FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE MAGISTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS MENCIÓN NEUROCIENCIAS

"EL TRATAMIENTO CON KETAMINA DURANTE LA ADOLESCENCIA DETERIORA LA PLASTICIDAD SINÁPTICA EN CORTEZA PREFRONTAL DE RATÓN ADULTO".

FELIPE GUSTAVO GUIFFRA GÓMEZ.

PROYECTO DE TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN CIENCIAS BIOLOGICAS MENCIÓN NEUROCIENCIAS.

DIRECTOR DE TESIS: PhD. MARCO FUENZALIDA N.

CODIRECTOR: PhD. CHRISTIAN BONANSCO H.

AGRADECIMIENTOS

Con Amor a mi Familia.

FINANCIAMIENTO

Esta tesis se realizó con el financiamiento de:

- Fondecyt regular 117-1006 (Marco Fuenzalida Núñez).

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS 2
FINANCIAMIENTO 3
ÍNDICE 4
ÍNDICE FIGURAS 6
ABREVIATURAS 7
UNIDADES DE MEDIDA 8
RESUMEN 9
ABSTRACT 10
INTRODUCCIÓN 11
Hipofunción del sistema GABAérgico durante el desarrollo y alteraciones de los circuitos de la mPFC. 12
Plasticidad sináptica excitatoria dependiente de actividad e interneuronas en mPFC. 14
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 17
HIPOTESIS 18
La disminución de la transmisión GABAérgica producida por el tratamiento crónico con ketamina durante la adolescencia deteriora la plasticidad sináptica excitatoria a largo plazo de las PYN en mPFC en ratones adultos. 18
OBJETIVOS 19
OBJETIVO GENERAL 19
OBJETIVOS ESPECÍFICOS 19
METODOLOGÍA 20
Metodología general 20
Tratamiento farmacológico: 20
Preparación de rebanadas: 20
Electrofisiología: 21
Análisis de datos: 22
Diseño experimental y metodología especifica. 23
ANÁLISIS COMPLEMENTARIOS. 26
RESULTADOS 29

1.- El tratamiento crónico con Ketamina durante la adolescencia modifica las propiedades eléctricas intrínsecas de la PYN de mPFC de ratones adultos. 29

2.- El tratamiento crónico con Ketamina durante la adolescencia disminuye la eficacia sináptica GABAérgica en corteza prefrontal de ratones adultos. 30

3.- El tratamiento crónico con ketamina durante la adolescencia aumenta la neurotransmisión glutamatérgica en corteza prefrontal de ratones adultos. 33

4.- El tratamiento crónico con ketamina convierte la LTD en LTP. 35

5.- El bloqueo de los receptores GABA-A en ratones adultos no bloquea la inducción de t-LTD en las sinapsis glutamatérgicas de la capa II/III mPFC. 37

DISCUSIÓN 40

CONCLUSIÓN 52

PROYECCIONES 53

BIBLIOGRAFÍA 54

ANEXOS 70

ÍNDICE FIGURAS

Figura Nº1: Esquema representativo del Spike-Timing Dependent Plasticity (STDP)…....17

Figura Nº2: Configuración experimental de la técnica de patch-clamp…….....……...23

Figura Nº3: El tratamiento crónico con Ketamina durante la adolescencia cambia las propiedades eléctricas intrínsecas de la PYN de mPFC de ratones adultos……..30

Figura Nº4: El tratamiento con Ket disminuye la eficacia sináptica GABAérgica en neuronas piramidales del mPFC……32

Figura Nº5: El tratamiento con Ket durante la adolescencia aumenta la eficacia sináptica glutamatérgica en neuronas piramidales del mPFC……..35

Figura Nº6: La inducción de depresión a largo plazo (LTD) por STDP produce la potenciación a largo plazo de la transmisión sináptica excitatoria en ratones tratados con ketamina……36

Figura Nº7: El bloqueo de los receptores GABAA en ratones adultos no afecta la inducción de LTD en las sinapsis glutamatérgicas…….…...37

Anexo 1: La inducción de Potenciación a largo plazo (LTP) por STDP no genera cambios en la eficacia sináptica excitatoria…….……66

ABREVIATURAS

PYN:	Neuronas piramidales
5-HT:	Serotonina
Ach:	Acetilcolina
AMPA:	Ácido α-amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
DA:	Dopamina
DAMGO:	Encefalina [D-Ala (2), N-Me-Phe (4), Gly (5)- ol
EPSC:	Corriente postsinápca excitatoria
EPSP:	Potencial postsináptico excitatorio
EZ:	Esquizofrenia
GABA:	Ácido γ-aminobutírico
GAD67:	glutamato descarboxilasa de 67 kD
IPSC:	Corriente postsinápca inhibitoria
Ket:	Ketamina (2-chlorphenyl-2-methylamino-cyclohexanone)
LTD:	Depresión a largo plazo
LTP:	Potenciación a largo plazo
mIPSC:	Corriente postsinápca inhibitoria en miniatura
MK-801:	Dizocilpina
mPFC:	Corteza prefrontal medial
NMDA:	N-metil-D-Aspartato
PA:	Potenciales de acción
PCP:	Fenciclidina
PPR:	Razón por pulsos pareado
PTX:	Picrotoxina
PV:	Parvoalbumina
PV-IN:	Interneuronas parvoalbumina
sEPSC:	Corrientes postsinápca inhibitoria espontanea
STDP:	Spike timing-dependent plasticity
TTX:	Tetrodotoxina
Veh:	Vehículo

UNIDADES DE MEDIDA

C: grados Celsius	cm: centímetro	Hz: Hertz
min: minuto	MΩ: megaohm	µM: micromolar
ms: milisegundo	mV: milivolt	m: metro
g: gramo	GΩ: gigaohm	mOsm: miliosmol
mL: mililitro	mM: milimolar	
pA: picoamperio	pF: Picofaradio	

