (PFC) constitutes the highest level of the cortical hierarchy in the brain. The PFC is a key brain structure involved in social and cognitive functions such as learning and memory, and its dysfunction is believed to contribute to various neuropsychiatric disorders. The GABAergic local system is especially important to the fine-tuning of the excitatory–inhibitory balance required to enable proper integration of afferent information and sustain optimal functional capacity in the PFC. Serotonin (5-HT) is a neuromodulator that exerts strong control on the physiology of the PFC. Several lines of evidence indicate that the complex action of 5-HT on inhibitory synaptic function is determined by distinct 5-HT receptor (5-HT_R) subtypes. However, the relative contributions of each receptor subtype on inhibitory synaptic efficacy and plasticity remains elusive. Through electrophysiological patch-clamp recordings, optogenetics and pharmacology, we studied long-term mechanisms of the inhibitory synaptic plasticity induced by activation of 5-HT_R in PFC. We observed that local application of 5-HT induces long-term depression (iTLD) of evoked inhibitory post-synaptic currents (eIPSC) in pyramidal neurons of Layer 2/3. The mechanism of induction of iTLD depends of origin of GABAergic fiber, from Layer 2/3 or Layer 5. The induction of iTLD of fibers from Layer 2/3 requires activation of 5-HT_{2A} and 5-HT₃ together. We observed that activation of 5-HT_{2A} induces the release of endocannabinoids (eCBs) to activate CB1_R on presynaptic terminals. This iTLD is completely blocked with inverse agonist of CB1_R AM251. On the other hand, activation of 5-HT₃ increases GABA release upon presynaptic terminal activating GABA_B receptors. This iTLD is completely blocked with antagonist of GABA_B CGP. Thus, our results shown that iTLD by 5-HT occurs via co-activation of CB1_R and GABA_B on presynaptic terminal, decreasing probability of release of GABA from Layer 2/3. In parallel, 5-HT induces iTLD on fibers from Layer 5 via two different mechanism. First of them is

via activation of postsynaptic 5-HT_{1A} receptor, decreasing AC/cAMP/PKA to decreases GABAergic currents. The second mechanism is by activation of postsynaptic 5-HT_{2A}, inducing synthesis and retrograde release of eCBs to activate CB_{1R} on presynaptic terminals, decreasing a long-term probability of GABA release. Both mechanisms of iLTD on L5 were fully blocked if we inhibited PKA with h89, we blocked post synaptic G coupled proteins with GDPβS, or we antagonized the receptors 5-HT_{1A} (WAY100635) and 5-HT_{2A} (MDL100907) together. Thus, our result shown that 5-HT exerts strong control on GABAergic transmission on PFC exhibiting specificity at anatomical, synaptic and receptor levels. These issues are part of cortical physiology and help to understand the neural basis of cognitive and neuropathological process.

INTRODUCCIÓN

La Corteza Prefrontal

Los circuitos corticales han sido propuestos como los responsables en procesar información sensorial, cognitiva y emocional (Curtis and D'Esposito, 2003; Douglas and Martin, 2004; Tononi and Koch, 2015). De los distintos tipos de cortezas, la corteza prefrontal (PFC) se ha asociado con la ejecución de procesos cognitivos complejos como la toma de decisiones y memoria de trabajo (Harris and Shepherd, 2015). Además, la PFC forma parte de múltiples circuitos cuya disfunción se ha asociado con diversos trastornos neuropsiquiátricos (Goto et al., 2010; Lesch and Waider, 2012; Ting and Feng, 2008; Tovote et al., 2015).

La organización de la PFC es similar a otras neocortezas, con una organización laminar determinada por la disposición de las neuronas glutamatérgicas, que constituyen aproximadamente el 80% del total de neuronas en la corteza (van Aerde and Feldmeyer, 2015; Harris and Shepherd, 2015; Vertes, 2004). La capa 2/3 (L2/3) de la PFC parece ser la de mayor integración y procesamiento neuronal, ya que posee la principal fuente de entradas sinápticas intertelencefálicas e interconexiones locales (van Aerde and Feldmeyer, 2015; Harris and Shepherd, 2015). Es interesante destacar que la transmisión inhibitoria en la PFC se establece gracias al control local generado por diversos tipos de interneuronas. Estas interneuronas no poseen una disposición laminar, cuya distribución y abundancia de los subtipos de interneuronas es diferente en cada capa de la PFC (Gupta et al., 2000; Perin et al., 2011; Rudy et al., 2011).

Para el correcto funcionamiento de circuitos centrales es esencial la función de interneuronas inhibitorias y la neuromodulación a la cual están sujetas (Bonansco and Fuenzalida, 2016; Miles, 2000). A diferencia de las neuronas glutamatérgicas de la PFC que se dividen en corticotalámicas (CT) en capa 5 (L5) e intertelencefálicas (IT) en L2/3, las interneuronas GABAérgicas corticales

continúan en discusión e investigación en cuanto al número de subtipos, puesto que hay clasificaciones morfológicas, bioquímicas y electrofisiológicas (Cauli et al., 2000; DeFelipe et al., 2013; Gupta et al., 2000; Rudy et al., 2011). El nivel de actividad de las interneuronas y la inhibición sináptica que ellas ejercen puede regular el nivel de despolarización y propagación de potenciales sinápticos controlando la ganancia funcional y la plasticidad de las sinapsis excitatorias cercanas (Kandel, 2012). Aunque en la PFC la inhibición está determinada por al menos 20 tipos de interneuronas GABAérgicas (Bartho, 2004; Gupta et al., 2000; Miles, 2000), las interneuronas de la PFC se pueden dividir neuroquímicamente en 3 grandes grupos, i.e. las que expresan parvalbúmina (PV+), o somatostatina (SOM+), o el receptor de serotonina (5-HT₃) (Rudy et al., 2011). Las interneuronas PV+ se caracterizan por presentar una alta frecuencia de disparo de potenciales de acción y una muy baja o nula acomodación (Armstrong and Soltesz, 2012; Cea del Rio et al., 2010). Estas interneuronas hacen sinapsis principalmente en el soma y el cono axónico de las neuronas piramidales (Armstrong and Soltesz, 2012; Bartos and Elgueta, 2012). A su vez, las interneuronas SOM+ se caracterizan por tener diversos patrones de disparo, entre los cuales destacan el disparo regular adaptativo, disparo de bajo umbral, ráfagas intrínsecas, y uno de los más distintivos es el disparo regular en ráfaga (Rudy et al., 2011). Este tipo de interneurona tiene la característica de realizar sinapsis en las dendritas de las neuronas piramidales (Chiu et al., 2013, 2018). Por último, dentro de las interneuronas 5-HT₃ existen varios subgrupos con características morfológicas y fisiológicas diferentes entre sí. Un subgrupo de interneuronas 5-HT₃ son aquellas que expresan colecistoquinina (CCK); estas se caracterizan por hacer sinapsis en el soma de la neurona piramidal y ser sensibles a endocannabinoides (eCBs) (Neu et al., 2007; del Pino et al., 2017; Rudy et al., 2011; Savanthrapadian et al., 2014). Otro subgrupo de interneuronas 5-HT₃ son aquellas que expresan péptido intestinal vasoactivo (VIP); estas interneuronas son la principal fuente de inhibición sobre otras interneuronas (Batista-Brito et al., 2017; Karnani et al., 2016). Esta diversidad de interneuronas permite que la modulación inhibitoria en la PFC pueda ocurrir por diversas vías de inducción y expresión de plasticidad sináptica (Ahumada et al., 2013; Kullmann et al., 2012; Wenner, 2011).

Plasticidad sináptica en la Corteza Prefrontal

Alteraciones en la fisiología de la PFC pueden desencadenar trastornos y alteraciones conductuales, similar a lo que ocurre en otras estructuras del SNC. En condiciones fisiológicas, el correcto balance entre la transmisión excitatoria e inhibitoria depende de la comunicación neuronal; cuando esta es mediante sinapsis químicas puede ser de tipo excitatoria o inhibitoria, dependiendo si acercan (excitación) o alejan (inhibición) el potencial de membrana de la célula al umbral de disparo de un potencial de acción. En el sistema nervioso central (SNC) adulto, el principal neurotransmisor excitatorio es glutamato y el inhibitorio es GABA (ácido gamma-aminobutírico), debido al tipo de conductancias que activan sus receptores (Buzsáki, 1984; Isaacson and Scanziani, 2011; Wenner, 2011). En la PFC, la transmisión excitatoria glutamatérgica es generada por las neuronas piramidales, mientras que la principal fuente de sinapsis inhibitoria es generada por interneuronas liberadoras del neurotransmisor GABA (Harris and Shepherd, 2015). El fenómeno de integración entre sinapsis excitatorias e inhibitorias que recibe una neurona determinará si esta puede o no disparar un potencial de acción (Stuart, 2012; Stuart and Sakmann, 1995; Stuart and Spruston, 2015). Por lo tanto, el balance entre las entradas sinápticas excitatorias e inhibitorias es fundamental para mantener la homeostasis en la PFC; este balance es conocido como balance excitación/inhibición (E/I) (Bean, 2007; Davis, 2006; Davis and Goodman, 1998; Feldman, 2009; Froemke, 2015). La plasticidad sináptica puede ser un factor fundamental en mantener o cambiar el balance E/I a través de cambios en la eficacia sináptica por factores presinápticos y/o postsinápticos (Abraham and Bear, 1996; Bonansco and Fuenzalida, 2016; Neves et al., 2008). Los factores presinápticos se pueden dividir en tres componentes: probabilidad de liberación, número de sitios de liberación de neurotransmisor y cantidad de neurotransmisor liberado por vesícula (Augustine and Kasai, 2007; Del Castillo and Katz, 1954; Katz, 1971). Dentro de los factores estudiados que regulan la eficacia presináptica, uno de los más estudiados es el calcio, el cual es capaz de regular el acoplamiento y fusión vesicular en el terminal presináptico (Jackman et al., 2016; Kandel, 2012; Yang and Calakos,

2013). Otra de las señalizaciones intracelulares implicada en la plasticidad a nivel presináptico ocurre vía proteína quinasa A (PKA), la cual por fosforilación de proteínas como RIM1 α genera cambios a largo plazo en la probabilidad de liberación. PKA puede ser activada o inhibida por diversas señalizaciones como la gama de receptores acoplados a proteína G_s o G_i (Chevalleyre et al., 2007; Schneggenburger and Rosenmund, 2015; Yang and Calakos, 2013). A nivel postsináptico, la eficacia sináptica depende del número de receptores activados, la probabilidad de apertura del canal y la corriente unitaria de cada receptor (Bear and Malenka, 1994; Manabe et al., 1992). Se ha descrito una gran cantidad de cascadas bioquímicas implicadas en plasticidad postsináptica, siendo la señalización por calcio y actividad de distintas proteínas quinasas las más estudiadas (Bear and Malenka, 1994; Fitzjohn and Collingridge, 2002; Hashimoto et al., 1996). Estos mecanismos de plasticidad sináptica se gatillan endógenamente por medio de neuromoduladores, los que actúan principalmente mediante la activación de dos grandes familias de receptores ionotrópicos y metabotrópicos. Los receptores inotrópicos son canales iónicos que generalmente pasan de un estado cerrado a abierto por la unión de un ligando (Ej.: neurotransmisor) cuyo flujo de iones desencadena cambios en el potencial de membrana y/o señalización intracelular que puede generar cambios en la eficacia sináptica. Por otra parte, los receptores metabotrópicos están acoplados a proteína G, que dependiendo del tipo de proteína G pueden activar distintas vías de señalización intracelular que modifican la fisiología neuronal (Celada et al., 2013; Swanson et al., 2005). Mediante estos mecanismos de señalización, destinos neuromoduladores (por ejemplo: 5-HT, GABA, glutamato, endocannabinoides, acetilcolina, dopamina, entre otros) en la PFC pueden cambiar la fisiología de la transmisión excitatoria e inhibitoria a nivel de neuronas, sinapsis y circuitos. Sin embargo, el rol que ejercen estos neuromoduladores en la transmisión sináptica inhibitoria y los mecanismos que subyacen estos procesos han sido menos estudiados que en la transmisión excitatoria en la PFC.

La transmisión serotoninérgica

La 5-HT es un neurotransmisor altamente conservado en el reino animal y que en mamíferos regula una gran serie de procesos fisiológicos, que van desde funciones vitales como la termorregulación, el sueño y el dolor, hasta procesos complejos como la memoria, aprendizaje y funciones cognitivas superiores como la memoria de trabajo, ansiedad e imaginación (Bardin, 2011; Ishiwata et al., 2004; Portas et al., 2000). No es sorprendente, por lo tanto, que disfunciones en la transmisión serotoninérgica han sido implicadas en alteraciones patológicas (Albert et al., 2014; Celada et al., 2013; Lesch and Waider, 2012; Puig and Gener, 2015). Muchas de las funciones cognitivas superiores que involucran directamente la PFC son reguladas por la 5-HT (Celada et al., 2001, 2013; Harris and Shepherd, 2015; Tovote et al., 2015). A nivel de circuitos neuronales, la activación de los receptores de 5-HT puede generar diversos cambios fisiológicos en la PFC, incluyendo modificaciones en la excitabilidad de interneuronas y neuronas piramidales, así como una disminución en las corrientes post sinápticas excitatorias e inhibitorias (Andrade, 1998; Andrade and Nicoll, 1987; Elliott et al., 2018; Zhong et al., 2008; Zhou and Hablitz, 1999). Si bien la activación de las fibras serotoninérgicas ocurre sobre sinapsis excitatorias e inhibitorias, en la PFC, las fibras serotoninérgicas inervan principalmente a las interneuronas GABAérgicas, lo que sugiere una mayor relevancia en la transmisión inhibitoria (Hornung and Celio, 1992; Smiley and Goldman-Rakic, 1996; Sun et al., 2019).

En el cerebro, la 5-HT ejerce su efecto activando a los 5HTR, la cual es liberada desde las fibras serotoninérgicas provenientes de los núcleos mediales y dorsales del *Rafe* ubicados en el tronco cerebral, inervando distintas áreas del cerebro como la PFC (Celada et al., 2013; Dembrow and Johnston, 2014; Hayashi et al., 2015). A la fecha, se han descrito 14 tipos de receptores para 5-HT dividiéndose en 7 familias: 5-HT₁ (5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E}, 5-HT_{1F}), 5-HT₂ (5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}), 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₅ (5-HT_{5A}, 5-HT_{5B}), 5-HT₆, y 5-HT₇ (Barnes and Sharp, 1999; Celada et al., 2013; Fink and Gothert, 2007; Naughton et al., 2000). Con la excepción del receptor 5-HT₃, que es de tipo ionotrópico permeable a cationes como Na⁺/K⁺/Ca²⁺, todos los demás receptores son metabotrópicos: las familias 5-HT₁ y 5-HT₅ están acopladas a proteína Gi/G_o que

inhibe la adenilato ciclasa; 5-HT₄, 5-HT₆, y 5-HT₇ están acoplados a proteína G_s que activa la adenilato ciclasa; el 5-HT₂ está acoplado a proteína G_q/G₁₁ la cual activa la fosfolipasa C (Figura 1) (Barnes and Neumaier, 2011; Barnes and Sharp, 1999). Aunque la distribución relativa de cada uno de los receptores para 5-HT es variable en las distintas zonas del cerebro, en la PFC los receptores más abundantes son los 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} y 5-HT₃. Los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A} se expresan tanto en neuronas piramidales como interneuronas, mientras que 5-HT₃ se expresa exclusivamente en interneuronas, entre las que se encuentran las VIP+ y CCK+ (Barnes and Neumaier, 2011; Fink and Gothert, 2007). Sin embargo, en un mismo circuito cortical la expresión de los receptores para 5-HT no es homogénea (Moreau et al., 2010). Por ejemplo, los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A} están expresados de manera diferencial en neuronal piramidales, mientras los 5-HT_{1A} se ubican mayoritariamente en el segmento inicial del axón y 5-HT_{2A} se expresa en el soma y dendrita de la célula piramidal (Cruz et al., 2004; Riad et al., 2000).

La fuerte relación que existe entre la transmisión serotoninérgica y la fisiología de procesos cognitivos y patologías psiquiátricas, ha despertado en la última década un gran interés en el campo de la medicina (Lesch and Waider, 2012; Murphy and Lesch, 2008; Naughton et al., 2000). En este sentido, gran parte de los fármacos utilizados en psiquiatría modifica la transmisión serotoninérgica, como antidepresivos, ansiolíticos y antipsicóticos (Blier and de Montigny, 1998; Murphy and Lesch, 2008; Naughton et al., 2000; Stahl, 1998). Por otra parte, algunas drogas de uso recreacional como la mescalina, éxtasis y LSD actúan alterando la transmisión serotoninérgica ya que son principalmente agonistas 5-HT_{1/2}, o sustratos del transportador de 5-HT (Béïque et al., 2007). Por lo tanto, comprender en detalle el rol que posee la 5-HT a nivel sináptico podría ayudar a entender no solo su rol fisiológico en el cerebro, sino que también contribuir a dilucidar las bases de trastornos, enfermedades mentales y la adicción.

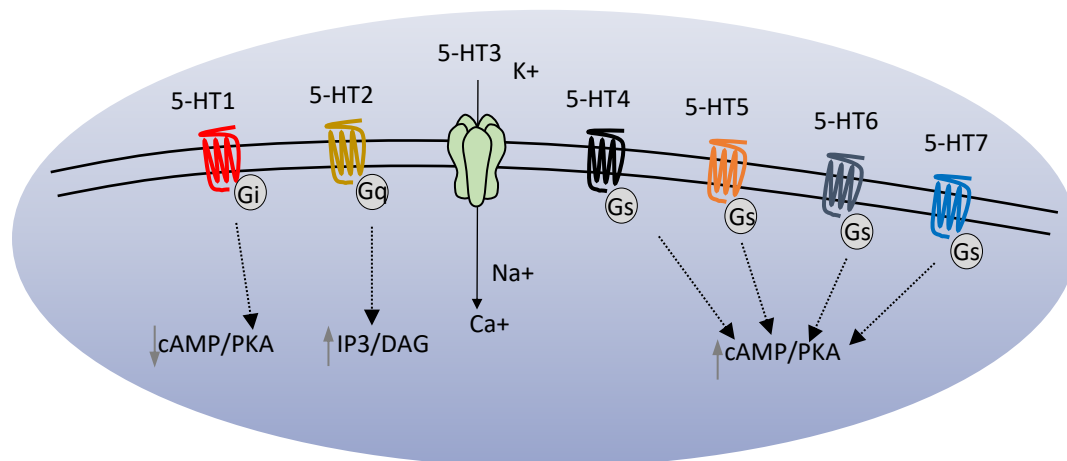


Figura 1. **Receptores serotoninérgicos en el SNC.**

Planteamiento del problema

Aunque se ha mostrado que la 5-HT puede cambiar el balance E/I en corteza cerebral, a la fecha, los mecanismos moleculares, sinápticos y circuitales que involucran la activación de las vías serotoninérgicas son poco conocidas. Dichos mecanismos pudiesen estar en la base de la etiopatogenia de trastornos conductuales en pacientes que sufren alguna enfermedad mental (Celada et al., 2001; Lesch and Waider, 2012; Moreau et al., 2010, 2013). En la PFC las aferencias sinápticas subcorticales van a las neuronas piramidales de L5, mientras que la mayoría de las sinapsis cortico-corticales se establecen en las neuronas piramidales de L2/3, donde funcionalmente se procesa la información proveniente de otras cortezas (Harris and Shepherd, 2015; Larkum et al., 1999; Zaitsev et al., 2012). Las neuronas de L2/3 además de proyectar y recibir sinapsis corticales, reciben directamente aferencias sinápticas serotoninérgicas del *rafe*, las que pueden modular procesos cognitivos dependientes de la PFC (Celada et al., 2013; Martín-Ruiz et al., 2001). Por parte de los subtipos de interneuronas, su distribución y abundancia es diferente en cada capa de la PFC, por lo que estas pudiesen responder de manera diferenciada a los distintos neuromoduladores (Gupta et al., 2000; Perin et al., 2011; Rudy et al., 2011).

