



**FACULTAD DE CIENCIAS  
PROGRAMA DE MAGÍSTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
MENCIÓN NEUROCIENCIA**

**PAPEL DE LOS CANALES DE  $K^+$  ACTIVADOS POR  $Ca^{2+}$  y VOLTAJE (BK) EN LA  
INDUCCIÓN DE LA DEPRESIÓN A LARGO PLAZO (LTD) EN EL HIPOCAMPO  
NEONATAL**

**CARLOS ANCATÉN GONZÁLEZ**

**Director de Tesis**

**Dr. Andrés E. Chávez**

**2019**

## Tabla de contenidos

Abreviaciones.....	iv
Lista de Figuras .....	vi
Agradecimientos.....	vii
Resumen .....	x
<b>1 Introducción .....</b>	<b>1</b>
1.1 <i>Mecanismos involucrados en la plasticidad sináptica</i> .....	2
1.2 <i>Depresión a largo plazo mediada por receptores mGluR</i> .....	4
1.3 <i>12-HPETE mediante la activación de TRPV1 genera una LTD en sinapsis excitadoras sobre interneuronas</i> .....	7
1.4 <i>Canales de potasio (K<sup>+</sup>) activados por calcio (Ca<sup>2+</sup>) de alta conductancia (BK) y su posible papel en la generación de LTD mediada por 12-(s)-HPETE</i> .....	9
<b>2. Problema.....</b>	<b>13</b>
2.1 <i>Hipótesis</i> .....	13
2.3 <i>Objetivo General y Específicos</i> .....	13
<b>3. Material y Métodos .....</b>	<b>14</b>
3.1 <i>Animales</i> .....	14
3.2 <i>Preparación de las rebanadas de hipocampo</i> .....	14
3.3 <i>Registros electrofisiológicos</i> .....	14
3.4 <i>Análisis de datos y estadísticas</i> .....	16
<b>4. Resultados.....</b>	<b>18</b>
4.1 <i>La estimulación repetitiva de baja frecuencia genera una LTD pre-sináptica que requiere mGluR y 12-(s)-HPETE en el hipocampo neonatal</i> .....	18
4.2 <i>La activación exógena de los receptores mGluR genera una LTD que requiere del metabolito 12-(s)-HPETE</i> .....	21
4.3 <i>Los canales de BK que contienen la subunidad <math>\beta 4</math> son necesarios para la inducción pero no la expresión de una mGluR-LTD en el hipocampo neonatal.</i> .....	26

.....	¡Error! Marcador no definido.
<i>4.4 12-(s)-HPETE actúa directamente sobre los canales BK modificando la probabilidad de liberación de neurotransmisor en las sinapsis CA3-CA1 del hipocampo neonatal.....</i>	<b>32</b>
<b>5    <b>Discusión</b> .....</b>	<b>38</b>
<i>5.1    <b>Cambios en la expresión y/o función de BK en diferentes etapas del desarrollo en el hipocampo</b>.....</i>	<b>38</b>
<i>5.2    <b>BK<sub>β4</sub> pero no BK<sub>β2</sub> son necesarios y suficientes para evocar un LTD pre-sináptica en el hipocampo neonatal</b>.....</i>	<b>40</b>
<i>5.4    <b>Acoplamiento de BK con canales de Ca<sup>2+</sup> en la generación de la depresión sináptica a largo plazo</b>.....</i>	<b>42</b>
<i>5.5    <b>Implicancias funcionales</b>.....</i>	<b>43</b>
<b>6    <b>Referencias</b>.....</b>	<b>46</b>

## Lista de Figuras

Figura 1: Modelo de LTP y LTD post- sináptica.

Figura 2: Vías de síntesis del metabolito 12-HpETE a partir de los fosfolípidos de la membrana plasmática.

Figura 3: Modelo de mGluR-LTD que requiere 12-(S)-HPETE y la activación de TRPV1 en el hipocampo.