RESUMEN

La corteza prefrontal medial (mPFC) es una estructura clave involucrada en funciones cognitivas como la memoria de trabajo y la toma de decisiones. Numerosa evidencia experimental demuestra que cambios a mediano y largo plazo en la eficacia de las sinapsis son fundamentales para muchas funciones cerebrales, incluyendo procesos de aprendizaje y la memoria. Durante el desarrollo postnatal, la maduración de los circuitos de mPFC depende en gran medida de la red de interneuronas inhibidoras, que modulan la función de las neuronas piramidales (PYN). Las interneuronas de la mPFC son especialmente vulnerables a los insultos medioambientales durante la adolescencia y el deterioro de la función de las interneuronas GABAérgicas está implicado en varias enfermedades neuropsiquiátricas, incluida la esquizofrenia (SZ). Aunque la mayoría de los pacientes esquizofrénicos manifiestan profundas alteraciones cognitivas, aún se desconoce cómo alteraciones en el desarrollo de las interneuronas GABAérgicas durante la adolescencia puede afectar la plasticidad sináptica de la mPFC y a las distintas funciones cognitivas que dependen de su funcionamiento. Utilizando aproximaciones electrofisiológicas y farmacológicas, evaluamos si existen cambios en la eficacia de la transmisión y la plasticidad sináptica dependiente de actividad en mPFC en un modelo animal de SZ, basado en el tratamiento con el antagonista no competitivo de receptor NMDA ketamina (Ket) en ratones adolescentes. Mediante registros *patch-clamp* modalidad célula entera en PYN de la capa II / III realizados en rebanadas de mPFC de ratones adultos (P>60), encontramos que la frecuencia de las corrientes inhibidoras postsinápticas espontáneas y en miniatura (sIPSC y mIPSC) disminuyeron en los animales tratados en la adolescencia con Ket, sin cambios en la amplitud de estas corrientes espontáneas. Además, observamos que la razón por pulsos pareado (PPR) de las IPSC evocadas (eIPSC) fue mayor en el grupo Ket que en el control, lo cual sugiere una menor probabilidad de liberación GABAérgica. Para analizar los cambios plásticos a largo plazo en la transmisión excitatoria en animales tratados con Ket, utilizamos el protocolo de spike timing-dependent plasticity (STDP) el cual mediante la asociación entre la actividad pre y postsináptica puede inducir potenciación a largo plazo (t-LTP) o depresión a largo plazo (t-LTD) dependiendo del orden temporal entre los potenciales de acción pre y postsinápticos. Observamos que el protocolo de t-LTP no indujo cambios en la eficacia sináptica glutamatérgica a largo plazo en ambos grupos. Sin embargo, el protocolo t-LTD generó la potenciación a largo plazo en el grupo Ket. En conjunto los resultados presentados en este trabajo sugieren que el tratamiento con Ket durante la adolescencia altera la eficacia sináptica GABAérgica y la plasticidad sináptica, lo que podría modificar los circuitos de la PFC y su correcto funcionamiento en edad adulta.

ABSTRACT

The medial prefrontal cortex (mPFC) is a key structure involved in cognitive functions such as working memory and decision making. Numerous experimental shreds of evidence demonstrate that medium and long-term changes in the efficacy of synapses are fundamental to many brain functions, including learning processes and memory. During postnatal development, the maturation of mPFC circuits depends largely on the network of inhibitory interneurons, which modulate the function of pyramidal neurons (PYN). The mPFC interneurons are especially vulnerable to environmental insults during adolescence and the GABAergic interneuron function disorder is implicated in several neuropsychiatric diseases, including schizophrenia (SZ). Although most schizophrenic patients manifest deep cognitive alterations, it is still unknown how the disruption of GABAergic interneurons development during adolescence can affect the long-term synaptic plasticity of mPFC and the different cognitive functions that depend on this structure. Using electrophysiological and pharmacological approaches, we evaluate the efficacy of synaptic transmission and spike-timing-dependent plasticity in mPFC in an SZ mice model based on the adolescent treatment with non-competitive NMDAR antagonist ketamine (Ket). Through whole-cell patch-clamp recordings in PYN of the layer II / III of mPFC slices in adulthood (P> 60), we found the frequency of spontaneous and miniature inhibitory post-synaptic currents (sIPSC and mIPSC) were lower in Ket treated animals than controls. Also, we observed that the paired-pulse ratio of eIPSC was higher in Ket mPFC slices than in controls, without changes in the amplitude of these spontaneous currents. In addition, we observed that paired pulses ratio (PPR) of the evoked IPSCs (eIPSC) was higher in the Ket group than in the control, suggesting a lower probability of GABAergic release from interneurons. To analyze the long-term plastic changes in excitatory transmission in animals treated with Ket, we use the spike-timing-dependent plasticity (STDP) protocol which, through the association between pre and postsynaptic activity, can induce long-term potentiation (t-LTP) or long-term depression (t-LTD) depending on the temporal order between pre and postsynaptic potentials. We found that while the t-LTP protocol was unable to induce long-term changes in glutamatergic synaptic efficacy, the t-LTD protocol does not induce depression, conversely, it can induce potentiation in the Ket group. Together, this data suggests that treatment with Ket during adolescence can change the GABAergic synaptic efficacy and synaptic plasticity, which could modify the circuits of PFC and their function in adulthood.

INTRODUCCIÓN

La corteza prefrontal (PFC) es una estructura cerebral que está involucrada en funciones cognitivas superiores tales como la toma de decisión, la memoria de trabajo y las interacciones sociales (Dalley et al., 2004; Groenewegen y Uylings, 2000). Esta estructura encefálica es una de las últimas en madurar, y experimenta profundos cambios estructurales y funcionales en la pubertad que están relacionados con aumentos en la conectividad entre la PFC y diversas estructuras corticales y subcorticales (Caballero y Tseng, 2016), proceso que se ha observado en una variedad de especies incluyendo roedores, primates y humanos (Changeux y Danchin, 1976; Belforte et al., 2010).