El estudio detallado acerca de cómo la 5-HT es capaz de modular la transmisión sináptica inhibitoria en PFC pudiera ser clave para comprender los mecanismos que subyacen al balance E/I, y así dilucidar los mecanismos celulares, neuronales y sinápticos necesarios para aportar al

conocimiento de las bases neurofisiológicas del funcionamiento de la PFC en condiciones normales y patológicas. Al respecto, se ha descrito que la activación sostenida de 5-HT_R puede generar plasticidad sináptica excitatoria en PFC (Barre et al., 2016; Berthoux et al., 2019). En consecuencia, en esta tesis se busca determinar si la activación de los 5-HT_R es capaz de modular la eficacia sináptica GABAérgica en la PFC, abarcando tanto mecanismos de plasticidad como de especificidad de los circuitos sinápticos.

Hipótesis

“La eficacia sináptica GABAérgica es deprimida por la activación de receptores serotoninérgicos en la PFC”.

Objetivo general

Determinar si la activación de receptores para 5-HT induce depresión sináptica GABAérgica en neuronas piramidales de la PFC.

Objetivos Específicos:

- 1) Determinar si la activación de receptores serotoninérgicos modifica la eficacia de la transmisión GABAérgica en la PFC.
- 2) Determinar los subtipos de receptores serotoninérgicos implicados en la plasticidad de fibras GABAérgicas provenientes de L2/3.
- 3) Determinar los subtipos de receptores serotoninérgicos implicados en la plasticidad de fibras GABAérgicas provenientes de L5.

METODOLOGÍA

Para determinar el papel de 5-HT sobre la transmisión inhibitoria en la PFC, durante esta tesis se utilizó una combinación de herramientas electrofisiológicas, de optogenética y farmacológicas, utilizando como modelo rebanadas de PFC de ratón.

Animales

Se utilizaron ratones machos y hembras de la cepa C57BL/6J de 30 a 60 días postnatal. Los animales fueron decapitados y su cerebro expuesto por craneotomía; el encéfalo fue extraído rápidamente (<1min) y sumergido en líquido cefalorraquídeo artificial (LCA) a una temperatura inferior a 4°C. La composición del LCA en mM fue de: 124.00 NaCl, 2.69 KCl, 1.25 KH₂PO₄, 2.00 Mg₂SO₄, 26.00 NaHCO₃, 2.00 CaCl₂ y 10.00 Glucosa.

Una vez extraído el encéfalo, se le realizó un corte posterior y se fijó en el plano coronal-caudal a una cámara de corte con pegamento de cianocrilato, sumergido en el mismo LCA a 4°C, el cual se burbujeo constantemente con carbógeno (95 % O₂ – 5 % CO₂). En estas condiciones, se procedió a obtener cortes transversales de PFC con un espesor de 300 µm mediante un vibrátomo motorizado (Campden instruments, model MA752). Las rebanadas fueron traspasadas a una cámara de incubación y mantenidas entre 60 a 90 minutos en LCA a temperatura ambiente (23-25°C) con un pH estable (7.4) y burbujeado con carbógeno (95% O₂–5% CO₂), favoreciendo de esta manera la estabilización del metabolismo del tejido. Una vez incubadas, las rebanadas se transfirieron a una cámara de registro adaptada con un microscopio (NIKON, modelo Eclipse FN1). El sistema se encuentra sobre una mesa antivibratoria para permitir la obtención de registros estables a largo plazo, impidiendo la transmisión de vibraciones ambientales a la

preparación. La transmisión de artefactos eléctricos externos al registro es evitada con la disposición del sistema de registro al interior de una jaula de Faraday. Las rebanadas se perfundieron con LCA a temperatura ambiente, con un flujo ~ 1 ml/min, de forma que el recambio completo de LCA en la cámara de registro ocurre aproximadamente cada 5 minutos.

Para los registros, se utilizó un LCA con composición iónica idéntica a la que se utilizó durante la incubación, más la adición de los siguientes fármacos: APV (50 μ M) y CNQX (40 μ M), para bloquear los receptores inotrópicos de glutamato AMPA y NMDA, respectivamente, y así aislar farmacológicamente la transmisión inhibitoria. Por otra parte, la composición (en mM) de las soluciones intracelulares que se utilizaron en la pipeta de registro fueron:

- 1) Gluc_Cs: 100 Cs-Gluconato, 10 HEPES, 10 EGTA, 4 Na₂-ATP, 10 TEA-Cl and 1 MgC₂26H₂O.
- 2) GDP β S: 100 Cs-Gluconato, 10 HEPES, 10 EGTA, 4 Na₂-ATP, 10 TEA-Cl and 1 MgC₂26H₂O, 2 GDP β S.
- 3) MeSO₄: 135 KMeSO₄, 10 KCl, 10 HEPES-K, NaCl, 5 (Mg)-ATP y 0.4 (Na)-GTP

Con pH ajustado a 7.3 con CsOH o KOH y osmolaridad entre 280–290 mOsm.

Registros electrofisiológicos

Los registros electrofisiológicos se obtuvieron mediante la técnica de patch-clamp en su configuración de célula entera. En la modalidad de fijación de voltaje se registraron las corrientes postsinápticas inhibitorias (IPSCs).

Registros de Patch-clamp

Se utilizó la técnica de Patch-Clamp, en la cual se identifica la célula piramidal por la forma piramidal y prominente dendrita apical en la L2/3 bajo la observación en microscopio. Las pipetas de registros utilizadas consistieron de un alambre de plata clorurada (Ag/AgCl) incluido en una

micropipeta de vidrio/borosilicato (diámetro externo-interno: 1.5-0.84mm) con capilar interno. Las pipetas se fabricaron con un estirador de pipetas (Sutter Instrument Co., P-97) y rellenas con la solución intracelular (ver soluciones de registro). La resistencia de las pipetas fue en un rango de 4-6 M Ω . Los electrodos en la pipeta de registro fueron conectados a un amplificador EPC-7 (HEKA Instruments) o PC-ONE (DAGAN Corporation).

En fijación de voltaje o corriente, las neuronas fueron aceptadas sólo cuando la resistencia del sello era menor a 1G Ω y la resistencia de acceso no cambie más de un 20% durante el experimento. Los registros en fijación de voltaje fueron filtrados a 3 KHz y muestreados entre 5 y 10 KHz, a través de un conversor análogo-digital (ITC-16; Intrutech) y guardados con el software *Pulse FIT* (Heka Instruments); o muestreados a 20 KHz, a través de un conversor análogo-digital (Digidata 1440^a, Molecular Devices, Chicago, IL. USA) y guardados con el software Clampex 10.4 (Molecular Devices, Chicago, IL. USA). Como electrodo de referencia, se utilizó un electrodo epoxy relleno de KCl y con una resistencia de 2.7 K Ω (World Precision Instruments, Inc.).

El montaje experimental consistió en el registro en fijación de voltaje de células piramidales L2/3 en mPFC, en donde se registraron corrientes postsinápticas inhibitorias evocadas (eIPSC) por estimulación de las fibras GABAérgicas por una pipeta septada con LCA con un ánodo y cátodo en cada compartimento de la pipeta. Se utilizaron 2 de estos sistemas de estimulación por pipeta septada, uno ubicado en L2/3 (Figura 1A) y en paralelo una pipeta septada ubicado en L5 (Figura 10A), para registrar las eIPSC provenientes de dos capas diferentes en PFC. Para los registros en fijación de corriente, se registraron los potenciales post sinápticos espontáneos (sPSP) al potencial de membrana de la célula en LCA.

Protocolo de pulsos pareados

Este protocolo consiste en estimular mediante 2 pulsos eléctricos, separados por 100ms, en las interneuronas GABAérgicas registrando a 0 mV, potencial de reversión para la sinapsis excitatoria, además del bloqueo de los receptores ionotrópicos de glutamato con APV y CNQX

para registrar la transmisión inhibitoria. Las sinapsis GABAérgicas tienen una alta probabilidad de liberación presentan un fenómeno denominado depresión por pulsos pareados, donde la segunda respuesta es de menor amplitud que la primera. Con el fin de estudiar si los cambios en la amplitud de las IPSCs son de origen pre o postsinápticos se calculó la razón de pulsos pareados (PPR) mediante la siguiente fórmula: $PPR = R2/R1$, donde R1 y R2 son los picos de amplitud de la primera y segunda corriente, respectivamente (Debanne et al., 1996; Zucker and Regehr, 2002).

Coefficiente de variación

Este es otro método complementario, para estimar si la plasticidad sináptica se expresa a nivel pre o postsináptico, es el coeficiente de variación libre de ruido (CV_{NF}) de las eIPSC el que se calcula respecto a la condición basal mediante la fórmula:

$$CV_{NF} = \sqrt{\frac{\partial_{IPSC}^2 - \partial_{Ruido}^2}{m}}$$

Donde ∂_{IPSC}^2 es la desviación estándar entre los picos de R1, ∂_{Ruido}^2 es la desviación estándar de la línea base y m es el promedio de las amplitudes máximas de las eIPSC. Una vez calculado el CV_{NF} , se obtiene la razón entre CV_{NF} de la situación basal y el CV_{NF} después de inducir plasticidad (CVR) para cada una de las células que se registrarán. Si el CVR es diferente de 1, indica que los cambios en la eficacia sináptica mediados presinápticos, y si son iguales (o similares) a 1 significa que el fenómeno se expresa a nivel postsináptico. Para la construcción de la gráfica utilizaremos los cambios en la variación de las amplitudes de las respuestas (expresado como $1/CV^2$) que se obtendrá de las células registradas después inducir plasticidad, y normalizadas a sus respectivas líneas bases. El valor de $1/CV^2$ se graficó en función de las amplitudes de las eIPSC normalizadas con los respectivos controles (M). Si los valores de esta gráfica siguen una línea diagonal sobre o bajo 1, significa que el efecto sobre la eficacia sináptica (potenciación o depresión, respectivamente) se expresa a nivel presináptico. Esta correlación lineal se calcula

mediante el “Coeficiente de correlación de Pearson” (r). Para conocer si la regresión lineal es significativa se realizó una prueba ANOVA, cuyos valores (p) menores a 0.05 fueron considerados como significativos. Este método requiere que las eIPSC presenten una distribución binomial, de esta forma la varianza sináptica refleja la probabilidad de liberación de neurotransmisor (varianza cuantil) (Bekkers y Stevens 1990; Malinow y Tsien, 1990; de Sevilla et al., 2002).

Corrientes inhibitorias independiente de potenciales de acción (mIPSC)

Para determinar si un fenómeno es independiente de cambios en la excitabilidad neuronal o disparo de potenciales de acción, se registraron las corrientes inhibitorias independientes de potenciales de acción utilizando tetrodoxina en el baño (TTX, 500nM), un bloqueador de los canales de Na^+ voltaje-dependientes, para evitar la interferencia de los potenciales de acción. En estas condiciones, se registraron corrientes postsinápticas inhibitorias independientes de actividad neuronal e insensibles a TTX, denominadas IPSCs en miniatura o “mini” IPSCs (mIPSCs). Cambios en la frecuencia de las mIPSC sugieren que un fenómeno es expresado presinápticamente, ya sea como una modificación en la probabilidad de liberación del neurotransmisor y/o un aumento en el número de sitios de liberación del neurotransmisor, es decir a nivel presináptico. Por otra parte, cambia la amplitud de las mIPSC se sugiere que el fenómeno es expresado a nivel postsináptico, ya sea por cambios en el número y/o en la conductancia de los receptores.

Farmacología

Farmacología aplicada en perfusión en LCA: APV 50 μM (Antagonista de receptores NMDA); CNQX 40 μM (Antagonista de receptores AMPA y kainato); AM251 20 μM (Agonista inverso de receptores CB1); 5-HT 50 μM (Agonista endógeno de 5-HT_R); CGP 5 μM (Antagonista de receptores GABA_B); H89 10 μM (Inhibidor de la proteína quinasa A); WIN 5 μM (Agonista de receptores CB1); DAMGO 1 μM (Agonista de receptores μ opioide); Tetrodotoxina [TTX] 500 nM (Bloqueador de canales de Na^+ dependientes de voltaje); WAY100635 1 μM (Antagonista silente

de receptores 5-HT_{1A}); MDL100907 200 nM (Antagonista de receptores 5-HT_{2A}); MDL72222 1 μM (Antagonista de receptores 5-HT₃)

Farmacología aplicada como bolo en la cámara de registro: 5-HT 50 μM (Agonista endógeno de 5-HT_R); 8-Hydroxy-DPAT hydrobromide [8-OH-DPAT] 10 μM (Agonista de receptores 5-HT_{1A}); TCB-2 10 μM (Agonista de receptores 5-HT_{2A}); 1-Phenylbiguanide [PBG] 1 μM (Agonista de receptores 5-HT₃).

Optogenética

Se utilizaron ratones de la línea B6;129P2-*Pvalb*^{tm1(cre)Arbr/J} que expresan selectivamente Cre recombinasa en neuronas PV+. Para la inserción específica de la rodopsina ChR2 en los estudios optofisiológicos se utilizó un virus adeno asociado (AAV) que contiene el vector *loxP*-flanqueado (floxed) abierto doble invertido (DIO) el cual codifica un marco de lectura para ChrimsonR-tdT (AAV5-hSyn-FLEX-ChrimsonR-tdT). En presencia de Cre recombinasa, el casete ChrimsonR-tdT es invertido, expresando ChrimsonR y la proteína fluorescente tdT. De esta forma, las neuronas que expresen Cre podrán estimularse optofisiológicamente y podrán ser identificadas mediante microscopia de fluorescencia.

Los ratones (30 días post natal) fueron sujetos a cirugía esterotáctica, anestesiados con ketamina (1.1 mg/kg), y se inyectó 1 μL de solución viral (AAV5-hSyn-FLEX-ChrimsonR-tdT, 2x10¹² partículas virales/ ml) aplicada con una pipeta de vidrio en PFC prelímbica (PL) a 0.1 μL/min. Las coordenadas de la inyección en PFC fueron de: AP -2 mm, ML ±0.2 mm, DV -1.5 mm (respecto a la duramadre). La obtención de rebanadas fue entre 1 y 3 semanas post-inyección para los estudios optofisiológicos y electrofisiológicos. Para estimular selectivamente las interneuronas PV+, se iluminó la rebanada de mPFC por fibra óptica (apertura numérica (NA) = 0.22) conectada por diodo a un led de 473-nm (Máximo, 10 mW; ThorLab). Los pulsos del láser fueron de 1 ms para generar eIPSC (Kodandaramaiah et al., 2012; Taniguchi et al., 2011).

Análisis

El análisis de los registros se realizó con el programa Clampfit perteneciente al conjunto de programas pCLAMP 10.7 (Molecular Device, Chicago, IL. USA). Para el análisis estadístico y la representación de las gráficas se utilizó el software computacional Origin (versión 9.0, Origin Lab Corp, MA, USA). Se realizó una prueba de normalidad a los datos mediante el uso de la prueba de Shapiro–Wilk; el análisis estadístico fue la prueba t (t-student) de dos colas, considerándose como diferencias estadísticamente significativas los resultados con $P < 0.05$.

Número de animales y Bioética

El número de experimentos (n) fue de 144 y se utilizaron 74 animales.

Para todos los procedimientos en que se utilizaron animales se siguió la guía de “Animal care standards outlined in the National Institute of Health (USA)” y los protocolos fueron aprobados por el comité de bioética de la Universidad de Valparaíso. Se realizaron esfuerzos por utilizar el menor número de animales y minimizar el sufrimiento.

RESULTADOS

Como aproximación inicial, debido a la diversidad de interneuronas GABAérgicas y 5-HT_R en la PFC y su distribución específica, monitoreamos el potencial de membrana de una neurona piramidal de L2/3 durante la perfusión de 5-HT (50 µM). En estas condiciones, observamos que 5-HT generó una hiperpolarización del potencial de membrana (de -70mV a -73mV) (Figura 2A). En otro set de experimentos, pero ahora en fijación de voltaje (-70mV), observamos que la corriente de mantención (holding) cambió en 30 pA (Figura 2B). Nuestros experimentos indican que la 5-HT activa conductancias de potasio que cambian el potencial de membrana neuronal, de manera análoga a lo demostrado anteriormente (Araneda and Andrade, 1991; Elliott et al., 2018; Villalobos et al., 2005). Por lo tanto, en este trabajo nos enfocamos en entender los mecanismos sinápticos que gatilla la 5-HT en la transmisión GABAérgica. Para ello, realizamos registros electrofisiológicos en neuronas piramidales de L2/3 y monitoreamos las eIPSC provenientes de dos zonas de la PFC de manera conjunta, para así evaluar el efecto de la 5-HT sobre dichas entradas sinápticas. Por una parte, registramos las eIPSC provenientes de L2/3, misma capa en la que registramos la neurona piramidal. En paralelo, registramos las eIPSC provenientes de L5 que hacen sinapsis sobre la neurona piramidal de L2/3. De esta forma, pudimos registrar el efecto que genera la 5-HT sobre dos entradas sinápticas de manera conjunta. En esta primera parte de presentación de resultados abordaremos en detalle el efecto que tiene la 5-HT sobre la transmisión GABAérgica proveniente de L2/3 en la PFC, mientras que en la segunda parte abordaremos su efecto sobre la transmisión GABAérgica proveniente de L5.

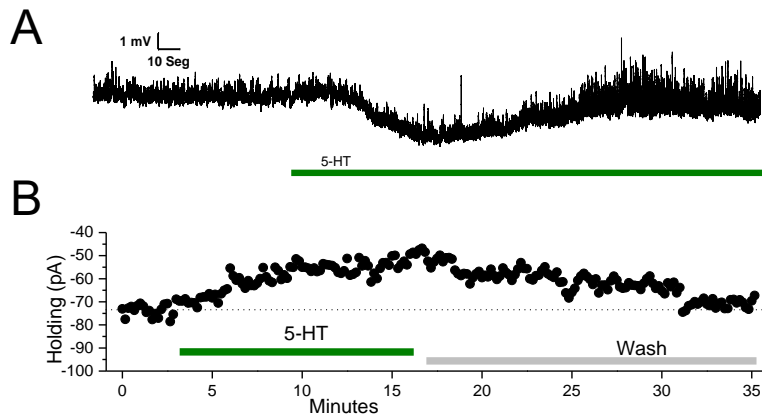


Figura 2. **5-HT activa conductancias de potasio en neuronas piramidales de L2/3.** **A**, se muestra un trazo representativo potenciales postsinápticos espontáneos (sPSP) durante la aplicación de 5-HT. **B**, se muestran las corrientes de mantención (holding) de potencial a -70mV durante la perfusión de 5-HT (50 μ M) y posterior lavado.

La 5-HT en la transmisión sináptica inhibitoria proveniente de L2/3

Con el fin de evaluar si la activación de 5-HT_R genera plasticidad sináptica inhibitoria en la PFC, se registraron eIPSC en las neuronas piramidales de L2/3, estimulando las fibras inhibitorias bajo el bloqueo de la transmisión ionotrópica glutamatérgica por APV (50 μ M) y CNQX (40 μ M) (Figura 3A). Luego de obtener un registro basal de 10 minutos de las eIPSC, se agregó 5-HT (50 μ M), la que generó una depresión a largo plazo de las eIPSC (iLTD) [64.4% \pm 5.14, $p = 0.002$, $n = 11$] (Figura 3B), la cual estuvo acompañada por cambios con una correlación lineal en el coeficiente de variación (CV) de las respuestas sinápticas [$r = 0.732$, $p = 0.007$, $n = 11$], sugiriendo que 5-HT induce una iLTD de origen presináptica. Adicionalmente, observamos que esta iLTD presentó un aumento significativo en la razón de pulsos pareados [de 0.64 ± 0.061 a 0.84 ± 0.044 , $p = 0.029$, $n = 10$], lo que nos sugiere, en conjunto con el CV, que dicha iLTD es producto de una disminución en la probabilidad de liberación de GABA (Figura 3C).