Figura 4: Esquema representativo del posicionamiento de los electrodos de registro y estimulación en las rebanadas de hipocampo.

Figura 5. La activación repetitiva de baja frecuencia genera una LTD en el hipocampo neonatal que requiere la activación de mGluR y de la generación del producto del ácido araquidónico 12-(S)-HPETE.

Figura 6. 12-(S)-HPETE genera una LTD que es independiente de TRPV1 y exclusiva de etapas tempranas de desarrollo.

Figura 7. El receptor mGluR tipo I y el eicosanoide 12-(S)-HPETE comparten la misma vía de señalización para inducir una depresión sináptica a largo plazo.

Figura 8. Los canales BK que contienen la subunidad  $\beta_4$  son requeridos para la inducción, pero no la expresión de la LTD en el hipocampo neonatal.

Figura 9. La inhibición de  $BK_{\beta_4}$  en los terminales pre-sinápticos eliminan la depresión inducida por el metabolito 12-(s)-HPETE

Figura 10: 12-(S)-HPETE produce genera una disminución en la Pr en los terminales sinápticos de las sinapsis excitadoras CA3-CA1 en el hipocampo neonatal.

Figura 11: La inhibición de  $BK_{\beta_4}$  en los terminales pre-sinápticos elimina los efectos de 12-(S)-HPETE sobre la Pr en las sinapsis excitadoras CA3-CA1 en el hipocampo neonatal.

Figura 12. El bloqueo de los canales de BK modifica el potencial de acción pre-sináptico y la transmisión sináptica basal de las sinapsis excitadoras CA3-CA1 en el hipocampo neonatal.

Figura 13: Potencial modelo para la generación de mGluR-LTD en el hipocampo neonatal mediante la activación de  $BK_{\beta_4}$

- Proyecto FONDECYT 1151091
- Centro Interdisciplinario de Neurociencia (CINV): Proyecto código P09-022F
- Iniciativas Estudiantiles de la Universidad de Valparaíso 2018 Convenio de Desempeño:  
"Desarrollo de una plataforma interdisciplinaria para la innovación en salud: Un referente internacional en el desarrollo de medicina de precisión" PM UVA 1402
- Programa de Magíster en Ciencias Biológicas mención Neurociencia, Facultad de Ciencias, Universidad de Valparaíso.

En el sistema nervioso central (SNC), las neuronas se comunican entre ellas por un proceso llamado sinapsis. La comunicación en las sinapsis, se denomina transmisión sináptica, y sufre modificaciones como consecuencias de la actividad neuronal, aumentando o disminuyendo su eficacia. Cambios en la eficacia sináptica, base de procesos cognitivos como el aprendizaje y la memoria, suceden a través de una variedad de mecanismos celulares tanto en neuronas pre- como postsinápticas y en diferentes circuitos neuronales a través del SNC. Estos cambios pueden suceder a corto (desde segundos a minutos) o a largo plazo (desde minutos a horas y hasta días). En el área CA1 del hipocampo neonatal ( $P < 10$  días) se ha demostrado que el ácido 12 (s) -hidroperoxi-5Z, 8Z, 10E, 14Z- eicosatetraenoico (12-(s)-HPETE), un metabolito del ácido araquidónico (AA), satisface todos los criterios de una molécula mensajera retrógrada necesaria para la inducción de una depresión de la transmisión sináptica a largo plazo (LTD). Esta LTD es dependiente de la activación de receptores metabotrópicos de glutamato del tipo 1 (mGluR<sub>1/5</sub>) y se expresa con cambios en la probabilidad de liberación (Pr) del neurotransmisor glutamato desde los axones terminales de las colaterales de Schaffer.