El refinamiento de la conectividad neuronal también llamada "poda sináptica" ocurre en las sinapsis glutamatérgicas, proceso que en conjunto con la remodelación del sistema GABAérgico, permiten el correcto establecimiento de los circuitos neuronales de la PFC durante la adolescencia. Este proceso ayuda a establecer el balance excitador-inhibidor (E/I), que es requerido para una adecuada integración de la información aferente desde el tálamo y otras estructuras corticales necesarias para mantener una óptima capacidad funcional de esta estructura (Lisman, 2012; Caballero et al., 2014; Chung et al., 2016).

Los circuitos excitadores de la PFC al igual que otras estructuras cerebrales están integrados en una poderosa red inhibitoria compuesta por distintas clases de interneuronas GABAérgicas (Whissell et al., 2015; Somogyi y Klausberger, 2005). De todas las neuronas GABAérgicas neocorticales casi en su totalidad pertenecen a uno de los tres grupos definidos por la expresión de parvalbúmina (PV), somatostatina (SST), o del receptor de serotonina ionotrópico 5HT3a (5HT3a-R) (Rudy et al., 2011). En la corteza prefrontal medial (mPFC)

las interneuronas positivas para parvo-albumina (PV-IN) y colecistoquinina (CCK-IN) (estas últimas pertenecientes al grupo de las 5HT3a), representan las dos poblaciones más ampliamente distribuidas de interneuronas GABAérgicas perisomática (Whissell et al., 2015). Los circuitos GABAérgicos a través de la inhibición por retroalimentación "*feedback inhibition*", establecen una ventana temporal que otorga la capacidad de integrar la actividad sináptica tanto excitatoria como inhibitoria en las neuronas piramidales (PYN), lo cual permite que estas alcancen o no su umbral de disparo con la consecuente ocurrencia de uno o varios potenciales de acción (Pouille y Scanziani, 2001; Higley y Contreras, 2006; Freund, 2007), además, las PV-IN corticales están implicadas en la regulación del balance E/I mediante modificaciones dependientes de actividad de su eficacia inhibitoria sobre las PYN (Xue et al., 2014).

Considerando la importancia de los circuitos inhibitorios para el correcto funcionamiento y maduración de la mPFC, es esperable que una alteración del sistema GABAérgico durante periodos críticos del desarrollo produzca un mal funcionamiento de la mPFC y de las funciones cognitivas asociadas. Diversas alteraciones en la función de las sinapsis GABAérgicas están asociadas a la patogenia de diversos trastornos neurológicos y neuropsiquiátricos (Peng et al., 2013; Perez y Lodge, 2013; Aldrin-Kirk et al., 2014; Godavarthi et al., 2014; Kim et al., 2014; Knoferle et al., 2014; Tong et al., 2014; Zamberletti et al., 2014).

Hipofunción del sistema GABAérgico durante el desarrollo y alteraciones de los circuitos de la mPFC.

Modelos animales genéticos y farmacológicos son utilizados para estudiar la fisiopatología de diversas enfermedades neuropsiquiátricas, dentro de ellos, los modelos

farmacológicos (para Esquizofrenia) que se basan en el bloqueo del receptor para Glutamato N-metil-D-Aspartato (NMDA) mediante el uso de antagonistas no competitivo tales como: Fenciclidina (PCP), Dizocilpina (MK-801) y Ketamina (Ket), generan una disminución de la neurotransmisión GABAérgica sobre las neuronas PYN (Tyler et al., 2017; Zanos et al., 2018; Pérez et al., 2019), lo que trae como consecuencia: desinhibición de las PYN, un aumento de las salidas excitatorias desde la PFC hacia estructuras subcorticales, excitotoxicidad, disrupción de ritmos cerebrales y deficiencia de la memoria de trabajo (Rotaru et al., 2012; Coyle et al., 2012).

La Ket es un fármaco ampliamente utilizado en medicina y en veterinaria, conocido por sus funciones anestésicas, analgésicas y antidepresivas (Tyler et al., 2017; Zanos et al., 2018). Su acción principal es el bloqueo de la conductancia iónica en mayor medida del ion Calcio (Ca^{2+}) uniéndose al sitio PCP del receptor NMDA (Frohlich y Van Horn, 2014; Browne y Lucki, 2013). Datos de nuestro laboratorio sugieren que las inyecciones subanestésicas de Ket (30 mg/kg) durante la adolescencia tardía en ratas (p45 a p51), induce en adultez: una disminución del marcaje para las proteínas PV^{+} en estas interneuronas, una disminución de la enzima glutamato descarboxilasa de 67 kD (GAD67) la cual es crítica para la síntesis de GABA (Bu et al., 1992), y una disminución de la frecuencia de las corrientes postsinápticas inhibitorias espontáneas (sIPSCs) y en miniatura (mIPSCs), lo que reduce significativamente la eficacia de la transmisión inhibitoria sobre las PYN en la capa II / III de mPFC (Pérez et al., 2019). Por lo tanto, el tratamiento con Ket durante la adolescencia parece ser un modelo replicable para generar alteraciones en la eficacia GABAérgica sobre las PYN de mPFC, que perduran a largo plazo durante la adultez.

Plasticidad sináptica excitatoria dependiente de actividad e interneuronas en mPFC.

En relación con las funciones cognitivas asociadas a la PFC, las ratas tratadas con Ket durante la adolescencia tardía presentaron cambios en su comportamiento en edad adulta, tales como un aumento de conductas tipo ansiosas, problemas de interacción social y un deterioro de la memoria de trabajo (Pérez et al., 2019). Para las funciones cognitivas como la memoria y el aprendizaje, son fundamentales los cambios en la eficacia de la transmisión sináptica a corto y largo plazo (Dan y Poo, 2006; Malenka y Bear, 2004), fenómeno que conocemos como plasticidad sináptica.