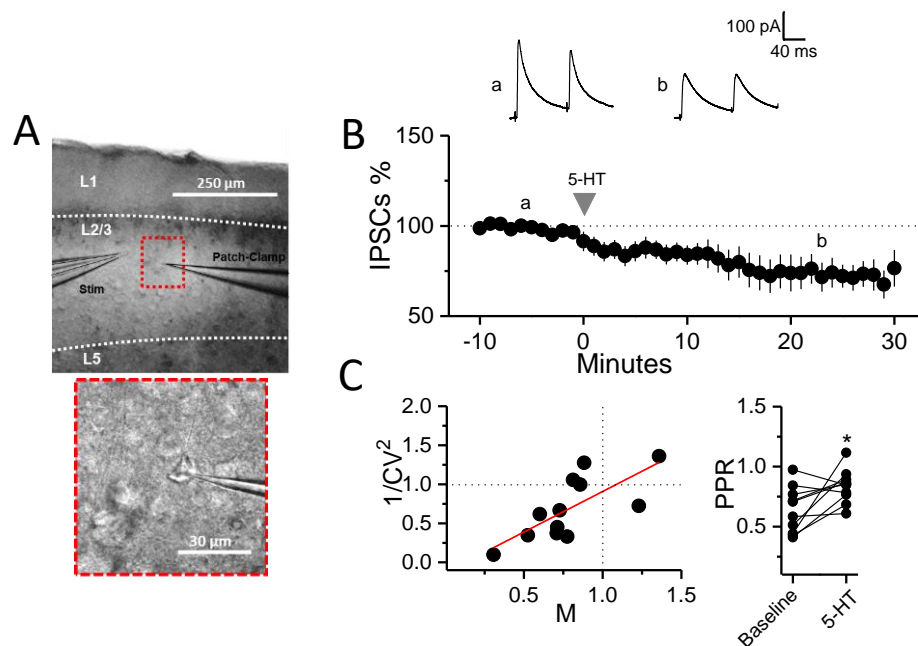


Figura 3. **5-HT induce una iLTD sobre fibras GABAérgicas de L2/3.** **A** (arriba), fotografía con objetivo 10X del arreglo experimental, se muestra la posición los electrodos de estimulación (izquierda) y registro (derecha). **A** (abajo), fotografía con objetivo 40X de una neurona piramidal de L2/3. **B** (arriba), trazos representativos de las eIPSC antes (izquierda) y 25 minutos después de aplicar 5-HT (derecha). **B** (abajo), se muestra el curso temporal de los cambios en amplitud de las eIPSC por aplicación de 5-HT. **C** (izquierda), Gráfico de $1/CV^2$ en función de las amplitudes de las eIPSC luego de aplicación de 5-HT normalizadas con su línea base (M) (ver materiales y métodos). **C** (derecha), razón de pulsos pareados antes y de después de aplicar 5-HT. * ($p > 0.05$).

5-HT induce una iLTD sobre los terminales presinápticos de interneuronas CB1+

Considerando la gran variedad de interneuronas en PFC, realizamos inicialmente una disección farmacológica para separar dos grupos de interneuronas. El primer grupo que se aisló farmacológicamente fueron las interneuronas CB1+, las cuales son sensibles la señalización del sistema de endocannabinoides (eCBs). Se activó exógenamente el receptor CB1 (CB1_R) de estas interneuronas mediante el agonista específico WIN (5 μ M) perfundido en el baño. Bajo esta

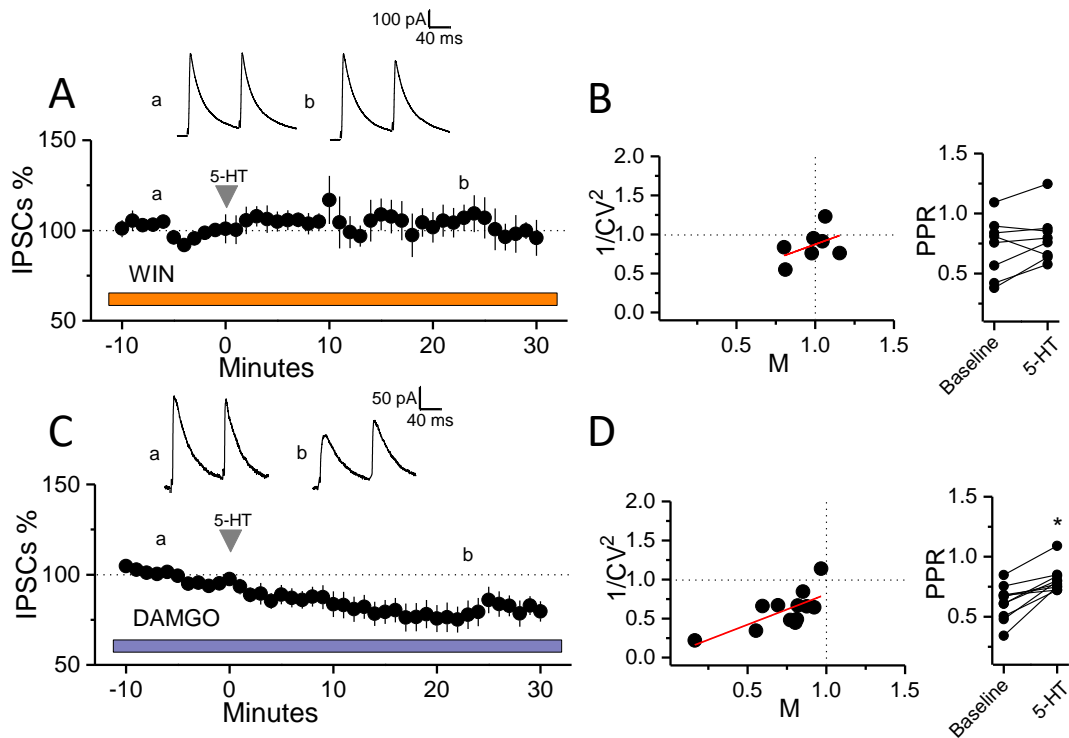


Figura 4. La iLTD por 5-HT ocurre sobre entradas sinápticas CB1+. A y B se utilizó un agonista CB1_R (WIN) perfundido en el baño. A (arriba), se muestran los trazos representativos de eIPSC antes (izquierda) y 25 minutos después de aplicar 5-HT (derecha). A (abajo), se muestra el curso temporal de los cambios en amplitud de las eIPSC por aplicación de 5-HT. B (izquierda), Gráfico de 1/CV² en función de las amplitudes de las eIPSC luego de aplicación de 5-HT normalizadas con su línea base (M). C (derecha), razón de pulsos pareados antes y de después de aplicar 5-HT. C y D se utiliza un agonista de receptores μ opioide (DAMGO) perfundido en el baño. * ($p > 0.05$).

condición la liberación de GABA proveniente de terminales sinápticos que expresan CB1_R será suprimida (Chevalleyre and Castillo, 2004; Chiu et al., 2010). En presencia de WIN, 5-HT fue incapaz de generar iLTD [$101.75\% \pm 8.48$, $p = 0.44$, $n = 7$] (Figura 4A). Además, no se observaron cambios en la PPR [de 0.74 ± 0.097 a 0.80 ± 0.085 , $p = 0.24$, $n = 7$], ni una correlación en el CV [$r = 0.45$, $p = 0.305$, $n = 8$] (Figura 4B). La segunda aproximación farmacológica estuvo enfocada en estudiar las interneuronas que expresan el receptor μ opioide. Estudios funcionales y de inmunomarcaje sugieren que las interneuronas que expresan el receptor μ no expresan CB1_R (Glickfeld et al., 2008; Nugent et al., 2007). De esta manera, activando los receptores μ opioide,

podemos disminuir la liberación de GABA proveniente específicamente de interneuronas que expresan dicho receptor, y que según estudios previos corresponden a las interneuronas PV+ en la PFC (Glickfeld et al., 2008; Nugent et al., 2007). Así, utilizando el agonista del receptor μ opioide DAMGO (1 μ M) durante el experimento, observamos que la contribución de las fibras GABAérgicas $\mu+$ es muy escasa en comparación con las CB1+, ya que la aplicación de 5-HT generó una robusta iLTD [$75.67\% \pm 7.53$, $p = 0.041$, $n = 13$] (Figura 4C). Por lo tanto, la iLTD por 5-HT parece ser exclusivamente debido al efecto en la probabilidad de liberación de las interneuronas CB1+, ya que la aplicación de 5-HT en una condición en que se suprime la liberación de GABA de las interneuronas $\mu+$ por DAMGO se observan cambios en la PPR [de 0.62 ± 0.047 a 0.78 ± 0.043 , $p = 0.0026$, $n = 12$] y una correlación en el CV [$r = 0.71$, $p = 0.01$, $n = 12$] (Figura 4D). Un grupo mayoritario que expresa el receptor μ opioide, son las interneuronas PV+ (Glickfeld et al., 2008; Nugent et al., 2007). Por lo tanto, para descartar la participación de interneuronas PV+ en la iLTD por 5-HT, realizamos experimentos de optogenética, estimulando específicamente las interneuronas PV que expresan CHR2 mediante un led de luz azul. Con esta técnica, se registraron las eIPSC causadas por la liberación GABA exclusivamente de las interneuronas PV (eIPSC_{PV}). Al aplicar 5-HT al baño, las eIPSC_{PV} no disminuyeron su amplitud, por lo que no se observó la iLTD [$94.5\% \pm 13.9$, $p = 0.91$, $n = 2$] (Figura 5). Eso nos indica que la iLTD que induce 5-HT en L2/3 parece expresarse exclusivamente en interneuronas CB1+ y no en interneuronas PV+.

La iLTD requiere la activación simultánea de 5-HT_{2A} y 5-HT₃

Una gran diversidad de 5-HT_R están expresados en PFC, los que podrían mediar la iLTD observada en L2/3. Al respecto los tres 5-HT_R más expresados en la PFC son los receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} y 5-HT₃ (Aznar et al., 2003; Celada et al., 2013; Jakab and Goldman-Rakic, 2000; Puig and Gullledge, 2011; Riad et al., 2000), los cuales podrían modular mediante distintos mecanismos la transmisión sináptica inhibitoria ya que están expresados tanto en interneuronas GABAérgicas y neuronas piramidales en la PFC. Por lo tanto, se utilizó farmacología específica

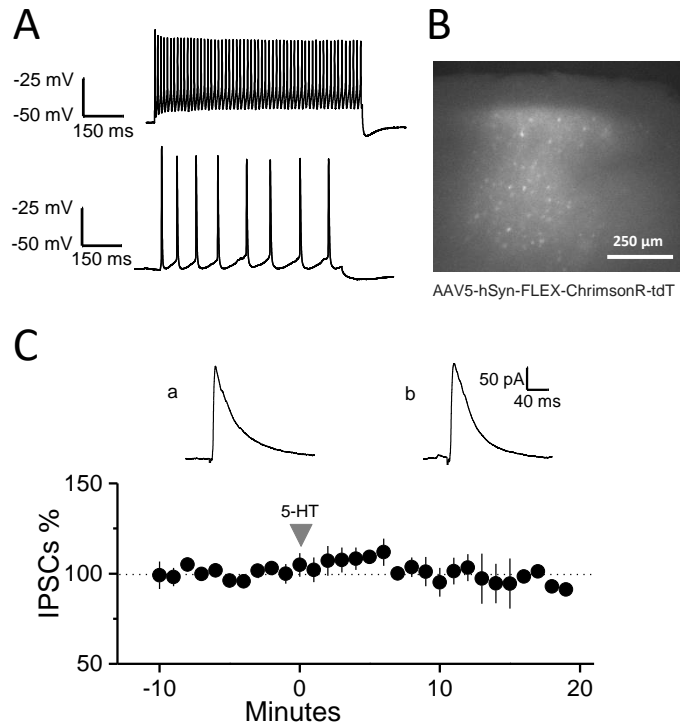


Figura 5. **5-HT no modifica la eficacia sináptica de los terminales GABAérgicos de interneuronas PV+.** **A** (arriba), Patrón de disparo de potenciales de acción una interneurona PV+. **A** (abajo), patrón de disparo de potenciales de acción de una neurona piramidal de L2/3. **B**, rebanada de PFC de un ratón PV-Cre 3 semanas después de inyectar AAV5-hSyn-FLEX-ChrimsonR-tdT. En fluorescencia se observan las interneuronas PV+. **C** (arriba), se muestran los trazos representativos de corrientes postsinápticas evocadas optofisiológicamente de interneuronas PV+ (eIPSC_{PV}) antes y después de la aplicación de 5-HT. **C** (abajo), se muestra el curso temporal de los cambios en amplitud de las eIPSC_{PV} por aplicación de 5-HT.

para cada uno de estos receptores para así evaluar su contribución particular en la iLTD. El receptor 5-HT_{1A}, al estar acoplado a proteína G_i y expresado en terminales GABAérgicos, podría disminuir la probabilidad de liberación de GABA por la señalización vía disminución de cAMP (Azmitia et al., 1996; Aznar et al., 2003). Por lo tanto, para determinar su contribución, se utilizó el antagonista específico WAY100635 (5 μM) en el baño; en esta condición farmacológica la aplicación de 5-HT sí generó la iLTD [86.8% ± 8.35, p = 0.023, n = 5] (Figura 6A). Por otra parte, para activar selectivamente el receptor 5-HT_{1A}, se aplicó el agonista específico 8-OH-DPAT (10

μM) directamente en la cámara de registro; y observamos que la amplitud de las eIPSC no disminuyó luego de la aplicación [$100.3\% \pm 12.95$, $p = 0.91$, $n = 5$] (Figura 6A). Por lo tanto, la activación de 5-HT_{1A} parece no estar involucrado en el mecanismo de iLTD inducido por 5-HT. Por otra parte, evaluamos si el receptor 5-HT_{2A} tiene participación en la inducción de la iLTD, ya que al estar acoplado a proteína G_s , puede generar señalización por calcio y así modificar la eficacia sináptica (Fink and Gothert, 2007; Parrish and Nichols, 2006). Para evaluar el posible rol de 5-HT_{2A} en la iLTD, se utilizó el antagonista específico para 5-HT_{2A} MDL100907 (200 nM) en el baño. En esta condición farmacológica, la aplicación de 5-HT no indujo iLTD [$114.0\% \pm 15.12$, p

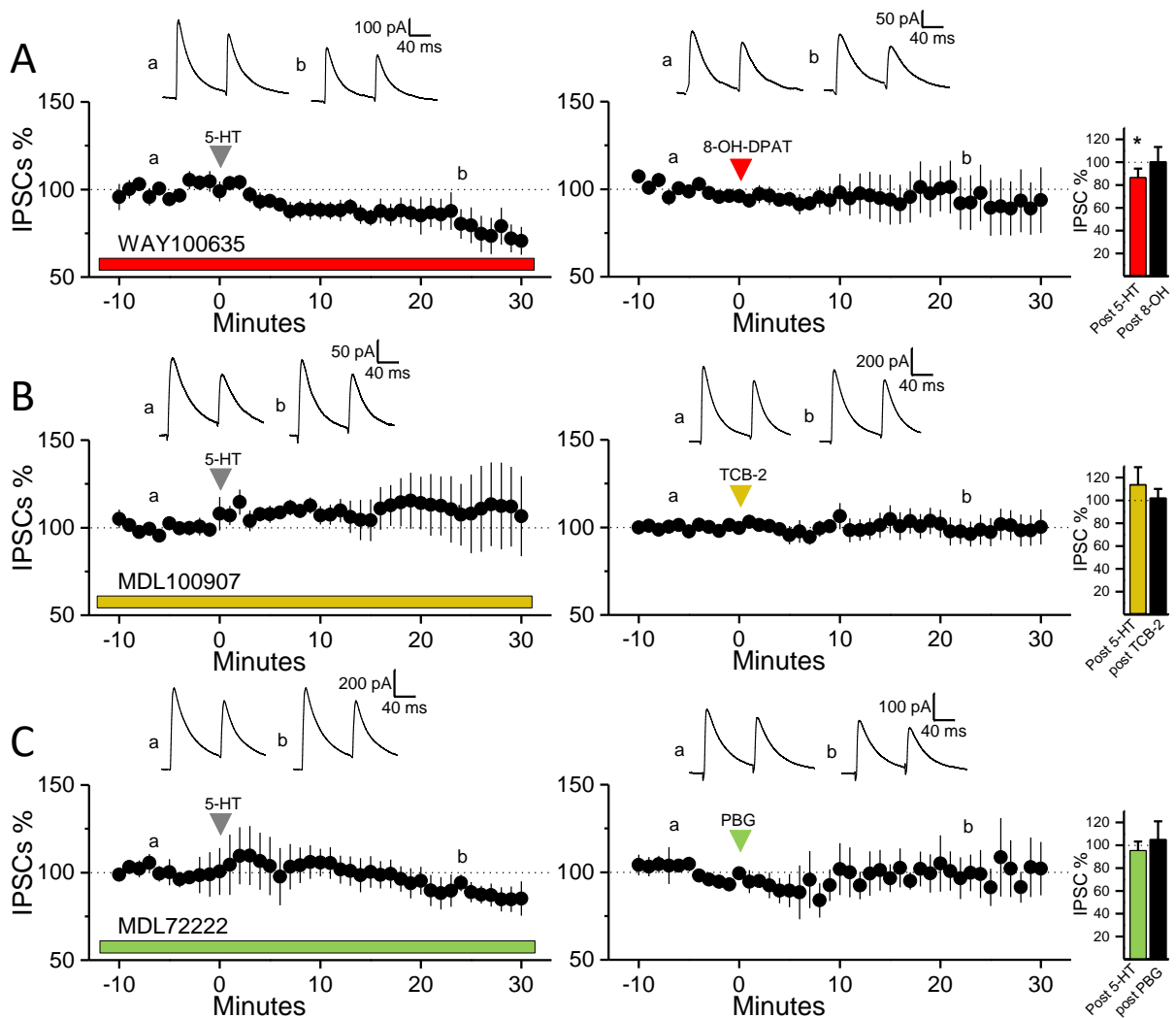


Figura 6. **La activación de los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT₃ son necesarios en la inducción de la iLTD.** **A** (izquierda), se muestran trazos representativos y el curso temporal de las eIPSC por aplicación de 5-HT utilizando un antagonista de 5-HT_{1A} (WAY100635) perfundido en el baño. **A** (medio), se muestran trazos representativos y el curso temporal de las eIPSC por aplicación de un agonista de 5-HT_{1A} (8-OH-DPAT). **A** (derecha), grafico de barra que muestra en porcentaje los cambios de las eIPSC a 20 minutos de la aplicación de 5-HT bajo WAY100635 y 8-OH-DPAT respectivamente. **B** (izquierda), se muestran trazos representativos y el curso temporal de las eIPSC por aplicación de 5-HT utilizando un antagonista de 5-HT_{2A} (MDL100907) perfundido en el baño. **B** (medio), se muestran trazos representativos y el curso temporal de las eIPSC por aplicación de un agonista de 5-HT_{2A} (TCB-2). **B** (derecha), grafico de barra que muestra en porcentaje los cambios de las eIPSC a 20 minutos de la aplicación de 5-HT bajo MDL100907 y TCB-2 respectivamente. **C** (izquierda), se muestran trazos representativos y el curso temporal de las eIPSC por aplicación de la 5-HT utilizando un antagonista de 5-HT₃ (MDL72222) perfundido en el baño. **B** (medio), se muestran trazos representativos y el curso temporal de las eIPSC por aplicación de un agonista de 5-HT₃ (PGB). **B** (derecha), grafico de barra que muestra en porcentaje los cambios de las eIPSC a 20 minutos de la aplicación de la 5-HT bajo MDL72222 y PGB respectivamente. * (p>0.05).