En las sinapsis excitatorias entre los terminales axonales de las neuronas de CA3 y las interneuronas GABAérgicas en el área CA1 del hipocampo adulto, se ha propuesto que el metabolito 12-(s)-HPETE es necesario para la inducción de una mGluR-LTD. Esta depresión estaría mediada por la activación de un canal catiónico no-selectivo, conocido como TRPV1. Sin embargo, experimentos previos de nuestro laboratorio sugieren que en las sinapsis excitadoras entre los terminales axonales de las neuronas de CA3 y las neuronas de CA1 en el hipocampo neonatal los canales de TRPV1 no participarían en la LTD inducida por el metabolito 12-(s)-HPETE. De este modo, a la fecha, cómo exactamente este metabolito genera cambios en la Pr a largo plazo en el hipocampo neonatal se desconoce. La evidencia nos demuestra que (i) este metabolito puede generar vasodilatación mediante la activación de canales de potasio ( $K^+$ ) activado por calcio ( $Ca^{2+}$ ) de alta conductancia (BK), y que (ii) los canales BK se encuentran altamente expresados en las neuronas piramidales del hipocampo donde controlan la excitabilidad y liberación del neurotransmisor. Por lo tanto, en el presente trabajo de tesis nos propusimos evaluar, mediante registros electrofisiológicos y farmacología, *si los canales BK juegan un papel en la LTD inducida por el metabolito 12-(s)-HPETE en el hipocampo neonatal*. Para ello, registramos potenciales (fEPSP) y corrientes (EPSCs) post-sinápticas excitatorias en el área CA1 del hipocampo neonatal y la LTD fue evocada mediante una estimulación eléctrica de baja frecuencia (LFS, 5 Hz, 3 min) sobre las colaterales de Schaffer o mediante la aplicación exógena de DHPG (50  $\mu$ M, 5 min), un agonista de los mGluR<sub>1/5</sub> en la presencia y ausencia de bloqueadores selectivos de los canales BK.

Nuestros resultados nos demuestran que la Paxilina, un bloqueador de canales BK que contienen la subunidad  $\beta_2$  y  $\beta_4$  (BK $_{\beta_2}$ /BK $_{\beta_4}$ ), pero no la iberiotoxina, un bloqueador de los canales BK que contienen la subunidad  $\beta_2$  (BK $_{\beta_2}$ ), eliminan tanto la LTD evocada por la LFS como por DHPG. Además, descubrimos que los canales BK $_{\beta_4}$  solo se requieren durante la inducción, pero no durante la expresión de esta LTD, ya que la paxilina no logró revertir la depresión cuando se aplicó 10 minutos después de la aplicación del protocolo de LFS. Además, observamos que el bloqueo de los canales BK $_{\beta_4}$  elimina los efectos de la aplicación exógena de 12-(s)-HPETE sobre los potenciales post-sinápticos excitatorios y aumentan la transmisión sináptica basal, mientras que su activación con el agonista NS11021 (3  $\mu$ M) elimina la inducción de la LTD. Por último, nuestros experimentos nos demuestran que los canales BK $_{\beta_4}$  se encuentran expresados funcionalmente en los terminales pre-sinápticos de las colaterales de Schaffer donde regulan el potencial de acción y la liberación de glutamato.

En su conjunto, nuestros resultados nos demuestran que el metabolito 12-(s)-HPETE mediante la activación de canales de BK $_{\beta_4}$  produce cambios a largo plazo en la transmisión sináptica excitatoria, probablemente mediante una reducción en la Pr durante el proceso de inducción de la LTD. Así, nosotros sugerimos que la activación de BK $_{\beta_4}$  podría disminuir los niveles de  $Ca^{2+}$  en el terminal de las colaterales de Schaffer. Además, nuestros resultados no solo nos revelan un vínculo previamente desconocido entre el metabolito 12-(s)-HPETE y los canales BK en la regulación de la eficacia sináptica en el SNC, sino que también demuestran que los canales BK $_{\beta_4}$  son necesarios para la inducción de una LTD y así, es probable que estos canales jueguen un papel en la regularización de nuevas conexiones sinápticas y en procesos cognitivos como el aprendizaje y la memoria.