La plasticidad sináptica se define como la capacidad del sistema nervioso para cambiar en respuesta a modificaciones del ambiente interno o externo, a la experiencia, al aprendizaje o a situaciones patológicas (Citri y Malenka, 2008). En este sentido, la actividad neuronal sincronizada desempeña un papel esencial en la autoorganización dependiente de actividad de las redes cerebrales (Singer, 1995; Uhlhaas et al., 2009), en la estabilización y el refinamiento de las conexiones sinápticas (Wong y Ghosh, 2002), ya que permite el establecimiento de una relación temporal de actividad presináptica y postsináptica que determina si un contacto se puede fortalecer o debilitar. (Huerta y Lisman, 1993, Wespatat et al., 2004).

Existen variados protocolos que pueden aumentar o disminuir la eficacia de la transmisión sináptica a largo plazo, fenómeno denominados como potenciación a largo plazo (LTP) y depresión a largo plazo (LTD) respectivamente. Un protocolo dependiente de actividad es el STDP (del inglés *spike-timing dependent plasticity*) el cual obedece a la regla del aprendizaje sináptico asociativo "tipo hebbiano" que parece subyacer al aprendizaje

asociativo y a los procesos cognitivos (Hebb, 1949). En varias estructuras cerebrales el protocolo de STDP induce LTP, también denominado "*timing LTP"* (t-LTP), cuando los potenciales postsinápticos excitatorios (EPSPs) inducidos por estimulación presináptica coinciden temporalmente con los potenciales de acción postsináptico retropropagados (BAPs) a intervalos entre 0 y 20 ms, por el contrario, se induce "*timing LTD"* (t-LTD) cuando se invierte dicho orden con un retardo, dependiendo de la región cerebral de hasta 100 ms (Fuenzalida et al., 2007; Magee y Johnston, 1997; Markram et al., 1997; Fuenzalida et al., 2010) (ver figura 1). Es importante destacar que esta regla no es rígida, puede variar dependiendo del tipo de sinapsis, del circuito neuronal involucrado y de la presencia de neuromoduladores (Lamsa et al., 2007; Paille et al., 2013; Ruan et al., 2014; Brzosko et al., 2019).

La neurotransmisión GABAérgica, controlan la polaridad del STDP (Paille et al., 2013), es decir, determinan el resultado final (ya sea LTP o LTD) independiente de su asociación temporal pre-post o post-pre del protocolo de STDP. En estructuras corticales y subcorticales la inhibición por retroalimentación genera una reducción en la amplitud y la duración de los potenciales postsinápticos excitadores (EPSP) al aumentar la conductancia de membrana (Pavlov et al., 2014; Yang et al., 2018). Los cambios en la conductancia pueden modificar profundamente la interacción temporal entre los EPSPs y los BAPS, pudiendo modular la inducción de la plasticidad de largo plazo (Fuenzalida et al., 2007). Se ha demostrado que la reducción en la amplitud y duración del EPSP, reduce la ventana temporal de coincidencia para STDP (Fuenzalida et al., 2007; Fuenzalida et al., 2010). Los resultados de simulaciones computacionales proporcionan evidencias de que el cambio en la ventana temporal del STDP puede depender de la inhibición generada por la neurotransmisión

GABAérgica (Cutsuridis, 2008). Además, la inhibición GABAérgica y el aumento de la conductancia dendrítica reducen la retropropagación del potencial de acción, limitando aún más la inducción de plasticidad por STDP (Spruston, 2008).

Estos antecedentes señalan el papel esencial de la transmisión GABAérgica sobre la plasticidad sináptica. Además, el control de los circuitos GABAérgicos sobre las PYN surge como uno de los principales moduladores para la coincidencia pre y postsináptica (en milisegundos) necesaria para inducir plasticidad por STDP en los circuitos cerebrales (Paille et al., 2013).

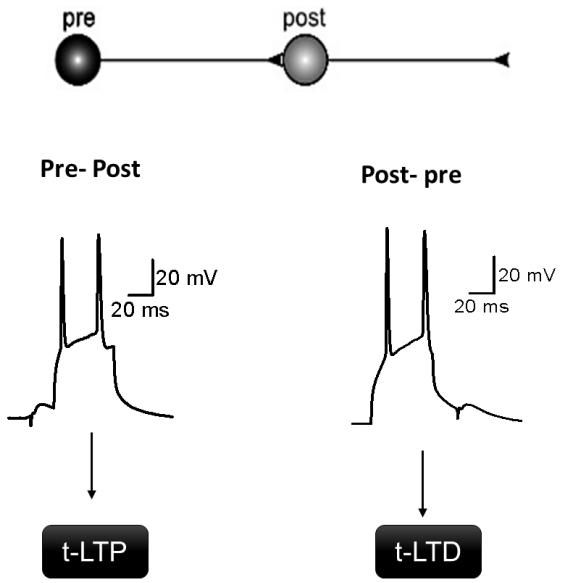


Figura Nº1: Esquema representativo del Spike-Timing Dependent Plasticity (STDP). A.- Representación de un circuito conformado por una neurona presináptica (negra) y postsináptica (gris). **B.-** variaciones de voltaje en una célula cuando se induce el protocolo de STDP, izquierda pre-post, derecha post-pre. La asociación de los estímulos presinápticos y postsinápticos en distinto orden tienen consecuencias plásticas opuestas, pre-post induce LTP mientras que post-pre induce LTD.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

- El sistema GABAérgico es uno de los principales reguladores en la inducción de plasticidad sináptica.
- El tratamiento con Ket durante la adolescencia tardía produce una hipofunción de la transmisión sináptica GABAérgica en la capa II/III de mPFC de ratas adultas.
- A pesar de que mPFC ha sido ampliamente utilizada para estudiar la plasticidad sináptica dependiente de actividad mediada por STDP (Seol, 2007; Xu et al., 2010; Ruan et al., 2014; Brzosko et al., 2019). Se desconoce si el deterioro en la transmisión GABAérgica en mPFC durante la adolescencia puede alterar la plasticidad sináptica a largo plazo en esta estructura durante la adultez. Por lo cual nuestra pregunta de investigación es:

¿Puede la disminución de la transmisión GABAérgica generada por el tratamiento crónico con Ketamina durante la adolescencia modificar la plasticidad sináptica excitatoria a largo plazo en PYN de mPFC de ratones adultos?