= 0.56, n = 6] (Figura 6B). Este resultado nos sugiere que el receptor 5-HT_{2A} se requiere en la inducción de la iLTD. Para evaluar si la iLTD puede ser inducida únicamente por la activación de 5-HT_{2A}, se utilizó el agonista específico TCB-2 (10 μM), el cual no generó cambios en la amplitud de las eIPSC [102.1% ± 7.99, p = 0.63, n = 9] (Figura 6B). Por lo tanto, activar el receptor 5-HT_{2A} de manera de forma aislada mediante farmacología específica no logra inducir la iLTD. Colectivamente, estos resultados indican que la activación del receptor 5-HT_{2A} parece ser necesaria, pero no suficiente, para inducir la iLTD. El tercer 5-HT_R más abundante en PFC es el 5-HT₃, el cual se expresa específicamente en interneuronas, incluyendo las interneuronas CB1+. Por lo que evaluamos si la activación de los receptores 5-HT₃ contribuye a la iLTD en PFC. Realizamos el bloqueo del receptor 5-HT₃ utilizando el antagonista específico MD72222 (1 μM) en el baño. En esta condición, la aplicación de 5-HT no indujo iLTD [95.3% ± 7.90, p = 0.76, n = 4] (Figura 6C). Además, se evaluó el efecto de la activación selectiva de 5-HT₃ con el agonista específico PBG (20 μM), no observándose cambios significativos en la amplitud de las eIPSC [105.0% ± 16.10, p = 0.99, n = 4] (Figura 6C). Por lo tanto, activar únicamente el receptor 5-HT₃

parece ser no suficiente para inducir la iLTD. Estos resultados nos sugieren que para generar la iLTD deben ser activados conjuntamente los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT₃. Para demostrar esto, se agregó simultáneamente TCB-2 y PBG, observándose una disminución significativa en la amplitud de las eIPSC [62.8% ± 8.52, p = 0.029, n = 5] (Figura 7A), una tendencia en el CV [r = 0.59, p = 0.41, n = 4] (Figura 7B) y un aumento significativo en la PPR [de 0.57 ± 0.039 a 0.71 ± 0.063, p = 0.030, n = 5] (Figura 7C). Por lo tanto, la activación simultánea de los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT₃ es requerida para la inducción de iLTD por 5-HT.

5-HT_{2A} genera la activación de CB1_R del terminal presináptico

Si bien el receptor 5-HT₃ está descrito como específico de interneuronas, el receptor 5-HT_{2A} responsable de la iLTD podría activarse tanto en el terminal presináptico GABAérgico como en la neurona piramidal postsináptica (Barnes and Neumaier, 2011; Barnes and Sharp, 1999; Fink and Gothert, 2007). Por ello, para conocer la ubicación sináptica de los 5-HT_R que inducen la iLTD, se bloqueó río abajo la cascada de receptores metabotrópicos postsinápticos utilizando un

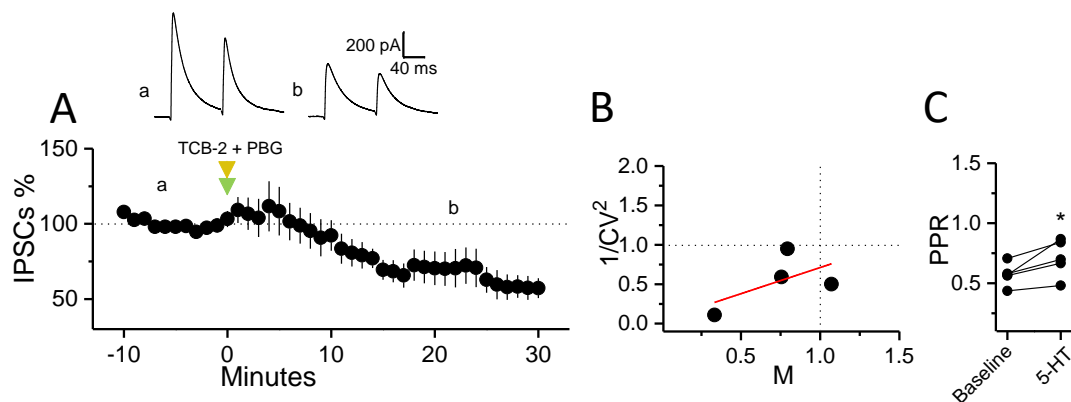


Figura 7. **La activación simultánea de 5-HT_{2A} y 5-HT₃ inducen la iLTD.** **A** (arriba), trazos representativos de las eIPSC antes (izquierda) y 25 minutos después de aplicar simultáneamente TCB-2 y PGB (derecha). **A** (abajo), se muestra el curso temporal de los cambios en amplitud de las eIPSC por aplicación simultánea de TCB-2 y PGB. **B**, Gráfico de 1/CV² en función de las amplitudes de las eIPSC luego de aplicación simultánea de TCB-2 y PGB normalizadas con su línea base (M) (ver materiales y métodos). **C**, razón de pulsos pareados antes y de después de aplicar simultáneamente TCB-2 y PGB. * (p>0.05).

análogo no fosforilable de GDP (GDP β S 2 mM) en la solución intracelular. De esta manera, el bloqueo de las proteínas G de la neurona postsináptica inhibirá el posible efecto del receptor 5-HT_{2A} postsináptico. Utilizando GDP β S en la pipeta de registro, observamos que la aplicación de 5-HT generó una disminución significativa en la amplitud de las eIPSC [84.3% \pm 5.71, $p = 0.029$, $n = 9$] (Figura 8A) y una correlación en el CV [$r = 0.76$, $p = 0.017$, $n = 9$] (Figura 8B). De esta forma, nuestros resultados sugieren no se requiere la activación postsináptica del receptor 5-HT_{2A} para inducir la iLTD. Por lo tanto, para lograr inducir la iLTD se necesitaría la activación de 5-HT₃

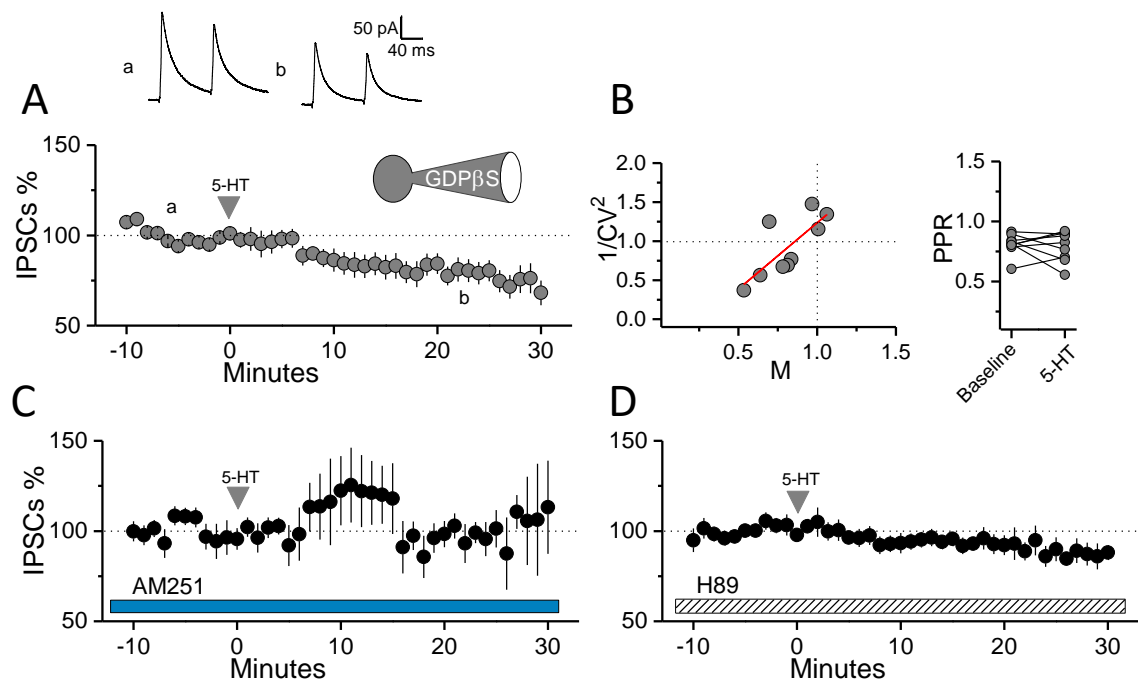


Figura 8. Los 5-HT_R presinápticos inducen iLTD vía disminución de AC/cAMP/PKA por activación de CB1_R. A y B se utiliza un GDP no hidrolizable (GDP β S) en la solución intracelular. A (arriba), se muestran los trazos representativos de eIPSC antes (izquierda) y 25 minutos después de aplicar 5-HT (derecha). A (abajo), se muestra el curso temporal de los cambios en amplitud de las eIPSC por aplicación de 5-HT. B (izquierda), Gráfico de $1/CV^2$ en función de las amplitudes de las eIPSC luego de aplicación de 5-HT normalizadas con su línea base (M). B (derecha), razón de pulsos pareados antes y de después de aplicar 5-HT. C, curso temporal de las eIPSC por aplicación de 5-HT bajo un agonista inverso de CB1_R (AM251) en el baño. D, curso temporal de las eIPSC por aplicación de 5-HT bajo un bloqueador de la PKA (H89) en el baño. * ($p > 0.05$).

y 5-HT_{2A} de células diferentes a la neurona piramidal postsináptica. En este sentido, nuestros resultados indican que la 5-HT induce iLTD en sinapsis GABAérgicas CB1+. Se ha demostrado que la activación de receptores 5-HT_{2A} puede generar depresión sináptica a través de la señalización de eCBs (Best and Regehr, 2008; Parrish and Nichols, 2006). Además, la señalización de eCBs puede modular fuertemente la transmisión GABAérgica y en que la iLTD por 5-HT ocurre específicamente en interneuronas que expresan CB1_R (Chevalyere and Castillo, 2004; Chiu et al., 2010). Por lo tanto, se evaluó la posible contribución de CB1_R en la iLTD por 5-HT. Para ello, se utilizó el agonista inverso de CB1_R AM251 (20 μM) en el baño. En esta condición, la 5-HT no modificó la amplitud de las eIPSC [118.0% ± 19.60, p = 0.70, n = 4] (Figura 8C), indicando que la señalización por eCBs es necesaria para inducir la iLTD por 5-HT. Lo que nos indica que la iLTD por 5-HT no solo ocurre en sinapsis sensibles a la señalización por eCBs, sino que también la 5-HT activa la vía de señalización de eCBs como parte del mecanismo de inducción de esta forma de iLTD.

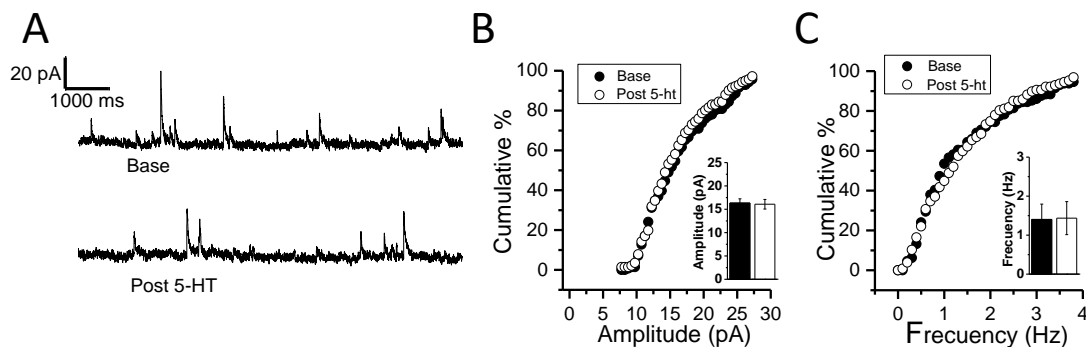


Figura 9. **La inducción de la iLTD requiere de actividad presináptica dependiente de potenciales de acción.** mIPSC no cambian en amplitud ni frecuencia por 5-HT. **A**, se muestran los trazos representativos de las mIPSC antes (arriba) y 25 minutos después de aplicar 5-HT (abajo). **B** (afuera), grafico de probabilidad acumulada en función de la amplitud de las mIPSC antes (círculos negros) y después de aplicar 5-HT (círculos vacíos). **B** (adentro), grafico de barra del promedio de amplitud de las mIPSC antes (barra negra) y después de 5-HT (barra vacía). **C** (afuera), grafico de probabilidad acumulada en función de la frecuencia instantánea de las mIPSC antes (círculos negros) y después de aplicar 5-HT (círculos vacíos). **C** (adentro), grafico de barra del promedio de las frecuencias instantáneas de las mIPSC antes (barra negra) y después de 5-HT (barra vacía). * (p>0.05).

Se ha descrito que la disminución en la probabilidad de liberación de GABA por activación de CB1_R involucra la inactivación de la cascada adenilato ciclasa, AMP cíclico y PKA (AC/cAMP/PKA); finalmente disminuyendo la actividad de Rim1 α , lo que genera una disminución en la liberación de GABA (Ahumada et al., 2013; Chevaleyre et al., 2007). Para comprobar si la activación de CB1_R requiere la vía AC/cAMP/PKA para inducir la iLTD, utilizamos un bloqueador de la PKA (H89 10 μ M) en el baño. En esta condición bajo H89 la aplicación de 5-HT no disminuyó la amplitud de las eIPSC, por lo que la iLTD no se indujo al bloquear la PKA [95.6% \pm 9.83, $p = 0.44$, $n = 7$] (Figura 8D). Estos resultados sugieren que el mecanismo de inducción de la iLTD por 5-HT activa la vía de señalización de eCBs, activando CB1_R presinápticos que disminuyen la actividad la vía AC/cAMP/PKA y la probabilidad de liberación de GABA.

La iLTD requiere la activación de GABA_B en los terminales presinápticos

Dentro de los componentes presinápticos que podrían estar involucrados en la inducción de la iLTD están aquellos dependientes e independientes de potenciales de acción. Entre los componentes independientes de potencial de acción se encuentran la probabilidad de liberación del neurotransmisor y el número de sitios de liberación del neurotransmisor; mientras que en los componentes dependientes de potenciales de acción se encuentran los relevos sinápticos río arriba. Por lo tanto, medimos eventos sinápticos espontáneos independientes de potenciales de acción (mIPSC) para evaluar cambios de probabilidad de liberación, contactos sinápticos y amplitud de corrientes posinápticas (Del Castillo and Katz, 1954; Manabe et al., 1992, 2007). Se utilizó tetrodotoxina (TTX 500nM) para bloquear los canales de sodio sensibles a voltaje, y por lo tanto, el disparo de potenciales de acción. Se registraron las mIPSC bajo TTX en neuronas piramidales de L2/3 antes y después de la aplicación de 5-HT, y no se observaron cambios en amplitud [de 16.3 pA \pm 0.91 a 16.1 pA \pm 1.03, $p = 0.62$, $n = 6$], ni frecuencia [de 1.4 Hz \pm 0.39 a 1.4 Hz \pm 0.42, $p = 0.81$, $n = 6$] de los mIPSC por inducidos 5-HT (Figura 9). Estos resultados

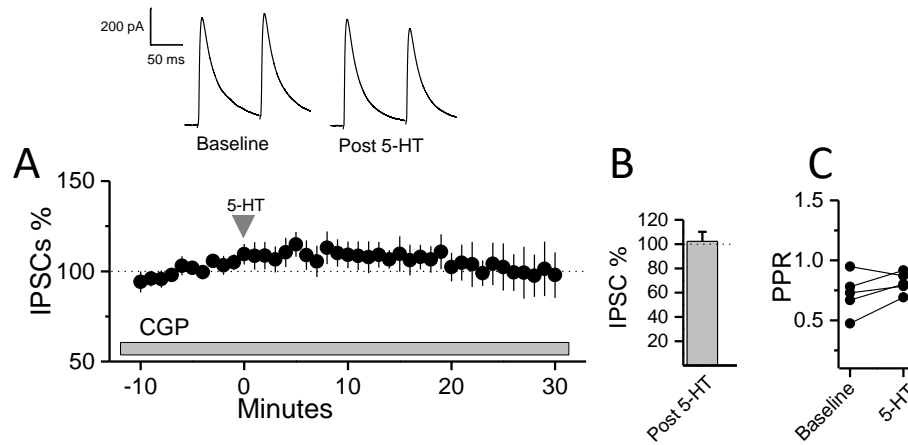


Figura 10. **Se requiere la actividad del GABA_B para que 5-HT induzca iLTD en L2/3.** **A** (arriba), trazos representativos de las eIPSC antes (izquierda) y 25 minutos después de aplicar 5-HT (derecha). **A** (abajo), curso temporal de las eIPSC por aplicación de 5-HT bajo un antagonista de receptores GABA_B (CGP) en el baño. **B**, grafico de barra que muestra en porcentaje los cambios de las eIPSC a 20 minutos de la aplicación de 5-HT. **C**, razón de pulsos pareados antes y de después de aplicar 5-HT. * ($p > 0.05$).

muestran que la inducción de la iLTD requiere de los potenciales de acción de las neuronas presinápticas, por lo tanto, de la liberación activa de GABA. En el contexto experimental en que observamos la iLTD por 5-HT hay dos posibles sinapsis que dependen de potenciales de acción, la sinapsis de la interneurona sobre la neurona piramidal y la sinapsis de interneurona a interneurona (IN-IN). Estas últimas son interneuronas tipo VIP, que son un subgrupo de interneuronas que expresan el receptor 5-HT₃ (Ayzenshtat et al., 2016; Lee et al., 2010). Se ha propuesto que la sinapsis IN-IN pudiera disminuir la probabilidad de liberación de GABA sobre la neurona piramidal por activación del receptor GABA_B (Lee and Soltesz, 2011). Por lo tanto, evaluamos si la activación de los receptores metabotrópicos GABAérgicos GABA_B forman parte de la señalización involucrada en la inducción de la iLTD. De este modo registramos las eIPSC bloqueando la actividad de GABA_B utilizando CGP (5 μ M) en el baño. Nosotros no observamos cambios significativos en la amplitud de las eIPSC luego de la aplicación de 5-HT [$102.3\% \pm 7.32$, $p = 0.76$, $n = 5$], ni cambios significativos en la PPR [de 0.72 ± 0.077 a 0.81 ± 0.038 , $p = 0.13$, $n = 5$] (Figura 10). Esto nos sugiere que los receptores GABA_B deben estar activos para que se

produzca la iLTD. Proponemos que la 5-HT por medio de la activación de receptores 5-HT₃ aumenta la liberación de GABA sobre el terminal presináptico activando los receptores de GABA_B reduciendo la liberación de GABA. En paralelo la activación de 5-HT_{2A} induce la liberación de eCBs, activando CB1_R en el terminal presináptico. De esta manera, nuestros resultados sugieren la atractiva idea que la actividad conjunta de GABA_B y CB1_R inducen una disminución en la probabilidad de liberación GABA, produciendo la iLTD inducida por 5-HT (figura 11).

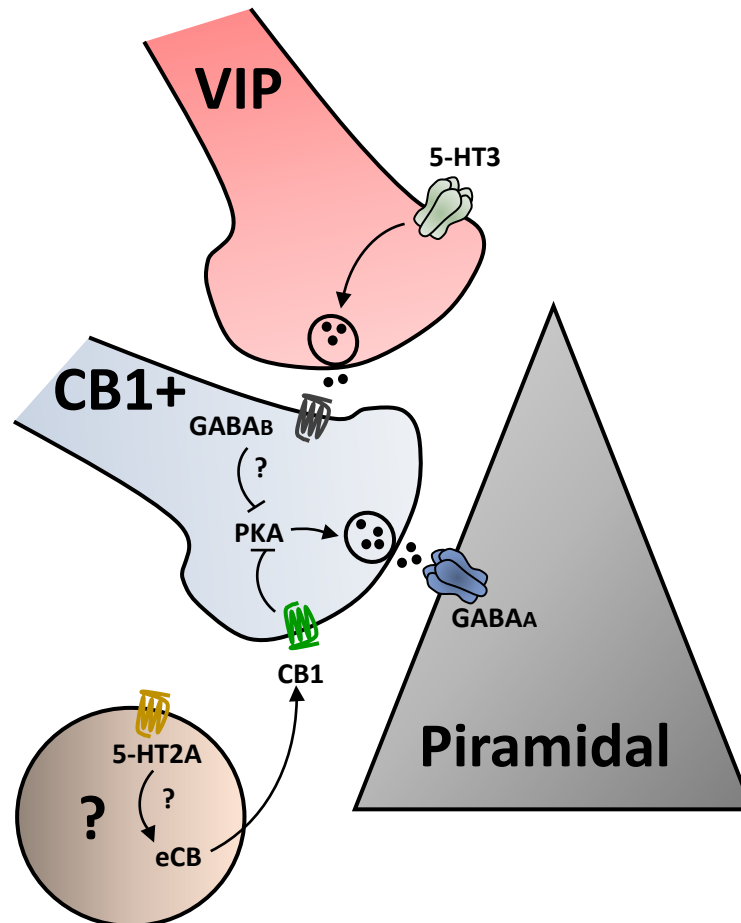


Figura 11. **Mecanismo de inducción y expresión de la iLTD por 5-HT en L2/3.** Proponemos que 5-HT gatilla en paralelo los receptores 5-HT₃ para aumentar la activación de GABA_B presináptico, y 5-HT_{2A} para activar una vía de señalización de eCBs generando una disminución a largo plazo en la probabilidad de liberación de GABA de interneuronas CB1+.

5-HT en la transmisión sináptica inhibitoria proveniente de L5

5-HT induce una iLTD sobre los terminales presinápticos de interneuronas CB1+

La organización laminar en la PFC organiza las diferentes entradas y salidas sinápticas, siendo L2/3 principalmente cortico-cortical y L5 a otras estructuras cerebrales (Harris and Shepherd, 2015). En consideración de las diferencias entre las capas de PFC, investigamos el rol de 5-HT en la transmisión inhibitoria en L2/3, y en paralelo la transmisión inhibitoria proveniente de L5 sobre neuronas piramidales de L2/3. En estas condiciones experimentales, determinamos el efecto de la activación de 5-HT_R sobre las eIPSC provenientes de fibras GABAérgicas de L5 que sinaptan a las neuronas piramidales de L2/3 (Figura 12A). Luego de una línea base de 10 minutos, la aplicación de 5-HT disminuyó la amplitud de las eIPSC [69.6% ± 11.06, p = 0.012, n = 8] (Figura 12B), la cual es acompañada por un aumento en la PPR [de 0.58 ± 0.071 a 0.78 ± 0.058, p = 0.032, n = 6] y una correlación lineal en el CV [r = 0.77, p = 0.0011, n = 8] (Figura 12C). Estos resultados nos sugieren que 5-HT induce una iLTD expresada como una disminución en la probabilidad de liberación de los terminales GABAérgicos provenientes de L5.

La activación de receptores 5-HT_{1A} y/o 5-HT_{2A} inducen iLTD en L5

Similar al diseño experimental usado en L2/3, se exploró la contribución de los receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} y 5-HT₃ por su abundancia relativa en PFC (Barnes and Sharp, 1999; Celada et al., 2013; Elliott et al., 2018; Jakab and Goldman-Rakic, 2000). Bajo antagonistas para 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} o 5-HT₃, 5-HT fue capaz de inducir una iLTD; en WAY100635 (5 µM) [62.3% ± 5.64, p = 0.0005, n = 6] para 5-HT_{1A}, MDL100907 (200 nM) [51.3% ± 11.44, p = 0.007, n = 6] para 5-HT_{2A} y MDL72222 (1 µM) [57.3% ± 18.40, p = 0.035, n = 5] para 5-HT₃ (Figura 13A y C). Estos resultados nos sugieren que la iLTD por 5-HT en L5 es gatillada por la activación de más de un tipo de receptor. Por esta razón realizamos el bloqueo farmacológico de 2 de estos receptores, 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A} (con WAY100635 (5 µM) y MDL100907 (200 nM) respectivamente), en esta condición la iLTD no se generó luego de la aplicación de 5-HT [100.6% ± 11.20, p = 0.78, n = 5] (Figura 13A). Así,

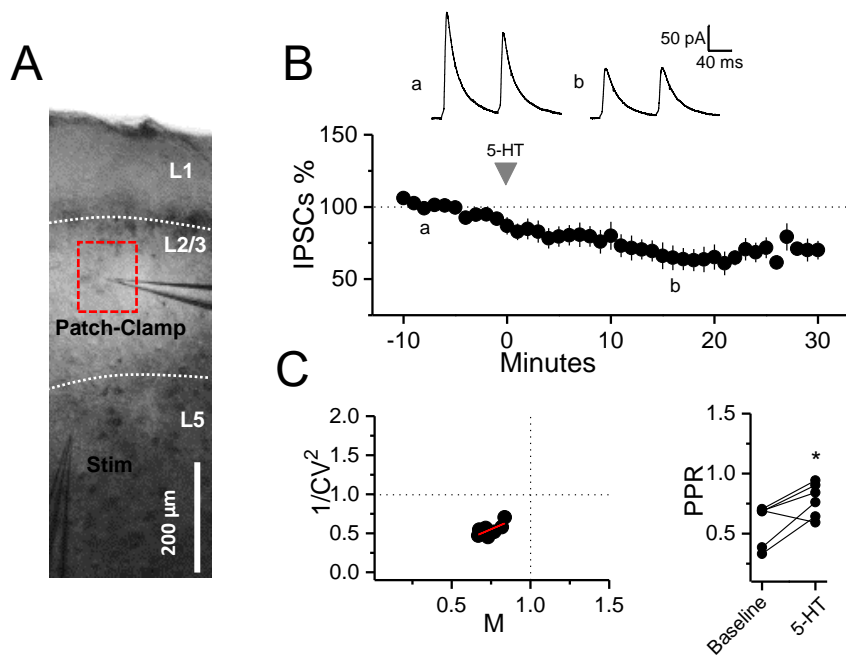


Figura 12. **5-HT induce una iLTD sobre fibras GABAérgicas de L5.** **A**, fotografía con objetivo 10X del arreglo experimental mostrando la posición los electrodos de estimulación (abajo) y registro (medio). **B** (arriba), trazos representativos de eIPSC antes (izquierda) y 25 minutos después de aplicar 5-HT (derecha). **B** (abajo), se muestra el curso temporal de los cambios en amplitud de las eIPSC por aplicación de 5-HT. **C** (izquierda), Gráfico de $1/CV^2$ en función de las amplitudes de las eIPSC luego de aplicación de 5-HT normalizadas con su línea base (M) (ver materiales y métodos). **C** (derecha), razón de pulsos pareados antes y de después de aplicar 5-HT. * ($p > 0.05$).

tanto la activación del receptor $5-HT_{1A}$ y $5-HT_{2A}$ estarían induciendo una iLTD. Para probar esta hipótesis utilizamos el agonista específico del receptor $5-HT_{1A}$ (8-OH-DPAT 10 μM) y del receptor $5-HT_{2A}$ (TCB-2 10 μM). La amplitud de las eIPSC provenientes de L5 disminuyeron su amplitud luego de la aplicación de 8-OH-DPAT [$65.6\% \pm 10.10$, $p = 0.016$, $n = 5$]. Un fenómeno similar se observó al agregar TCB-2, puesto que también disminuyó la amplitud de las eIPSC [$67.7\% \pm 10.91$, $p = 0.028$, $n = 6$] (Figura 13B). De esta forma tanto la activación del receptor $5-HT_{1A}$ como el receptor $5-HT_{2A}$ pueden inducir iLTD sobre las entradas sinápticas de L5. Sin embargo, al analizar la PPR encontramos algunas diferencias. Al bloquear la iLTD con WAY100635 y MDL100907 no hay cambios en la PPR [de 0.78 ± 0.075 a 0.71 ± 0.054 , $p = 0.061$, $n = 5$], tampoco

observamos cambios en la PPR inducida por 8-OH-DPAT [de 0.65 ± 0.044 a 0.68 ± 0.044 , $p = 0.56$, $n = 5$], pero si aumento la PPR en los eIPSC por TCB-2 [de 0.55 ± 0.061 a 0.73 ± 0.040 , $p = 0.033$, $n = 6$] (Figura 13D). Estos resultados nos sugieren que únicamente la iLTD inducida por activación de receptores 5-HT_{2A} es debido a una disminución en la probabilidad de liberación de GABA. Mientras que la iLTD por activación de 5-HT_{1A} posiblemente es por un mecanismo de depresión sináptica que se expresa en la neurona piramidal de L2/3.

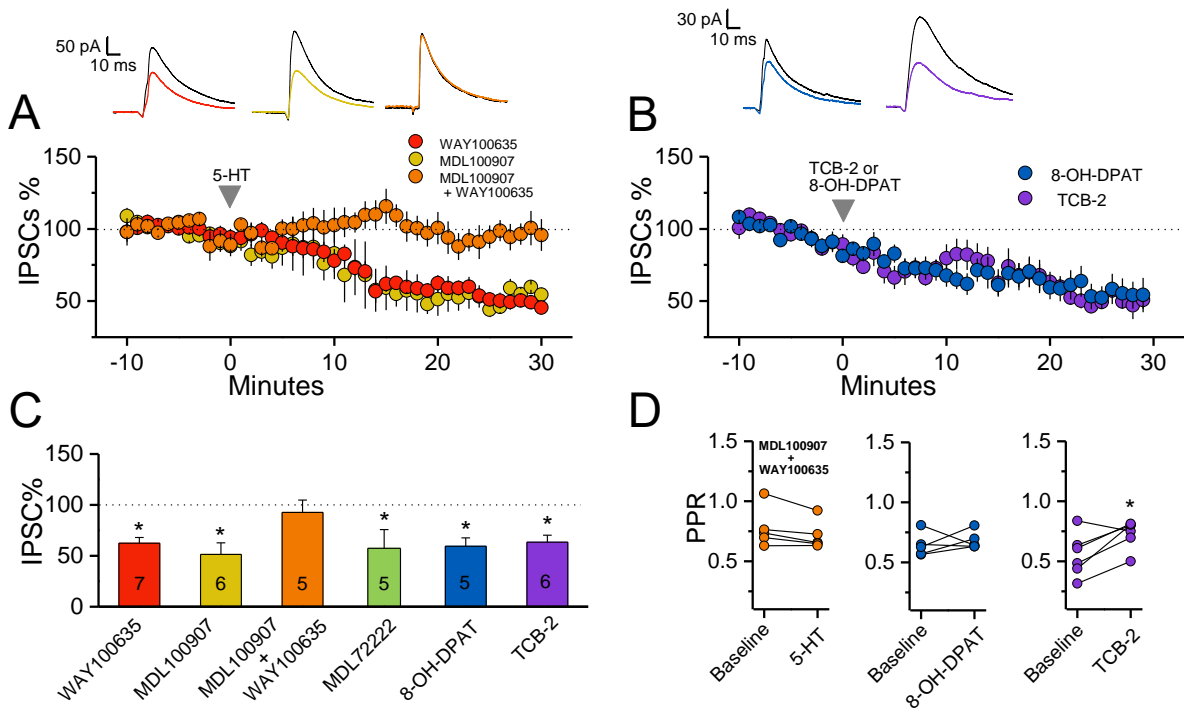


Figura 13. 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A} inducen iLTD sobre sinapsis de L5. **A** (arriba), trazos representativos de eIPSC antes (negro) y después de aplicar 5-HT bajo WAY100635 (rojo), MDL100907 (amarillo) o WAY100635 más MDL100907 (naranja). **A** (abajo), se muestra el cambio del curso temporal de las eIPSC por aplicación de 5-HT bajo WAY100635 (rojo), MDL100907 (amarillo) o WAY100635 más MDL100907 (naranja). **B** (arriba), trazos representativos de eIPSC antes (negro) y después de aplicar 8-OH-DPAT (azul) o TCB-2 (morado). **B** (abajo), se muestra el cambio del curso temporal de las eIPSC por aplicación de 8-OH-DPAT (azul) o TCB-2 (morado). **C**, Grafico de barra resume el cambio de las eIPSC después de aplicar 5-HT/agonista en distintas condiciones farmacológicas. **D**, razón de pulsos pareados antes y de después de aplicar la 5-HT bajo WAY100635 más MDL100907 (naranja); o después de aplicar 8-OH-DPAT (azul) o TCB-2 (morado). * ($p < 0.05$).

iLTD ocurre sobre fibras CB1+ provenientes de L5

Para determinar si la iLTD ocurre sobre algún tipo específico de sinapsis provenientes de interneuronas de L5 realizamos dos disecciones farmacológicas. En la primera, utilizamos un agonista de CB1_R (WIN 5 μM) para disminuir la transmisión sináptica proveniente de interneuronas CB1+ (Chevalyere et al., 2007; Chiu et al., 2010). En presencia de WIN la aplicación de 5-HT no disminuyó la amplitud de las eIPSC [87.8% ± 6.87, p = 0.34, n = 7] (Figura 14A). Estos resultados nos sugieren que la iLTD en L5 ocurre sobre los terminales presinápticos CB1+. En la segunda disección farmacológica utilizamos un agonista de los receptores tipo μ opioide (DAMGO 1 μM) que disminuyen la liberación de GABA en interneuronas distintas de las CB1+ (Glickfeld et al., 2008; Nugent et al., 2007). Observamos que bajo DAMGO la amplitud de las eIPSC provenientes de L5 disminuyen al agregar 5-HT [63.0% ± 6.90, p = 0.0029, n = 10] (Figura 14B).

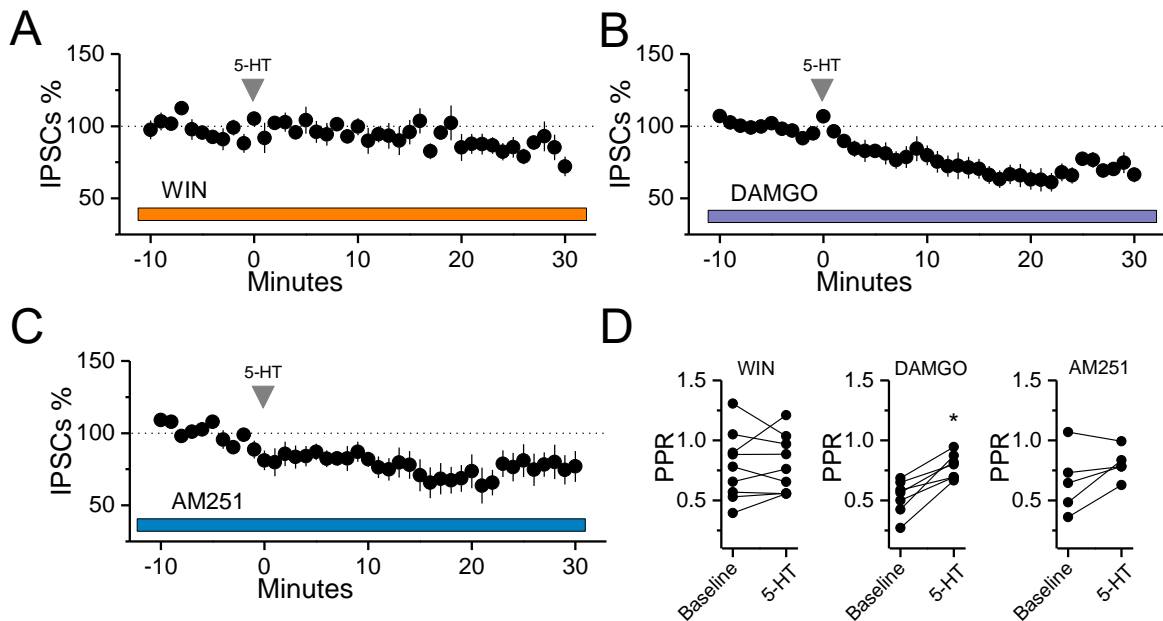


Figura 14. **La iLTD en L5 ocurre sobre entradas sinápticas CB1+.** **A**, se muestra el curso temporal de los cambios en amplitud de las eIPSC por aplicación de 5-HT bajo WIN perfundido en el baño. **B**, se muestra el curso temporal de los cambios en amplitud de las eIPSC por aplicación de 5-HT bajo DAMGO perfundido en el baño. **C**, se muestra el curso temporal de los cambios en amplitud de las eIPSC por aplicación de la 5-HT bajo AM251 perfundido en el baño. **D**, razón de pulsos pareados antes y de después de aplicar 5-HT bajo WIN, DAMGO o AM251 perfundido en el baño. * (p>0.05).

Lo cual sugiere que la iLTD en L5 inducida por la activación de 5-HT_R ocurre fundamentalmente en sinapsis CB1+ y no μ +. De esta forma exploramos si CB1_R está involucrado como parte del mecanismo de la iLTD. Utilizando un agonista inverso de CB1_R (AM251 20 μ M) en el baño, observamos que la amplitud de las eIPSC disminuyó luego de la aplicación de 5-HT [65.7% \pm 10.66, $p = 0.035$, $n = 5$] (Figura 14C). Esto nos sugiere que 5-HT puede inducir iLTD independiente de la actividad de CB1_R. Al medir la PPR, bajo WIN no cambió luego de agregar 5-HT [de 0.87 \pm 0.094 a 0.86 \pm 0.086, $p = 0.89$, $n = 7$], bajo DAMGO aumento la PPR luego de agregar 5-HT [de 0.52 \pm 0.053 a 0.78 \pm 0.039, $p = 0.0016$, $n = 7$] y en AM251 no cambió luego de agregar 5-HT [de 0.66 \pm 0.121 a 0.80 \pm 0.058, $p = 0.12$, $n = 5$] (figura 14D). Estos resultados nos sugieren que la iLTD observada bajo AM251 no ocurre por cambios en la probabilidad de liberación, lo cual es similar a lo observado al activar el receptor 5-HT_{1A} selectivamente (figura 13D). Por lo tanto, los

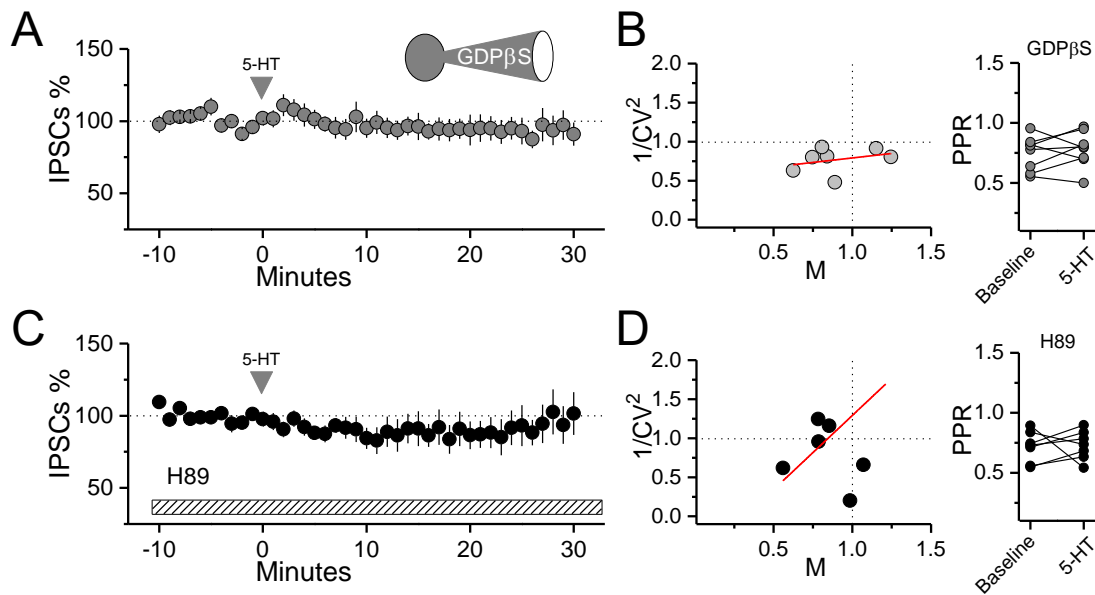


Figura 15. 5-HT activa la vía AC/cAMP/PKA en la postsinapsis para inducir iLTD en L5.

A, se utiliza un GDP no hidrolizable (GDP β S) en la solución intracelular. Se muestra el curso temporal de los cambios en amplitud de las eIPSC por aplicación de 5-HT. **B**, razón de pulsos pareados antes y de después de aplicar 5-HT usando GDP β S en la solución intracelular. **C**, curso temporal de las eIPSC por aplicación de 5-HT bajo un bloqueador de la PKA (H89) en el baño. **D**, razón de pulsos pareados antes y de después de aplicar 5-HT bajo H89 en el baño. * ($p > 0.05$).

resultados sugieren que la iLTD por activación de 5-HT_{2A} se expresa como una disminución en la probabilidad de liberación por activación de CB1_R, mientras que la iLTD por activación del receptor 5-HT_{1A} induce una depresión expresada a nivel postsináptico.