HIPOTESIS

La disminución de la transmisión GABAérgica producida por el tratamiento crónico con ketamina durante la adolescencia deteriora la plasticidad sináptica excitatoria a largo plazo de las PYN en mPFC en ratones adultos.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar si la disminución de la transmisión GABAérgica producida por el tratamiento crónico con ketamina durante la adolescencia modifica la plasticidad sináptica en sinapsis excitatorias de la mPFC en ratones adultos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Objetivo específico N°1: Determinar si el tratamiento con Ket durante la adolescencia disminuye la transmisión GABAérgica sobre las neuronas piramidales de la mPFC.

Objetivo específico N°2: Determinar si t-LTD de la transmisión excitatoria está alterada en rebanadas de mPFC que presenten una hipofunción de la neurotransmisión GABAérgica.

Objetivo específico N°3: Determinar si t-LTP de la transmisión excitatoria está alterada en rebanadas de mPFC que presenten una hipofunción de la neurotransmisión GABAérgica.

METODOLOGÍA

Metodología general

Se utilizaron ratones de la cepa C57BL/6. Los cuáles fueron asignados al azar en dos grupos experimentales Vehículo (Veh) y Ketamina (Ket), alojados en grupos de 4-5 animales por caja. Los ratones fueron mantenidos en un ambiente con temperatura y humedad controlada, *ad-libitum*, y bajo condiciones de ciclo oscuridad de 12/12 horas (luces encendidas a las 8:00 am). Los procedimientos, cuidado de los animales y la preparación de las rebanadas se realizaron acorde a los lineamientos establecidos por el Comité Institucional de Cuidado y Ética Animal de la Facultad de Ciencias, Universidad de Valparaíso (BEA112-2017). Procurando la utilización ética, el sufrimiento y el número utilizado de animales**.**

Tratamiento farmacológico:

Los Ratones durante el día postnatal 45 (DP 45) fueron inyectados con una dosis intraperitoneal de solución vehículo (Veh, NaCL 0.9%), o una dosis de 30 mg/kg de Ket durante siete días consecutivos hasta el DP 51 (Pérez et al., 2019).

Preparación de rebanadas:

Para la obtención de las rebanas se decapitaron ratones de (70 a 120 días) bajo anestesia por Isoflurano (Lunan Better Pharmaceutical Co., Ltd.), posteriormente se extrajo el cerebro y se sumergió en líquido cefalorraquídeo artificial (ACSF) frío (~ 4 °C), en mM: 124,00 NaCl, 2,69 KCl, 1,25 KH_2PO_4, 2,00 $MgSO_4$, 26,00 $NaHCO_3$, 2,00 $CaCl_2$, 10,00 glucosa). El pH del ACSF se estabilizó a 7,4 mediante el burbujeo de carbógeno (95% de O_2, 5% de CO_2). Los cortes coronales de PFC (300 μm) se cortaron utilizando un vibrátono y

posteriormente los cortes se incubaron en el ACSF (> 1 hora, a temperatura ambiente; 20-22 °C). Transcurrido ese tiempo, los cortes se trasfirieron a una cámara de 2 ml, fijada a un microscopio (NIKON, modelo Eclipse FN1, Tokio, Japón) equipada con microscopía de contraste de interferencia diferencial infrarroja (DIC) y objetivos de inmersión en líquido (40x). Allí, las rebanadas fueron perfundidas con ACSF saturado con gas carbógeno (95% CO2/ 5% O2) a una razón de 2 ml por minuto) y se mantendrán a temperatura ambiente (22-24 °C aproximadamente).

Electrofisiología:

La actividad espontánea y evocada se obtuvo a partir de registros el soma de PYN de mPFC (ver figura 2), bajo configuración célula entera con pipetas para *Patch-Clamp* (4-8 MΩ), llenas con una solución intracelular que contuvo en mM: $KMeSO_4$ 134, KCl 10, HEPES 10, NaCl 5, ATP-Mg^{+2} 2.5 and GTP-Na^+ 0.3 (pH = 7.3 ajustada a un Ph 7.2–7.3 (Lines et al., 2017), O una solución intracelular en base a Cs^+ que contuvo en mM: Cs-Gluconato 100, HEPES 10, EGTA 10, Na_2-ATP 4, TEA-Cl 10 y $MgCl_2$-$6H_2O$ 1, ajustada a un pH 7.2–7.3 con CsOH (Fuenzalida et al., 2007). Los registros se realizaron en el modo fijación de corriente y fijación de voltaje utilizando un amplificador EPC-7 Patch-Clamp amplifier (HEKA, Instruments), o un Cornerstone PC-ONE Patch / Whole Cell Clamp (Dagan Corporation, Minneapolis, EE. UU.). En fijación de voltaje la resistencia en serie se compensó a ~ 70% y los registros de las neuronas sólo se aceptaron cuando la resistencia del sello era > 1 GΩ y la resistencia de acceso no varié > 20% durante el experimento. Se registró una célula por rebanada perteneciente del mismo set de experimentos, además, se rechazarán los registros si el potencial de membrana > -50 mV. Los datos de fijación de voltaje y corriente se muestrearon a frecuencias entre 6,0 y 10,0 kHz utilizando un convertidor A / D

(ITC-16, InstruTech), se filtraron a 3,0 kHz (Low pass Filter) y se almacenaron con el software Pulse FIT (Heka Instruments). El programa Pulse Fit se usó para generar señales de temporización de estímulo y pulsos de corriente transmembrana. En otros experimentos, se utilizó un convertidor Digidata 1322A A / D y D / A (Axon Instruments, Inc.) para registrar y generar señales de temporización de estímulo y pulsos de corriente transmembrana con el software pClamp (molecular Device).