La iLTD inducida por activación de receptores 5-HT_{2A} y/o 5-HT_{1A} requiere de la actividad de PKA

Si bien la iLTD-5-HT_{2A} parece expresarse a nivel presináptico y la iLTD-5HT_{1A} a nivel post sináptico, nuestros experimentos aún no permiten determinar la zona de inducción de la plasticidad. Por lo tanto, para conocer la zona de inducción de la iLTD en L5 realizamos registros de las eIPSC utilizando un análogo de GDP no fosforilable en la solución de registro (GDPβS 2 mM), el cual bloquea río abajo los receptores metabotrópicos postsinápticos. En esta condición, observamos que no hubo un cambio significativo en la amplitud de las eIPSC luego de la aplicación de 5-HT [$93.8\% \pm 10.66$, $p = 0.18$, $n = 8$], en la PPR [de 0.74 ± 0.050 a 0.78 ± 0.053 , $p = 0.49$, $n = 8$] y en el CV [$r = 0.31$, $p = 0.49$, $n = 8$] (Figura 15A y B). Estos resultados nos indican que la inducción de la iLTD tanto por activación de 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A} ocurren en la neurona piramidal postsináptica. Se ha descrito que tanto la activación del receptor 5-HT_{1A} como CB1_R pueden disminuir la actividad de la vía de señalización AC/cAMP/PKA (Atwood et al., 2014; Cai et al., 2002; Chevaleyre et al., 2007). Esta vía se ha asociado a plasticidad presináptica y postsináptica (Chevaleyre et al., 2007; Connelly et al., 2013; Vickery et al., 1997), por lo tanto, evaluamos su contribución en la iLTD por 5-HT en L5, mediante el bloqueo de la actividad de la PKA aplicando H89 (10 μM) en el baño. En estas condiciones experimentales, observamos que bajo H89 la amplitud de las eIPSC no disminuyeron luego de agregar 5-HT [$86.5\% \pm 9.63$, $p = 0.39$, $n = 7$] (Figura 15C), ni tampoco observamos correlación en el CV [$r = 0.49$, $p = 0.25$, $n = 7$], ni cambios en la PPR [de 0.71 ± 0.048 a 0.73 ± 0.043 , $p = 0.86$, $n = 7$] (Figura 15D). Estos resultados indican que la vía AC/cAMP/PKA parece estar involucrada tanto en la iLTD por 5-HT_{2A} en el terminal presináptico como por 5-HT_{1A} en la neurona postsináptica. Considerando los resultados obtenidos, proponemos que en L5 la iLTD puede gatillarse mediante dos mecanismos:

- 1) La activación del receptor 5-HT_{1A} en la neurona postsináptica, activa la señalización de la proteína G_i, disminuyendo la fosforilación de proteínas por una disminución en la actividad de la PKA, lo cual reduce la amplitud de las eIPSC a través de la modulación de receptores GABA_A.
- 2) La activación de 5-HT_{2A} en la neurona piramidal, activa la cascada dependiente de la proteína G_q, induciendo la síntesis y liberación de eCBs, que de forma retrograda activa CB1_R y disminuye la actividad de la PKA, y así reduce la probabilidad de liberación de GABA (Figura 16).

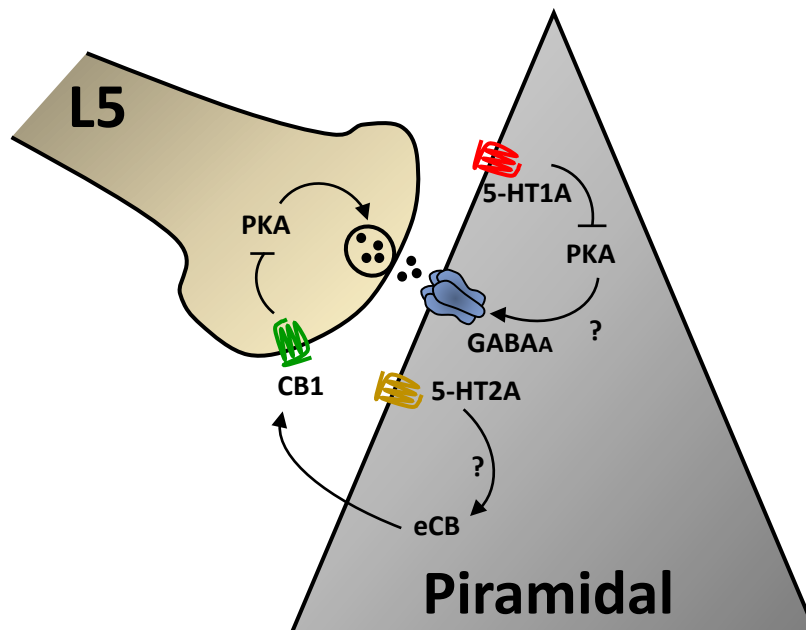


Figura 16. **Mecanismo de inducción y expresión de la iLTD por 5-HT en sinapsis de L5.** Proponemos que la 5-HT induce una iLTD por activación de 5-HT_{1A} y/o 5-HT_{2A} mediante mecanismos de inducción independientes. Al activar 5-HT_{1A} en la neurona piramidal, se gatilla una señalización intracelular que disminuye la PKA que genera una disminución postsináptica de las corrientes GABAérgicas. Al activar 5-HT_{2A} en la neurona piramidal, se activa la señalización retrograda por eCBs, disminuyendo la probabilidad de liberación de GABA.

DISCUSIÓN

En los animales, el sistema nervioso (SN) permitió manifestar conductas en movimientos. A su vez, el aprendizaje en los animales ocurre como un cambio en el SN en respuesta al ambiente (Maturana and Varela, 2006). A los cambios sinápticos que subyacen a cambios en el SN se les denomina plasticidad (Bliss and Lømo, 1973; Kandel, 2012; Kandel and Tauc, 1965a). En 1965 Erick Kandel y Ladislav Tauc, utilizando un modelo de *Aplysia*, demostraron que dos procesos de aprendizaje (sensibilización y habituación), se sustentan en cambios en la eficacia de las sinapsis o plasticidad sináptica (Kandel and Tauc, 1965a, 1965b). La plasticidad sináptica se puede dividir en tres grupos no excluyentes entre sí (Bailey et al., 2000). El primero es la “plasticidad homosináptica”, que significa que mediante mecanismos de señalización dentro de una misma sinapsis se induce y expresa la plasticidad sináptica como un cambio en la eficacia sináptica. La segunda es la “plasticidad heterosináptica”, esta ocurre cuando una sinapsis cambia su eficacia sináptica por mecanismos inducidos por otra u otras sinapsis. Finalmente, la “plasticidad dependiente de actividad” es aquella que requiere el disparo de potenciales de acción de las neuronas pre y/o postsinápticas (Bailey et al., 2000; Greenhill et al., 2015; Sjöström, 2012). Estas clasificaciones se pueden utilizar para describir tipos de plasticidad sináptica desde invertebrados hasta mamíferos, siendo la plasticidad sináptica un mecanismo conservado en procesos de aprendizaje y memoria. En los mamíferos, la evolución del SN en cortezas generó procesos cognitivos complejos que envuelven distintos circuitos sinápticos y áreas cerebrales (Aboitiz, 1992; Arendt et al., 2016; Rakic, 2009).

Tal como se ha descrito en invertebrados, se ha propuesto la plasticidad sináptica como el sustrato neuronal en procesos cognitivos complejos. Estos procesos cognitivos dependen de diversas estructuras cerebrales y circuitales, siendo la 5-HT un neurotransmisor clave en una

gran variedad de estos procesos (Barnes and Sharp, 1999; Buckner and Krienen, 2013; Goto et al., 2010; Isaacson and Scanziani, 2011).

Entender en detalle el rol fisiológico que ejerce la 5-HT en PFC permitiría comprender las bases sinápticas de los procesos cognitivos complejos tales como la atención, la toma de decisiones o la creatividad (Cole et al., 2012; Kaplan et al., 2017; Kvitsiani et al., 2013). Del mismo modo, ayudaría comprender de mejor manera las bases biológicas de diversas enfermedades neuropsiquiátricas en las que se ha demostrado que existe un compromiso de la transmisión serotoninérgica y/o desregulación en el balance E/I (Krystal and State, 2014; Marín, 2012; Naughton et al., 2000; Yizhar et al., 2011). Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que la 5-HT es capaz de inducir dos formas diferentes de iLTD en la PFC, dependiendo de la capa desde donde provengan las sinapsis GABAérgicas, o diferir dependiendo del tipo de interneurona. En efecto, nuestros resultados demuestran que la 5-HT disminuye la transmisión sináptica inhibitoria en PFC actuando específicamente en las sinapsis CB1+, las cuales forman parte de un grupo acotado de interneuronas (Chiu et al., 2010; Karnani et al., 2016; Rudy et al., 2011). Por lo tanto, podemos hipotetizar que las interneuronas CB1+ pueden estar estrechamente ligada a los procesos cognitivos mediados por la PFC en las cuales se ha asociado la participación serotoninérgica. En particular la capa 2/3 de la PFC es la zona que presenta una mayor cantidad de conexiones cortico-corticales, y es considerada como el área de PFC encargada del procesamiento de la información (Keller and Mrsic-Flogel, 2018; Petersen and Crochet, 2013; Yizhar et al., 2011). Por ello, resulta relevante que la 5-HT pueda modular las entradas inhibitorias de L2/3 y de L5, a través de mecanismos sinápticos diferentes e independientes. La iLTD de entradas GABAérgicas de L2/3 mediada por un mecanismo heterosináptico que requiere la coincidencia de dos vías de señalización, por la activación de receptores 5-HT₃ en paralelo con los 5-HT_{2A}. Mientras que la iLTD de las entradas GABAérgicas de L5 se logra inducir por la activación del receptor 5-HT_{1A} y/o 5-HT_{2A}.

Plasticidad heterosináptica dependiente de actividad en L2/3

Desde los trabajos funcionales de plasticidad sináptica en el modelo de *Aplysia depilans* realizados por Eric Kandel, la 5-HT ha sido asociada a mecanismos de plasticidad heterosinápticos (Cohen et al., 2003; Glanzman et al., 1989; Kandel and Tauc, 1965a, 1965b). Considerando la divergencia evolutiva del SN, la 5-HT parece mediar plasticidad heterosináptica desde invertebrados hasta mamíferos, por lo que pareciera que la relación entre plasticidad heterosináptica y 5-HT es un rasgo conservado en la evolución animal. En nuestra propuesta, el CB1_R se activa mediante una vía de señalización inducida por el receptor 5-HT_{2A}, el cual aún no hemos podido determinar su ubicación sináptica o tipo celular. Sin embargo, hay fuerte evidencia que indica que la activación de 5-HT_{2A} induce la síntesis y liberación de 2-AG en distintos tipos sinápticos y áreas cerebrales (Best and Regehr, 2008; Burattini et al., 2014). La activación de 5-HT_{2A} acoplado a la proteína G_q aumenta la actividad de PLC, lo que aumentaría la producción de 2-AG (Parrish and Nichols, 2006). Además, demostramos que la iLTD por 5-HT en L2/3 requiere la coactivación de CB1_R y GABA_B, lo cual es consistente con la evidencia que muestra que existe una coexpresión de CB1_R y GABA_B en terminales GABAérgicos (Földy et al., 2007). Dicha coexpresión se ha asociado funcionalmente a mecanismos de disminución en la probabilidad de liberación de interneuronas GABAérgicas (Lee and Soltesz, 2011). En consecuencia, nosotros proponemos que el receptor 5-HT₃ al ser un canal catiónico permeable a calcio expresado en un tipo específico de interneurona, su activación en el terminal sináptico aumentaría la liberación de GABA en dichas interneuronas (Fukushima et al., 2009). El aumento en la liberación de GABA activaría receptores GABA_B, gatillando una vía de señalización por G_i; siendo esta la primera vía de señalización heterosináptica para inducir la iLTD en L2/3. Esta posibilidad se sustenta principalmente por dos resultados. Primero, en los experimentos bajo TTX, las mIPSC no cambiaron en frecuencia ni amplitud, lo que sugiere que este mecanismo de iLTD presináptico requiere la liberación activa (dependiente de potenciales de acción) de GABA. Esto significaría que la actividad espontánea y/o la estimulación eléctrica utilizada para registrar los eIPSC es suficiente para activar un componente polisináptico necesario para la iLTD en L2/3, lo que a su

vez nos sugiere que, para que ocurra la iLTD en L2/3, se requiere un relevo sináptico que lograría activar los receptores de GABA_B generando una desinhibición de la neurona piramidal. Esto fue demostrado experimentalmente al utilizar un antagonista del receptor GABA_B (CGP) y lograr el bloqueo de la iLTD (Figura 8). Actualmente, estamos realizando registros de eIPSC en interneuronas, para determinar si la activación de 5-HT₃ aumenta la liberación de GABA sobre interneuronas en L2/3, activando conductancias mediadas por GABA_B.

En sinapsis GABAérgicas, se ha descrito como mecanismo canónico de señalización por eCBs la síntesis y liberación de 2AG desde la neurona postsináptica al terminal presináptico disminuyendo la liberación de GABA (Chevalleyre and Castillo, 2004; Chevalleyre et al., 2007). En nuestros resultados, al bloquear los 5-HT_R postsinápticos con GDPβS, observamos que la vía de eCBs que posiblemente gatilla 5-HT_{2A} no se ubica en la neurona postsináptica de L2/3 (Figura 6A). Por lo tanto, hay un diverso grupo de células en PFC que podrían estar liberando eCBs en PFC. Una posibilidad que consideramos explorar en el futuro es la participación de astrocitos como mediadores del componente dependiente de eCBs. Esta posibilidad se sustenta en la evidencia que señala que los astrocitos pueden modular heterosinápticamente la eficacia sináptica por activación de CB1_R (Navarrete and Araque, 2008; Robin et al., 2018). Sin embargo, hasta ahora dicho mecanismo solo se ha mostrado en plasticidad a corto plazo por liberación de glutamato por parte del astrocito y podría modular la transmisión sináptica GABAérgica (Navarrete and Araque, 2008; Perea et al., 2016). Nuestros resultados soportan nuestra hipótesis que considera que CB1_R se activa directamente en el terminal presináptico, ya que en la iLTD, pareciera disminuir la cascada AC/cAMP/PKA para defosforilar Rim1α y en consecuencia disminuir la probabilidad de liberación de GABA (Chevalleyre et al., 2007), debido a que el H89a1 bloquear la actividad de la PKA impide la inducción de la iLTD (Figura 6D). Por lo tanto, en L2/3 la 5-HT generaría una iLTD que requiere de una inhibición presináptica proveniente de una interneurona 5-HT₃+, junto con la señalización por eCBs en dicho terminal GABAérgico mediada por la activación de 5-HT_{2A}. De esta manera en la PFC, las interneuronas CB1+ disminuyen su eficacia sináptica por actividad de 5-HT, tanto en L2/3 como en L5; sin embargo, los mecanismos

de inducción de iLTD que genera 5-HT en sinapsis de L2/3 son distintos que en sinapsis provenientes de L5.

Las interneuronas VIP de la PFC establecen sinapsis GABAérgicas principalmente sobre otras interneuronas GABAérgicas, generando una desinhibición de las neuronas piramidales, siendo las VIP además un subgrupo de interneuronas 5-HT₃+ (Lee et al., 2010; Pi et al., 2013; Rudy et al., 2011). Si bien las interneuronas VIP constituyen un grupo menor (cerca de un 7.5%) en la corteza, están mayoritariamente ubicadas en L2/3, alcanzando sobre un 10% de interneuronas en dicha Capa (Xu et al., 2010). Esta evidencia sustenta nuestra hipótesis de que la activación de 5-HT₃ puede aumentar la inhibición sobre otras interneuronas, en nuestro estudio específicamente a interneuronas CB1+. Estas interneuronas CB1+ podrían ser 5-HT₃+ o bien SOM+, ya hay evidencia que en ambos grupos se expresa CB1_R (Zou and Kumar, 2015). Sin embargo, aún no se esclarece completamente cómo funciona la activación de CB1_R en dichas interneuronas (Zou and Kumar, 2015). Además, hay estudios que muestran que la activación de CB1_R per se puede inducir depresión sináptica, similar a lo que observamos en L5 (Chevalleyre and Castillo, 2004; Chevalleyre et al., 2006; Chiu et al., 2010). Aunque no se conoce la función de CB1_R en interneuronas SOM+, nuestros datos aportan importante evidencia en que las interneuronas que están disminuyendo su probabilidad de liberación por 5-HT en L2/3 podrían ser de este tipo. Ya que nuestros resultados indican que la activación de CB1_R por 5-HT_{2A} no induce plasticidad sináptica *per se*, pero al activarse en conjunto con GABA_B, se logra inducir una iLTD. Por lo tanto, en este mecanismo heterosináptico, la activación de CB1_R o GABA_B podrían estar jugando un rol de metaplasticidad (o de cebo) para generar una iLTD por disminución en la probabilidad de liberación del terminal GABAérgico (Chevalleyre and Castillo, 2004; Yger and Gilson, 2015). Lo cual nos sugiere que la 5-HT logra que los receptores CB1_R y GABA_B se activen coordinadamente en el terminal presináptico para generar la iLTD.

Plasticidad heterosináptica en fibras provenientes de L5

Nuestros resultados muestran que en L5 la 5-HT induce una iLTD por medio de mecanismos diferentes a los observados en L2/3. En L5 observamos que la acción de 5-HT es inducir iLTD por medio de dos mecanismos de inducción heterosinápticos, el primero por activación del 5-HT_{1A} y el segundo mecanismo por activación de 5-HT_{2A}. Observamos que la activación del receptor 5-HT_{1A} generaría una iLTD expresada en la neurona postsináptica, ya que la activación de 5-HT_{1A} es capaz de inducir iLTD, pero no modifica la PPR (Figura 12). La iLTD en L5 solo ocurre en sinapsis cuyo terminal presináptico sea CB1+, puesto que en experimentos bajo WIN (agonista CB1_R), no se observa plasticidad sináptica por 5-HT (Figura 14A). Lo anterior se puede explicar por las diferencias de la densidad postsináptica en las distintas sinápticas inhibitorias que recibe la neurona piramidal; por ejemplo, las interneuronas PV+ en comparación con interneuronas CCK+ (subgrupo CB1+). En donde la postsinapsis entradas sinápticas provienen de una interneuronas PV+ poseen receptores GABA_A con una mayor proporción de subunidades $\alpha 1$, a diferencia de la postsinapsis de entradas CCK+ que los receptores GABA_A tienen una mayor proporción en la sub unidad $\alpha 2$ (Armstrong and Soltesz, 2012). En nuestros resultados muestran que la iLTD postsináptica por 5-HT_{1A} es específica de sinapsis CB1+. Por lo tanto, una hipótesis es que la expresión del receptor 5-HT_{1A} está expresado específicamente en la post sinapsis de entradas GABAérgicas CB1+. Otra alternativa es que la activación de 5-HT_{1A} module selectivamente los receptores GABA_A con alta proporción de subunidades $\alpha 2$, y así 5-HT_{1A} modularía mayoritariamente a las sinapsis provenientes de interneuronas CB1+.

Hasta ahora no hemos determinado si el mecanismo de inducción de iLTD por 5-HT_{1A} se produce al disminuir la conductancia de receptores GABA_A o disminución en el número de estos, sin embargo, en nuestros resultados determinamos que la iLTD en L5 requiere de la señalización AC/cAMP/PKA, una disminución de esta vía se ha descrito como una de las señalizaciones por receptores acoplados a G_i mayormente implicado en plasticidad sináptica (Chevalleyre et al., 2007; Cohen et al., 2003). Trabajos previos han descrito que 5-HT por vía AC/cAMP/PKA puede

disminuir corrientes glutamatérgicos y GABAérgicas a corto plazo (Cai et al., 2002; Feng et al., 2001; Wang et al., 2016).