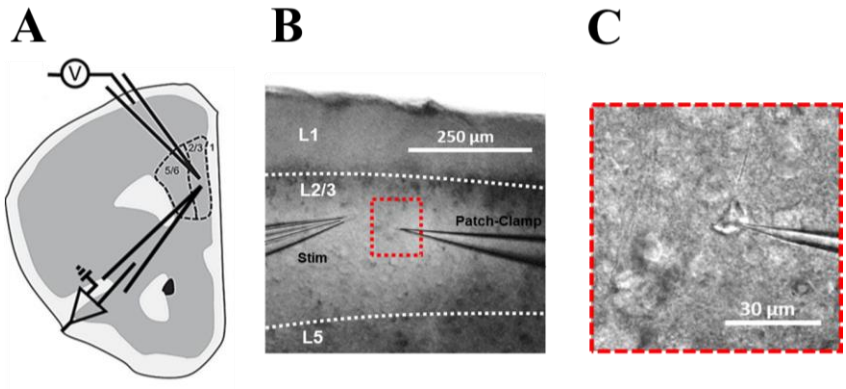


Figura Nº2: Configuración experimental de la técnica de patch-clamp. **A.-** Esquema que representa la posición relativa de los electrodos extracelulares de estimulación y de registro intracelular en la región de la capa II / III de la corteza Prelímbica (línea discontinua). **B.-** Microfotografía óptica (x 10), de mPFC en donde se observa la posición de las pipetas. El electrodo de estimulación extracelular se posicionó en la capa II / III a 100µA aproximadamente del electrodo de registro. **C.-** Las PYN se identificaron por su forma triangular con microscopia óptica de contraste de interferencia diferencial infrarroja (IR-DIC) (× 40).

Análisis de datos:

El análisis de los registros se realizó con el programa Clampfit perteneciente al conjunto de programas denominado “pCLAMP 9” (Molecular Device, Chicago, IL. USA). Para la representación de las gráficas se utilizará el software computacional “Origin” (versión 9.0, Origin Lab Corp, MA, USA). Los resultados se presentaron como la media ± SEM (error estándar) n (número de células) y porcentaje de cambio con respecto al control. Se verificó la distribución normal de los datos usando la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, el análisis estadístico se realizó utilizando la prueba Student’s two-tailed t y ANOVA.

Finalmente, las diferencias se considerarán estadísticamente significativas a un valor de $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) y $p < 0.001$ (***).

Diseño experimental y metodología especifica.

Objetivo específico N°1: Determinar si el tratamiento con Ket durante la adolescencia disminuye la transmisión GABAérgica sobre las neuronas piramidales de la mPFC.

Con la finalidad de asociar la hipofunción de la neurotransmisión GABAérgica con alteraciones en la plasticidad, se evaluó la eficacia de la neurotransmisión GABAérgica sobre las PYN de la capa II/III de mPFC en ratones de los grupos Veh y Ket. Para aquello se realizaron experimentos de Patch-clamp en PYN de la capa II/III en la modalidad fijación de voltaje en rebanadas de PFC en los dos grupos experimentales. En un conjunto de experimentos el voltaje se ajustó a 0 mV y se registraron las corrientes postsinápticas inhibitorias espontaneas (sIPSCs), las corrientes postsinápticas inhibitorias evocadas (eIPSC) y las corrientes postsinápticas inhibitorias miniatura (mIPSCs). Se registraron las sIPSCs con el bloqueo de la transmisión glutamatérgica en presencia de 20 µM CNQX, 50 µM APV, para las eIPSC se aplicó el protocolo de pulsos pareados (PPR), este protocolo consiste en la aplicación de dos estímulos de igual intensidad separados por distintos intervalos de tiempo (30, 70, 100 y 300 ms). La amplitud máxima de las eIPSC resultantes en respuesta a los pulsos aplicados, permite determinar la razón por pulsos pareados (PPR), la cual se calcula utilizando los valores de amplitud de la segunda eIPSC dividido por el valor de la primera (IPSC2/IPSC1).

Además, se registraron las mIPSCs en presencia de TTX 1 µM, 20 µM CNQX, 50 µM APV. Finalizados los registros de las sIPSCs y mIPSCs, se agregó PTX 10 µM como control negativo.

Con los datos obtenidos de las sIPSCs y mIPSCs se evaluó el índice de multiplicidad, el cual permite estimar el número de sitios que liberan simultáneamente neurotransmisores, este se determinó utilizando la siguiente ecuación:

$$iM = \frac{a}{q} \qquad a = \frac{(fs*bs)-(fm*qm)}{fs-fm}$$

Dónde: a es la amplitud de las sIPSC dependientes de potencial de acción (sensibles a TTX); q es la amplitud quantal de las mIPSC independientes de potencial de acción (insensibles a TTX); bs es la amplitud de los sIPSC registrados en ausencia de TTX, es decir, corresponde a los sIPSC + mIPSC; fs y fm son las frecuencias de los sIPSC y mIPSC, respectivamente (antes y después de TTX).

Objetivo específico N°2: Determinar si t-LTD de la transmisión excitatoria está alterada en rebanadas de mPFC que presenten una hipofunción de la neurotransmisión GABAérgica.

Para determinar las alteraciones en la plasticidad excitatoria de las PYN, se indujo STDP en rebanadas de ratones Veh y Ket sin el bloqueo de la transmisión inhibitoria. Los experimentos se realizaron mediante Patch-clamp en la modalidad fijación de voltaje, y se registraron las PYN de la capa II/III de mPFC. Se evocaron corrientes postsinápticas excitatorias (EPSCs) y/o potenciales postsinápticos excitatorios (EPSPs) utilizando un electrodo de estimulación extracelular (60 µm de diámetro) colocado en la capa II / III de mPFC a 100 µM de distancia de la célula registrada. Bajo la configuración de fijación de voltaje, se estimuló a 0,1 Hz durante un período de 10 a 15 minutos (correspondiente a la

línea base), luego se cambió a fijación de corriente y se indujo plasticidad sináptica utilizando el protocolo de STDP (post-pre) mediante la asociación del EPSPs con 1 o 2 potenciales de acción postsinápticos a 1 Hz con 100 repeticiones, a un intervalo de asociación temporal de -20 ms (Cui et al.,2018) (ver figura 1). Para el t-LTD se indujo la estimulación presináptica (mediante estimulación sináptica) que genere una despolarización de (3-7 mV), los potenciales de acción postsinápticos fueron evocados por la inyección de corriente somática (30 ms, 370 ± 35 pA) (Cui et al.,2018). Las modificaciones en la amplitud de los EPSCs se registraron 35 a 40 minutos después del final del protocolo de inducción y se expresó como una proporción (porcentaje de cambio) de la amplitud de las EPSCs en comparación a la línea base. Además, se utilizó la PPR como una medida del cambio en la probabilidad de liberación del neurotransmisor.

Objetivo específico N°3: Determinar si t-LTP de la transmisión excitatoria está alterada en rebanadas de mPFC que presenten una hipofunción de la neurotransmisión GABAérgica.

Para determinar las alteraciones en la plasticidad excitatoria de las PYN, se indujo STDP en rebanadas de ratones Veh y Ket sin el bloqueo de la transmisión inhibitoria. Similar a lo anterior, los experimentos se realizaron mediante Patch-clamp en la modalidad fijación de voltaje, y se registraron las PYN de la capa II/III de mPFC. Se evocaron corrientes postsinápticas excitatorias (EPSCs) y/o potenciales postsinápticos excitatorios (EPSPs) utilizando un electrodo de estimulación extracelular (60 µm de diámetro) colocado en la capa II / III de mPFC a 100 µM de distancia de la célula registrada. Bajo la configuración de fijación de voltaje, se estimuló a 0,1 Hz durante un período de 10 a 15 minutos (correspondiente a la línea base), luego se cambió a fijación de corriente y se indujo

plasticidad sináptica utilizando el protocolo de STDP (pre-post) mediante la asociación del EPSPs con 1 o 2 potenciales de acción postsinápticos a 1 Hz con 100 repeticiones, a un intervalo de asociación temporal de +20 ms (Cui et al.,2018) (ver figura 1). Las modificaciones en la amplitud de los EPSCs se registraron 35 a 40 minutos después del final del protocolo de inducción y se expresó como una proporción (porcentaje de cambio) de la amplitud de las EPSCs en comparación a la línea base. Además, se utilizó la PPR como una medida del cambio en la probabilidad de liberación del neurotransmisor.

ANÁLISIS COMPLEMENTARIOS.

1.- Propiedades eléctricas intrínsecas de las PYN.

Como una aproximación complementaria estudiamos las propiedades eléctricas intrínsecas de las PYN de la capa II/III de mPFC en ratones adultos, se realizaron registros de Patch-clamp en la modalidad fijación de corriente de PYN de la capa II/III de mPFC utilizando solución intracelular de $KMeSO_4$. Se utilizó el programa clampfit para el análisis de la curva I/V, y luego de ajustarla a una ecuación de la recta estándar (1) y a una ecuación exponencial estándar (2), se obtuvieron los valores de las propiedades pasivas de la membrana. Las propiedades activas se analizaron con el mismo programa, pero mediante la opción de detectar eventos a través del análisis por umbral.

1) $(x)=mx+b$ **2)** $f(t)=\Sigma Ai\ e_{-t/\tau ini=1}+C$

2.- Determinar si la transmisión glutamatérgica sobre las neuronas piramidales de la mPFC está alterada en ratones tratados con Ketamina.

Como una aproximación complementaria estudiamos si la administración de Ket durante la adolescencia modifica la eficacia glutamatérgica sobre las PYN de la capa II/III de mPFC. Para aquello, se realizaron experimentos de *Patch-clamp* en la modalidad fijación de voltaje en los dos grupos experimentales. Utilizando la solución intracelular de Gluconato de Cs-TEA se ajustó el potencial a -65 mV y se registraron las corrientes postsinápticas excitatorias espontaneas (sEPSCs) y las corrientes postsinápticas excitatorias evocadas (eEPSC), en las eEPSC se aplicó el protocolo de PPR, a 30, 70, 100 y 300 ms de intervalo interestímulo. Posteriormente, se calculó la razón AMPA/NMDA en las PYN, se analizó la cinética (*rise time* y *decay time*) de los EPSPs y la cinética tanto del componente AMPA Y NMDA de las EPSCs entre los grupos experimentales. Para los ensayos de la razón AMPA/NMDA, se realizaron experimentos de *Patch-clamp* en la modalidad fijación de voltaje en rebanadas de PFC en los grupos experimentales. Se registraron 15 a 20 eEPSC a -65 y a +40 mV, solo se incluyeron eventos únicos de latencia rápida (2–3 ms) para garantizar respuestas monosinápticas. El tiempo de la corriente máxima a –70 mV, considerado completamente mediado por AMPAR, se utilizó para establecer la ventana de tiempo para medir el pico AMPA a 50 mV. La disminución a la línea de base de la corriente AMPA a –70 se usó para seleccionar una ventana de tiempo para la medición de la corriente NMDA; una ventana de medición de 10 ms que comienza 40 ms después de que se utilizó el artefacto de estímulo. Esta corriente se designó como la medida NMDA (Myme et al., 2003). La razón NMDA se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Razón NMDA/AMPA} = (I_{\text{NMDA a +50mV}} / I_{\text{AMPA a +50mV}}).$$