Ahora bien, nosotros observamos un fenómeno de plasticidad a largo plazo en corrientes inhibitorias por activación de 5-HT_{1A} que parece utilizar una cascada de señalización intracelular similar a lo reportado anteriormente por otros investigadores, en donde una disminución en la actividad de la PKA gatillado por un receptor metabotrópico acoplado a proteína G_i induce una depresión postsináptica (Gladding et al., 2009). Nosotros observamos que en L5, la 5-HT genera una iLTD directamente sobre el terminal presináptico CB1+ vía eCBs por activación de 5-HT_{2A} o sobre la densidad postsináptica por activación de 5-HT_{1A}. Por lo tanto, ambas formas de iLTD en L5 (por 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A}) por 5-HT parecen ser homosináptica en interneuronas CB1+. La observación que la PPR aumenta en L5 al inducir la iLTD sugiere que esta depresión sináptica tiene un componente que depende de la disminución en la probabilidad de liberación de GABA (figura 11). Cuando bloqueamos CB1_R, observamos únicamente una iLTD postsináptica (Figura 12C y D) como la observada por 5-HT_{1A} (Figura 11B y D). Por lo tanto, la iLTD que genera la activación de 5-HT_{2A} genera una iLTD por medio de la activación de CB1_R mediante la liberación de eCBs desde la neurona post sináptica, ya que en L5 observamos un bloqueo total de la iLTD por GDPβS (Figura 13A). Tal como observamos con el receptor 5-HT_{1A}, la inducción de la iLTD por 5-HT_{2A} en L5 también se induce en la postsinapsis, pero esta se expresa en la presinapsis como una disminución en la probabilidad de liberación. Esta descripción de iLTD se ajusta a la señalización retrograda de eCBs que requiere una disminución en la actividad de la PKA (Chevalyere and Castillo, 2004; Chevalyere et al., 2007; Parrish and Nichols, 2006). El mecanismo de iLTD por eCBs en L5 es diferente que en L2/3, ya que en L2/3 pareciera que los eCBs no provienen de la neurona postsináptica, mientras que en la iLTD de L5, los eCBs si se liberasen de la postsinapsis.

Dentro de las interneuronas CB1+, la abundancia relativa de interneuronas SOM en L5 es mayor que en L2/3, mientras que la cantidad de interneuronas VIP en L5 es menor que en L2/3 (Rudy et al., 2011; Xu et al., 2010). Por lo tanto, es de esperar la iLTD en L5 ocurra en su mayoría en

entradas sinápticas de interneuronas SOM+. Estas interneuronas poseen una característica sináptica particular, y es que hacen sinapsis sobre la dendrita de neuronas piramidales (Chiu et al., 2013, 2018). De ser así, los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A} ubicados en las dendritas de las neuronas piramidales inducirían la iLTD en las entradas sinápticas de L5. Lo anterior implicaría que la función en la fisiología neuronal por parte de 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A} varía dependiendo de su localización. Puesto que hay diversos trabajos que señalan que 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A} activan y bloquean conductancias de potasio en el soma y axón de neuronas piramidales, modulando así el potencial de membrana e integración sináptica (Araneda and Andrade, 1991; Elliott et al., 2018; Villalobos et al., 2005). Dependiendo del tipo de neurona piramidal, por ejemplo, la 5-HT por medio de la activación de 5-HT_{2A} puede activar o bloquear conductancias de potasio, que nosotros lo pudimos registrar mediante el uso de una solución intracelular en base a MeSO₄ cambios en el potencial de membrana (Figura 2) (Elliott et al., 2018).

Por lo tanto, los receptores serotoninérgicos regulan la eficacia sináptica GABAérgica entre interneuronas y neuronas piramidales dependiendo de la ubicación de cada tipo de receptor. Al estar ubicados heterosinápticamente, la activación coordinada de los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT₃ genera una iLTD de las fibras GABAérgicas de L2/3. Los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A} ubicados posiblemente en el árbol dendrítico de las neuronas piramidales, inducen una iLTD en las entradas sinápticas provenientes de L5. Y finalmente, los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A} ubicados en el soma y axón de la neurona piramidal regulan el potencial de membrana, integración sináptica y disparo de potenciales de acción. De este modo, la 5-HT al disminuir la inhibición cambiará el balance E/I en la PFC hacia un aumento en la excitación, siendo 5-HT_{2A} clave tanto en la plasticidad de interneuronas provenientes de L2/3 y L5.

La iLTD que genera 5-HT en PFC podría ser clave en la neurobiología de procesos cognitivos y neuropatologías, tales como en alucinaciones, siendo en efecto 5-HT_{2A} un blanco farmacológico para regular neuropatologías como la psicosis en esquizofrenia (González-Maeso et al., 2007; Moreno et al., 2011). En este trabajo demostramos que la neuromodulación por 5-HT en PFC puede ser tan fina al punto de tener mecanismos de plasticidad GABAérgica que dependen de la

ubicación anatómica de donde provengan estas sinapsis, ya sea en este caso de L2/3 o L5. La especificidad en los mecanismos de plasticidad sináptica que induce la 5-HT en la PFC podría suponer parte de los mecanismos sinápticos/circuitales que subyacen al rol que tiene la 5-HT en diversos y complejos procesos cognitivos tales como en la ansiedad, toma de decisiones e imaginación; además de contribuir a las bases sinápticas de un número importante de neuropatologías. Por lo que comprender la fisiología de la PFC, especialmente la relacionada con la transmisión serotoninérgica, supone un avance importante en la implementación de nuevos tratamientos y blancos farmacológicos para avanzar en tratamientos más eficaces de estas neuropatologías.

CONCLUSION

- 1) La 5-HT ejerce un fuerte control en la transmisión sináptica inhibitoria de la PFC, la activación de 5-HT_R es capaz de inducir iLTD de fibras inhibitorias de capa 2/3 y 5 de la PFC, preferentemente en interneuronas CB1+. A través de esta tesis, demostramos que la iLTD observada en las entradas inhibitorias de L2/3 es dependiente de actividad GABAérgica, y se produce por una disminución en la probabilidad de liberación de GABA en terminales CB1+.
- 2) Para inducir la iLTD en las fibras GABAérgicas provenientes de L2/3, la 5-HT activa en paralelo los receptores 5-HT₃ y 5-HT_{2A}, gatillando un aumento en la activación del receptor GABA_B en el terminal presináptico una desinhibición generada por 5-HT₃, en conjunto, una activación de CB1_R en el terminal presináptico por activación de 5-HT_{2A}. Al activarse CB1_R y GABA_B se induce una disminución a largo plazo en la probabilidad de liberación de GABA.
- 3) En el caso de L5, la iLTD inducida por 5-HT se expresa tanto a nivel presináptico y postsináptico en entradas GABAérgicas CB1+. En las entradas sinápticas de L5, la iLTD se gatilla por dos vías independientes. La primera es mediante la activación de 5-HT_{1A} en la neurona piramidal, induciendo una disminución postsináptica en la transmisión GABAérgica. La segunda es por activación de 5-HT_{2A} en la neurona postsináptica, generando la liberación de eCBs y posterior activación de CB1_R en el terminal presináptico para inducir una disminución la probabilidad de liberación de GABA.
- 4) Tanto la iLTD de L2/3 y L5 pueden ejercer un fuerte control en la fisiología de la PFC, y podrían ayudar a comprender las bases celulares de diversos procesos cognitivos y neuropatologías.

REFERENCIAS

- Aboitiz, F. (1992). The evolutionary origin of the mammalian cerebral cortex. *Biol. Res.* 25, 41–49.
- Abraham, W.C., and Bear, M.F. (1996). Metaplasticity: the plasticity of synaptic plasticity. *Trends in Neurosciences* 19, 126–130.
- van Aerde, K.I., and Feldmeyer, D. (2015). Morphological and Physiological Characterization of Pyramidal Neuron Subtypes in Rat Medial Prefrontal Cortex. *Cerebral Cortex* 25, 788–805.
- Ahumada, J., de Sevilla, D.F., Couve, A., Buño, W., and Fuenzalida, M. (2013). Long-term depression of inhibitory synaptic transmission induced by spike-timing dependent plasticity requires coactivation of endocannabinoid and muscarinic receptors: CB1 AND M AC H RECEPTORS REGULATE THE STDP- I LTD. *Hippocampus* 23, 1439–1452.
- Albert, P.R., Vahid-Ansari, F., and Luckhart, C. (2014). Serotonin-prefrontal cortical circuitry in anxiety and depression phenotypes: pivotal role of pre- and post-synaptic 5-HT1A receptor expression. *Front. Behav. Neurosci.* 8.
- Andrade, R. (1998). Regulation of Membrane Excitability in the Central Nervous System by Serotonin Receptor Subtypes. *Annals of the New York Academy of Sciences* 861, 190–203.
- Andrade, R., and Nicoll, R.A. (1987). Pharmacologically distinct actions of serotonin on single pyramidal neurones of the rat hippocampus recorded in vitro. *J Physiol* 394, 99–124.
- Araneda, R., and Andrade, R. (1991). 5-Hydroxytryptamine₂ and 5-hydroxytryptamine_{1A} receptors mediate opposing responses on membrane excitability in rat association cortex. *Neuroscience* 40, 399–412.
- Arendt, D., Tosches, M.A., and Marlow, H. (2016). From nerve net to nerve ring, nerve cord and brain — evolution of the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 17, 61–72.
- Armstrong, C., and Soltesz, I. (2012). Basket cell dichotomy in microcircuit function: Basket cells as dichotomous microcircuit modulators. *The Journal of Physiology* 590, 683–694.
- Atwood, B.K., Lovinger, D.M., and Mathur, B.N. (2014). Presynaptic long-term depression mediated by Gi/o-coupled receptors. *Trends in Neurosciences* 37, 663–673.
- Augustine, G.J., and Kasai, H. (2007). Bernard Katz, quantal transmitter release and the foundations of presynaptic physiology: Classical Perspectives. *The Journal of Physiology* 578, 623–625.
- Ayzenshtat, I., Karnani, M.M., Jackson, J., and Yuste, R. (2016). Cortical Control of Spatial Resolution by VIP+ Interneurons. *J. Neurosci.* 36, 11498–11509.

- Azmitia, E.C., Gannon, P.J., Kheck, N.M., and Whitaker-Azmitia, P.M. (1996). Cellular localization of the 5-HT_{1A} receptor in primate brain neurons and glial cells. *Neuropsychopharmacology* *14*, 35–46.
- Aznar, S., Qian, Z., Shah, R., Rahbek, B., and Knudsen, G.M. (2003). The 5-HT_{1A} serotonin receptor is located on calbindin- and parvalbumin-containing neurons in the rat brain. *Brain Research* *959*, 58–67.
- Bailey, C.H., Giustetto, M., Huang, Y.-Y., Hawkins, R.D., and Kandel, E.R. (2000). Is Heterosynaptic modulation essential for stabilizing hebbian plasticity and memory. *Nature Reviews Neuroscience* *1*, 11.
- Bardin, L. (2011). The complex role of serotonin and 5-HT receptors in chronic pain: Behavioural Pharmacology *22*, 390–404.
- Barnes, N.M., and Neumaier, J.F. (2011). Neuronal 5-HT receptors and SERT. *Tocris Bioscience Scientific Review Series* *34*, 1–15.
- Barnes, N.M., and Sharp, T. (1999). A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* *38*, 1083–1152.
- Barre, A., Berthoux, C., Bundel, D.D., Valjent, E., Bockaert, J., Marin, P., and Bécamel, C. (2016). Presynaptic serotonin 2A receptors modulate thalamocortical plasticity and associative learning. *PNAS* *113*, E1382–E1391.
- Bartho, P. (2004). Characterization of Neocortical Principal Cells and Interneurons by Network Interactions and Extracellular Features. *Journal of Neurophysiology* *92*, 600–608.
- Bartos, M., and Elgueta, C. (2012). Functional characteristics of parvalbumin- and cholecystokinin-expressing basket cells: Parvalbumin- and cholecystokinin-expressing basket cells. *The Journal of Physiology* *590*, 669–681.
- Batista-Brito, R., Vinck, M., Ferguson, K.A., Chang, J.T., Laubender, D., Lur, G., Mossner, J.M., Hernandez, V.G., Ramakrishnan, C., Deisseroth, K., et al. (2017). Developmental Dysfunction of VIP Interneurons Impairs Cortical Circuits. *Neuron* *95*, 884-895.e9.
- Bean, B.P. (2007). The action potential in mammalian central neurons. *Nature Reviews Neuroscience* *8*, 451–465.
- Bear, M.F., and Malenka, R.C. (1994). Synaptic plasticity: LTP and LTD. *Current Opinion in Neurobiology* *4*, 389–399.
- Béique, J.-C., Imad, M., Mladenovic, L., Gingrich, J.A., and Andrade, R. (2007). Mechanism of the 5-hydroxytryptamine 2A receptor-mediated facilitation of synaptic activity in prefrontal cortex. *PNAS* *104*, 9870–9875.
- Berthoux, C., Barre, A., Bockaert, J., Marin, P., and Bécamel, C. (2019). Sustained Activation of Postsynaptic 5-HT_{2A} Receptors Gates Plasticity at Prefrontal Cortex Synapses. *Cerebral Cortex* *29*, 1659–1669.
- Best, A.R., and Regehr, W.G. (2008). Serotonin Evokes Endocannabinoid Release and Retrogradely Suppresses Excitatory Synapses. *Journal of Neuroscience* *28*, 6508–6515.

- Blier, P., and de Montigny, C. (1998). Possible serotonergic mechanisms underlying the antidepressant and anti-obsessive-compulsive disorder responses. *Biological Psychiatry* *44*, 313–323.
- Bliss, T.V., and Lømo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of Physiology* *232*, 331–356.
- Bonansco, C., and Fuenzalida, M. (2016). Plasticity of Hippocampal Excitatory-Inhibitory Balance: Missing the Synaptic Control in the Epileptic Brain. *Neural Plasticity* *2016*, e8607038.
- Buckner, R.L., and Krienen, F.M. (2013). The evolution of distributed association networks in the human brain. *Trends in Cognitive Sciences* *17*, 648–665.
- Burattini, C., Battistini, G., Tamagnini, F., and Aicardi, G. (2014). Low-frequency stimulation evokes serotonin release in the nucleus accumbens and induces long-term depression via production of endocannabinoid. *Journal of Neurophysiology* *111*, 1046–1055.
- Buzsáki, G. (1984). Feed-forward inhibition in the hippocampal formation. *Progress in Neurobiology* *22*, 131–153.
- Cai, X., Gu, Z., Zhong, P., Ren, Y., and Yan, Z. (2002). Serotonin 5-HT_{1A} Receptors Regulate AMPA Receptor Channels through Inhibiting Ca²⁺/Calmodulin-dependent Kinase II in Prefrontal Cortical Pyramidal Neurons. *Journal of Biological Chemistry* *277*, 36553–36562.
- Cauli, B., Porter, J.T., Tsuzuki, K., Lambolez, B., Rossier, J., Quenet, B., and Audinat, E. (2000). Classification of fusiform neocortical interneurons based on unsupervised clustering. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *97*, 6144–6149.
- Cea del Rio, C.A.C., Lawrence, J.J., Tricoire, L., Erdelyi, F., Szabo, G., and McBain, C.J. (2010). M3 Muscarinic Acetylcholine Receptor Expression Confers Differential Cholinergic Modulation to Neurochemically Distinct Hippocampal Basket Cell Subtypes. *J. Neurosci.* *30*, 6011–6024.
- Celada, P., Puig, M.V., Casanovas, J.M., Guillazo, G., and Artigas, F. (2001). Control of dorsal raphe serotonergic neurons by the medial prefrontal cortex: involvement of serotonin-1A, GABAA, and glutamate receptors. *The Journal of Neuroscience* *21*, 9917–9929.
- Celada, P., Puig, M.V., and Artigas, F. (2013). Serotonin modulation of cortical neurons and networks. *Front Integr Neurosci* *7*.
- Chevalleyre, V., and Castillo, P.E. (2004). Endocannabinoid-mediated metaplasticity in the hippocampus. *Neuron* *43*, 871–881.
- Chevalleyre, V., Takahashi, K.A., and Castillo, P.E. (2006). Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity in the CNS. *Annu. Rev. Neurosci.* *29*, 37–76.
- Chevalleyre, V., Heifets, B.D., Kaeser, P.S., Südhof, T.C., and Castillo, P.E. (2007). Endocannabinoid-Mediated Long-Term Plasticity Requires cAMP/PKA Signaling and RIM1 α . *Neuron* *54*, 801–812.
- Chiu, C.Q., Puente, N., Grandes, P., and Castillo, P.E. (2010). Dopaminergic Modulation of Endocannabinoid-Mediated Plasticity at GABAergic Synapses in the Prefrontal Cortex. *J. Neurosci.* *30*, 7236–7248.

- Chiu, C.Q., Lur, G., Morse, T.M., Carnevale, N.T., Ellis-Davies, G.C.R., and Higley, M.J. (2013). Compartmentalization of GABAergic Inhibition by Dendritic Spines. *Science* 340, 759–762.
- Chiu, C.Q., Martenson, J.S., Yamazaki, M., Natsume, R., Sakimura, K., Tomita, S., Tavalin, S.J., and Higley, M.J. (2018). Input-Specific NMDAR-Dependent Potentiation of Dendritic GABAergic Inhibition. *Neuron* 97, 368-377.e3.
- Cohen, J.E., Onyike, C.U., McElroy, V.L., Lin, A.H., and Abrams, T.W. (2003). Pharmacological Characterization of an Adenylyl Cyclase-Coupled 5-HT Receptor in Aplysia: Comparison With Mammalian 5-HT Receptors. *Journal of Neurophysiology* 89, 1440–1455.
- Cole, M.W., Yarkoni, T., Repovs, G., Anticevic, A., and Braver, T.S. (2012). Global Connectivity of Prefrontal Cortex Predicts Cognitive Control and Intelligence. *Journal of Neuroscience* 32, 8988–8999.
- Connelly, W.M., Errington, A.C., Giovanni, G.D., and Crunelli, V. (2013). Metabotropic regulation of extrasynaptic GABAA receptors. *Frontiers in Neural Circuits* 7.
- Cruz, D.A., Eggan, S.M., Azmitia, E.C., and Lewis, D.A. (2004). Serotonin1A receptors at the axon initial segment of prefrontal pyramidal neurons in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 161, 739–742.
- Curtis, C.E., and D'Esposito, M. (2003). Persistent activity in the prefrontal cortex during working memory. *Trends in Cognitive Sciences* 7, 415–423.
- Davis, G.W. (2006). Homeostatic control of neural activity: from phenomenology to molecular design. *Annu. Rev. Neurosci.* 29, 307–323.
- Davis, G.W., and Goodman, C.S. (1998). Synapse-specific control of synaptic efficacy at the terminals of a single neuron. *Nature* 392, 82–86.
- Debanne, D., Guérineau, N.C., Gähwiler, B.H., and Thompson, S.M. (1996). Paired-pulse facilitation and depression at unitary synapses in rat hippocampus: quantal fluctuation affects subsequent release. *The Journal of Physiology* 491, 163–176.
- DeFelipe, J., López-Cruz, P.L., Benavides-Piccione, R., Bielza, C., Larrañaga, P., Anderson, S., Burkhalter, A., Cauli, B., Fairén, A., Feldmeyer, D., et al. (2013). New insights into the classification and nomenclature of cortical GABAergic interneurons. *Nature Reviews Neuroscience* 14, 202–216.
- Del Castillo, J., and Katz, B. (1954). Quantal components of the end-plate potential. *The Journal of Physiology* 124, 560.
- Dembrow, N., and Johnston, D. (2014). Subcircuit-specific neuromodulation in the prefrontal cortex. *Frontiers in Neural Circuits* 8.
- Douglas, R.J., and Martin, K.A.C. (2004). NEURONAL CIRCUITS OF THE NEOCORTEX. *Annual Review of Neuroscience* 27, 419–451.
- Elliott, M.C., Tanaka, P.M., Schwark, R.W., and Andrade, R. (2018). Serotonin Differentially Regulates L5 Pyramidal Cell Classes of the Medial Prefrontal Cortex in Rats and Mice. *ENEURO* 5, ENEURO.0305-17.2018.

- Feldman, D.E. (2009). Synaptic Mechanisms for Plasticity in Neocortex. *Annual Review of Neuroscience* 32, 33–55.
- Feng, J., Cai, X., Zhao, J., and Yan, Z. (2001). Serotonin Receptors Modulate GABA_A Receptor Channels through Activation of Anchored Protein Kinase C in Prefrontal Cortical Neurons. *J. Neurosci.* 21, 6502–6511.
- Fink, K.B., and Gothert, M. (2007). 5-HT Receptor Regulation of Neurotransmitter Release. *Pharmacological Reviews* 59, 360–417.
- Fitzjohn, S.M., and Collingridge, G.L. (2002). Calcium stores and synaptic plasticity. *Cell Calcium* 32, 405–411.
- Földy, C., Lee, S.Y., Szabadics, J., Neu, A., and Soltesz, I. (2007). Cell type–specific gating of perisomatic inhibition by cholecystokinin. *Nature Neuroscience* 10, 1128–1130.
- Froemke, R.C. (2015). Plasticity of Cortical Excitatory-Inhibitory Balance. *Annual Review of Neuroscience* 38, 195–219.
- Fukushima, T., Ohtsubo, T., Tsuda, M., Yanagawa, Y., and Hori, Y. (2009). Facilitatory Actions of Serotonin Type 3 Receptors on GABAergic Inhibitory Synaptic Transmission in the Spinal Superficial Dorsal Horn. *Journal of Neurophysiology* 102, 1459–1471.
- Gladding, C.M., Fitzjohn, S.M., and Molnár, E. (2009). Metabotropic Glutamate Receptor-Mediated Long-Term Depression: Molecular Mechanisms. *Pharmacol Rev* 61, 395–412.
- Glanzman, D.L., Mackey, S.L., Hawkins, R.D., Dyke, A.M., Lloyd, P.E., and Kandel, E.R. (1989). Depletion of serotonin in the nervous system of Aplysia reduces the behavioral enhancement of gill withdrawal as well as the heterosynaptic facilitation produced by tail shock. *J. Neurosci.* 9, 4200–4213.
- Glickfeld, L.L., Atallah, B.V., and Scanziani, M. (2008). Complementary Modulation of Somatic Inhibition by Opioids and Cannabinoids. *Journal of Neuroscience* 28, 1824–1832.
- González-Maeso, J., Weisstaub, N.V., Zhou, M., Chan, P., Ivic, L., Ang, R., Lira, A., Bradley-Moore, M., Ge, Y., Zhou, Q., et al. (2007). Hallucinogens Recruit Specific Cortical 5-HT_{2A} Receptor-Mediated Signaling Pathways to Affect Behavior. *Neuron* 53, 439–452.
- Goto, Y., Yang, C.R., and Otani, S. (2010). Functional and dysfunctional synaptic plasticity in prefrontal cortex: roles in psychiatric disorders. *Biological Psychiatry* 67, 199–207.
- Greenhill, S.D., Ranson, A., and Fox, K. (2015). Hebbian and Homeostatic Plasticity Mechanisms in Regular Spiking and Intrinsic Bursting Cells of Cortical Layer 5. *Neuron* 88, 539–552.
- Gupta, A., Wang, Y., and Markram, H. (2000). Organizing principles for a diversity of GABAergic interneurons and synapses in the neocortex. *Science* 287, 273–278.
- Harris, K.D., and Shepherd, G.M.G. (2015). The neocortical circuit: themes and variations. *Nature Neuroscience* 18, 170–181.
- Hashimoto, T., Ishii, T., and Ohmori, H. (1996). Release of Ca²⁺ is the crucial step for the potentiation of IPSCs in the cultured cerebellar Purkinje cells of the rat. *J Physiol* 497, 611–627.

- Hayashi, K., Nakao, K., and Nakamura, K. (2015). Appetitive and Aversive Information Coding in the Primate Dorsal Raphe Nucleus. *Journal of Neuroscience* 35, 6195–6208.
- Hornung, J.-P., and Celio, M.R. (1992). The Selective innervation by serotonergic axons of calbindin-containing interneurons in the neocortex and hippocampus of the marmoset. *J. Comp. Neurol.* 320, 457–467.
- Isaacson, J.S., and Scanziani, M. (2011). How Inhibition Shapes Cortical Activity. *Neuron* 72, 231–243.
- Ishiwata, T., Saito, T., Hasegawa, H., Yazawa, T., Otokawa, M., and Aihara, Y. (2004). Changes of body temperature and extracellular serotonin level in the preoptic area and anterior hypothalamus after thermal or serotonergic pharmacological stimulation of freely moving rats. *Life Sci.* 75, 2665–2675.
- Jackman, S.L., Turecek, J., Belinsky, J.E., and Regehr, W.G. (2016). The calcium sensor synaptotagmin 7 is required for synaptic facilitation. *Nature* 529, 88–91.
- Jakab, R.L., and Goldman-Rakic, P.S. (2000). Segregation of serotonin 5-HT_{2A} and 5-HT₃ receptors in inhibitory circuits of the primate cerebral cortex. *Journal of Comparative Neurology* 417, 337–348.
- Kandel, E.R. (2012). *Principles of neural science* (New York: McGraw-Hill Medical).
- Kandel, E.R., and Tauc, L. (1965a). Heterosynaptic facilitation in neurones of the abdominal ganglion of *Aplysia depilans*. *J Physiol* 181, 1–27.
- Kandel, E.R., and Tauc, L. (1965b). Mechanism of heterosynaptic facilitation in the giant cell of the abdominal ganglion of *Aplysia depilans*. *J Physiol* 181, 28–47.
- Kaplan, R., Schuck, N.W., and Doeller, C.F. (2017). The Role of Mental Maps in Decision-Making. *Trends in Neurosciences* 0.
- Karnani, M.M., Jackson, J., Ayzenshtat, I., Sichani, A.H., Manoocheri, K., Kim, S., and Yuste, R. (2016). Opening Holes in the Blanket of Inhibition: Localized Lateral Disinhibition by VIP Interneurons. *J. Neurosci.* 36, 3471–3480.
- Katz, B. (1971). Quantal mechanism of neural transmitter release. *Science* 173, 123–126.
- Keller, G.B., and Mrsic-Flogel, T.D. (2018). Predictive Processing: A Canonical Cortical Computation. *Neuron* 100, 424–435.
- Kodandaramaiah, S.B., Franzesi, G.T., Chow, B.Y., Boyden, E.S., and Forest, C.R. (2012). Automated whole-cell patch-clamp electrophysiology of neurons in vivo. *Nature Methods* 9, 585–587.
- Krystal, J.H., and State, M.W. (2014). Psychiatric Disorders: Diagnosis to Therapy. *Cell* 157, 201–214.
- Kullmann, D.M., Moreau, A.W., Bakiri, Y., and Nicholson, E. (2012). Plasticity of Inhibition. *Neuron* 75, 951–962.

- Kvitsiani, D., Ranade, S., Hangya, B., Taniguchi, H., Huang, J.Z., and Kepecs, A. (2013). Distinct behavioural and network correlates of two interneuron types in prefrontal cortex. *Nature* 498, 363–366.
- Larkum, M.E., Zhu, J.J., and Sakmann, B. (1999). A new cellular mechanism for coupling inputs arriving at different cortical layers. *Nature* 398, 338–341.
- Lee, S.-H., and Soltesz, I. (2011). Requirement for CB1 but not GABA_B receptors in the cholecystokinin mediated inhibition of GABA release from cholecystokinin expressing basket cells: Cholecystokinin regulation of GABA release. *The Journal of Physiology* 589, 891–902.
- Lee, S., Hjerling-Leffler, J., Zaghera, E., Fishell, G., and Rudy, B. (2010). The Largest Group of Superficial Neocortical GABAergic Interneurons Expresses Ionotropic Serotonin Receptors. *Journal of Neuroscience* 30, 16796–16808.
- Lesch, K.-P., and Waider, J. (2012). Serotonin in the Modulation of Neural Plasticity and Networks: Implications for Neurodevelopmental Disorders. *Neuron* 76, 175–191.
- Manabe, T., Renner, P., and Nicoll, R.A. (1992). Postsynaptic contribution to long-term potentiation revealed by the analysis of miniature synaptic currents. *Nature* 355, 50.
- Marín, O. (2012). Interneuron dysfunction in psychiatric disorders. *Nature Reviews Neuroscience*.
- Martín-Ruiz, R., Puig, M.V., Celada, P., Shapiro, D.A., Roth, B.L., Mengod, G., and Artigas, F. (2001). Control of serotonergic function in medial prefrontal cortex by serotonin-2A receptors through a glutamate-dependent mechanism. *The Journal of Neuroscience* 21, 9856–9866.
- Maturana, H., and Varela, F.J. (2006). *De Maquinas Y Seres Vivos* (Editorial Universitaria).
- Miles, R. (2000). Diversity in Inhibition. *Science* 287, 244–246.
- Moreau, A., Amar, M., Le Roux, N., Morel, N., and Fossier, P. (2010). Serotonergic Fine-Tuning of the Excitation-Inhibition Balance in Rat Visual Cortical Networks. *Cerebral Cortex* 20, 456–467.
- Moreau, A.W., Amar, M., Callebert, J., and Fossier, P. (2013). Serotonergic modulation of LTP at excitatory and inhibitory synapses in the developing rat visual cortex. *Neuroscience* 238, 148–158.
- Moreno, J.L., Holloway, T., Albizu, L., Sealfon, S.C., and González-Maeso, J. (2011). Metabotropic glutamate mGlu2 receptor is necessary for the pharmacological and behavioral effects induced by hallucinogenic 5-HT_{2A} receptor agonists. *Neuroscience Letters* 493, 76–79.
- Murphy, D.L., and Lesch, K.-P. (2008). Targeting the murine serotonin transporter: insights into human neurobiology. *Nature Reviews Neuroscience* 9, 85–96.
- Naughton, M., Mulrooney, J.B., and Leonard, B.E. (2000). A review of the role of serotonin receptors in psychiatric disorders. *Hum. Psychopharmacol. Clin. Exp.* 15, 397–415.
- Navarrete, M., and Araque, A. (2008). Endocannabinoids Mediate Neuron-Astrocyte Communication. *Neuron* 57, 883–893.
- Neu, A., Földy, C., and Soltesz, I. (2007). Postsynaptic origin of CB1-dependent tonic inhibition of GABA release at cholecystokinin-positive basket cell to pyramidal cell synapses in the CA1 region

of the rat hippocampus: Tonic inhibition of CCK+ basket cell to pyramidal cell synapses. *The Journal of Physiology* 578, 233–247.

Neves, G., Cooke, S.F., and Bliss, T.V.P. (2008). Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nat Rev Neurosci* 9, 65–75.

Nugent, F.S., Penick, E.C., and Kauer, J.A. (2007). Opioids block long-term potentiation of inhibitory synapses. *Nature* 446, 1086–1090.

Parrish, J.C., and Nichols, D.E. (2006). Serotonin 5-HT_{2A} receptor activation induces 2-arachidonoylglycerol release through a phospholipase c-dependent mechanism. *Journal of Neurochemistry* 99, 1164–1175.

Perea, G., Gómez, R., Mederos, S., Covelo, A., Ballesteros, J.J., Schlosser, L., Hernández-Vivanco, A., Martín-Fernández, M., Quintana, R., Rayan, A., et al. (2016). Activity-dependent switch of GABAergic inhibition into glutamatergic excitation in astrocyte-neuron networks. *ELife* 5.

Perin, R., Berger, T.K., and Markram, H. (2011). A synaptic organizing principle for cortical neuronal groups. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 5419–5424.

Petersen, C.C.H., and Crochet, S. (2013). Synaptic Computation and Sensory Processing in Neocortical Layer 2/3. *Neuron* 78, 28–48.

Pi, H.-J., Hangya, B., Kvitsiani, D., Sanders, J.I., Huang, Z.J., and Kepecs, A. (2013). Cortical interneurons that specialize in disinhibitory control. *Nature* 503, 521–524.

del Pino, I., Brotons-Mas, J.R., Marques-Smith, A., Marighetto, A., Frick, A., Marín, O., and Rico, B. (2017). Abnormal wiring of CCK+ basket cells disrupts spatial information coding. *Nature Neuroscience* 20, 784–792.

Portas, C.M., Bjorvatn, B., and Ursin, R. (2000). Serotonin and the sleep/wake cycle: special emphasis on microdialysis studies. *Prog. Neurobiol.* 60, 13–35.

Puig, M.V., and Gener, T. (2015). Serotonin Modulation of Prefronto-Hippocampal Rhythms in Health and Disease. *ACS Chemical Neuroscience* 6, 1017–1025.

Puig, M.V., and Gullledge, A.T. (2011). Serotonin and Prefrontal Cortex Function: Neurons, Networks, and Circuits. *Molecular Neurobiology* 44, 449–464.

Rakic, P. (2009). Evolution of the neocortex: Perspective from developmental biology. *Nat Rev Neurosci* 10, 724–735.

Riad, M., Garcia, S., Watkins, K.C., Jodoin, N., Doucet, E., Langlois, X., el Mestikawy, S., Hamon, M., and Descarries, L. (2000). Somatodendritic localization of 5-HT_{1A} and preterminal axonal localization of 5-HT_{1B} serotonin receptors in adult rat brain. *J. Comp. Neurol.* 417, 181–194.

Robin, L.M., Oliveira da Cruz, J.F., Langlais, V.C., Martin-Fernandez, M., Metna-Laurent, M., Busquets-Garcia, A., Bellocchio, L., Soria-Gomez, E., Papouin, T., Varilh, M., et al. (2018). Astroglial CB₁ Receptors Determine Synaptic D-Serine Availability to Enable Recognition Memory. *Neuron* 98, 935-944.e5.

Rudy, B., Fishell, G., Lee, S., and Hjerling-Leffler, J. (2011). Three groups of interneurons account for nearly 100% of neocortical GABAergic neurons. *Developmental Neurobiology* 71, 45–61.

- Savanthrapadian, S., Meyer, T., Elgueta, C., Booker, S.A., Vida, I., and Bartos, M. (2014). Synaptic Properties of SOM- and CCK-Expressing Cells in Dentate Gyrus Interneuron Networks. *J. Neurosci.* *34*, 8197–8209.
- Schneggenburger, R., and Rosenmund, C. (2015). Molecular mechanisms governing Ca²⁺ regulation of evoked and spontaneous release. *Nature Neuroscience* *18*, 935–941.
- Sjöström, P.J. (2012). Spike-timing dependent plasticity (Frontiers Media SA).
- Smiley, J.F., and Goldman-Rakic, P.S. (1996). Serotonergic axons in monkey prefrontal cerebral cortex synapse predominantly on interneurons as demonstrated by serial section electron microscopy. *J. Comp. Neurol.* *367*, 431–443.
- Stahl, S.M. (1998). Mechanism of action of serotonin selective reuptake inhibitors: serotonin receptors and pathways mediate therapeutic effects and side effects. *Journal of Affective Disorders* *51*, 215–235.
- Stuart, G.J. (2012). Dendritic Spikes Veto Inhibition. *Neuron* *75*, 744–746.
- Stuart, G., and Sakmann, B. (1995). Amplification of EPSPs by axosomatic sodium channels in neocortical pyramidal neurons. *Neuron* *15*, 1065–1076.
- Stuart, G.J., and Spruston, N. (2015). Dendritic integration: 60 years of progress. *Nature Neuroscience* *18*, 1713–1721.
- Sun, Q., Li, X., Ren, M., Zhao, M., Zhong, Q., Ren, Y., Luo, P., Ni, H., Zhang, X., Zhang, C., et al. (2019). A whole-brain map of long-range inputs to GABAergic interneurons in the mouse medial prefrontal cortex. *Nature Neuroscience* *22*, 1357.
- Swanson, C.J., Bures, M., Johnson, M.P., Linden, A.-M., Monn, J.A., and Schoepp, D.D. (2005). Metabotropic glutamate receptors as novel targets for anxiety and stress disorders. *Nature Reviews Drug Discovery* *4*, 131–144.
- Taniguchi, H., He, M., Wu, P., Kim, S., Paik, R., Sugino, K., Kvitsani, D., Fu, Y., Lu, J., Lin, Y., et al. (2011). A Resource of Cre Driver Lines for Genetic Targeting of GABAergic Neurons in Cerebral Cortex. *Neuron* *71*, 995–1013.
- Ting, J.T., and Feng, G. (2008). Glutamatergic synaptic dysfunction and obsessive-compulsive disorder. *Current Chemical Genomics* *2*, 62.
- Tononi, G., and Koch, C. (2015). Consciousness: here, there and everywhere? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* *370*, 20140167–20140167.
- Tovote, P., Fadok, J.P., and Lüthi, A. (2015). Neuronal circuits for fear and anxiety. *Nature Reviews Neuroscience* *16*, 317–331.
- Vertes, R.P. (2004). Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse* *51*, 32–58.
- Vickery, R.M., Morris, S.H., and Bindman, L.J. (1997). Metabotropic Glutamate Receptors Are Involved in Long-Term Potentiation in Isolated Slices of Rat Medial Frontal Cortex. *Journal of Neurophysiology* *78*, 3039–3046.

- Villalobos, C., Beique, J.-C., Gingrich, J.A., and Andrade, R. (2005). Serotonergic regulation of calcium-activated potassium currents in rodent prefrontal cortex. *European Journal of Neuroscience* 22, 1120–1126.
- Wang, H., Hu, L., Liu, C., Su, Z., Wang, L., Pan, G., Guo, Y., and He, J. (2016). 5-HT₂ receptors mediate functional modulation of GABA_A receptors and inhibitory synaptic transmissions in human iPS-derived neurons. *Sci Rep* 6, 20033.
- Wenner, P. (2011). Mechanisms of GABAergic Homeostatic Plasticity. *Neural Plasticity* 2011, 1–6.
- Xu, X., Roby, K.D., and Callaway, E.M. (2010). Immunochemical characterization of inhibitory mouse cortical neurons: Three chemically distinct classes of inhibitory cells. *Journal of Comparative Neurology* 518, 389–404.
- Yang, Y., and Calakos, N. (2013). Presynaptic long-term plasticity. *Frontiers in Synaptic Neuroscience* 5.
- Yger, P., and Gilson, M. (2015). Models of Metaplasticity: A Review of Concepts. *Front. Comput. Neurosci* 138.
- Yizhar, O., Fenno, L.E., Prigge, M., Schneider, F., Davidson, T.J., O’Shea, D.J., Sohal, V.S., Goshen, I., Finkelstein, J., Paz, J.T., et al. (2011). Neocortical excitation/inhibition balance in information processing and social dysfunction. *Nature* 477, 171–178.
- Zaitsev, A.V., Povysheva, N.V., Gonzalez-Burgos, G., and Lewis, D.A. (2012). Electrophysiological classes of layer 2/3 pyramidal cells in monkey prefrontal cortex. *Journal of Neurophysiology* 108, 595–609.
- Zhong, P., Liu, W., Gu, Z., and Yan, Z. (2008). Serotonin facilitates long-term depression induction in prefrontal cortex via p38 MAPK/Rab5-mediated enhancement of AMPA receptor internalization: Serotonergic regulation of synaptic plasticity in PFC. *The Journal of Physiology* 586, 4465–4479.
- Zhou, F.-M., and Hablitz, J.J. (1999). Activation of serotonin receptors modulates synaptic transmission in rat cerebral cortex. *Journal of Neurophysiology* 82, 2989–2999.
- Zou, S., and Kumar, U. (2015). Colocalization of cannabinoid receptor 1 with somatostatin and neuronal nitric oxide synthase in rat brain hippocampus. *Brain Research* 1622, 114–126.
- Zucker, R.S., and Regehr, W.G. (2002). SHORT-TERM SYNAPTIC PLASTICITY. *Annual Review of Physiology* 64, 355–405.
- (2007). *The hippocampus book* (Oxford ; New York: Oxford University Press).