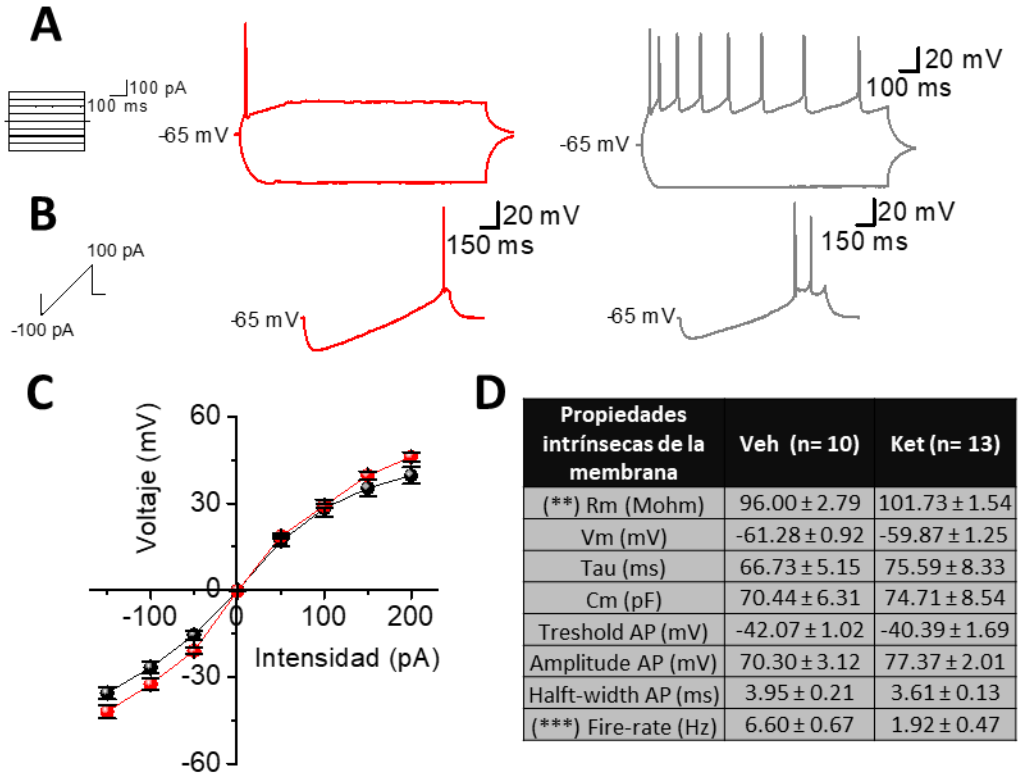
3.- ***Determinar si el bloqueo de los receptores GABA-A en ratones adultos durante el t-LTD transforma la LTD en LTP en sinapsis glutamatérgicas de la capa II/III mPFC.***

Para evaluar si el bloqueo parcial (proveniente de las PV-IN) y/o total de la neurotransmisión GABAérgica ionotrópica durante la adultez es suficiente para transformar la LTD en LTP, se registraron PYN de la capa II/III de mPFC de animales del grupo Veh mediante Patch-clamp en la modalidad fijación de voltaje. Se evocaron corrientes postsinápticas excitatorias (EPSCs) y/o potenciales postsinápticos excitatorios (EPSPs) utilizando un electrodo de estimulación extracelular colocado en la capa II / III de mPFC a 100 µM de distancia de célula registrada. Bajo la configuración de fijación de voltaje, se estimuló a 0,1 Hz durante un período de 10 a 15 minutos (correspondiente a la línea base), luego se cambió a fijación de corriente y se indujo plasticidad sináptica utilizando el protocolo de STDP (post-pre) mediante la asociación del EPSPs con 1 o 2 potenciales de acción postsinápticos a 1 Hz con 100 repeticiones, a un intervalo de asociación temporal de -20 ms (Cui et al.,2018) en presencia de en presencia de DAMGO (encefalina [D-Ala (2), N-Me-Phe (4), Gly (5)- ol])(1µM) el cual es un agonista de los receptores µ-opioides que genera la inhibición de la liberación de GABA desde las PV-IN (Shao et al., 2019). O (b) PTX (Pricrotoxina) (100 µM), el cual es un antagonista no competitivo de los receptores GABAA, que impide el flujo de iones de Cl- a través del receptor de GABA (Olsen, 2006). Las modificaciones en la amplitud de los EPSCs se registraron 35 a 40 minutos después del final del protocolo de inducción y se expresó como una proporción (porcentaje de cambio) de la amplitud de las EPSCs en comparación a la línea base. Además, se utilizó la PPR como una medida del cambio en la probabilidad de liberación del neurotransmisor.

RESULTADOS

1.- El tratamiento crónico con Ketamina durante la adolescencia modifica las propiedades eléctricas intrínsecas de la PYN de mPFC de ratones adultos.

Para estudiar el efecto en el ratón adulto de la administración crónica de Ket durante la adolescencia, determinamos las propiedades intrínsecas pasivas y activas de las PYN de la capa II/III de mPFC. Primero, utilizando protocolos de corriente/voltaje (I/V) logramos cuantificar las propiedades eléctricas pasivas de las PYN (Figura 3A). Encontramos sólo diferencias en la resistencia de membrana (Rm) (Ket 101.74 ± 1.53 Mohm (n=13); Veh 93.62 ± 1.63 Mohm (n=10); ANOVA, p= 0.00205), sin cambios aparentes en otras propiedades pasivas tales como: el potencial de membrana en reposo (Vm) (Ket -59.87 ± 1.25 mV (n=13); Veh -61.28 ± 0.92 mV (n=10); ANOVA, p= 0.70443) en la capacitancia de membrana (Cm) (Ket 74.71 ± 8.53 pF; Veh 70.43 ± 6.31 pF; ANOVA, p= 0.70672), y en la constante de tiempo de la membrana (τ) (Ket 75.58 ± 8.32 ms (n=13); Veh 66.74 ± 5.15 ms (n=10); ANOVA, p= 0.41075). Segundo, utilizando protocolos de rampa que consisten en el aumento gradual de voltaje en el tiempo (Figura 3B), en conjunto con la relación I-V, analizamos las propiedades eléctricas activas de las PYN. La tasa de disparo de PA en el grupo Ket fue menor que en Veh (Ket 1.92 ± 0.47 Hz (n=13); Veh 6.6 ± 0.67 Hz (n=10); ANOVA, p= 9.53×10^{-6}). Sin embargo, no encontramos diferencias en otras propiedades activas, como lo son la amplitud del PA, la duración media del PA y el umbral de disparo (Figura 3D). En conjunto, estos resultados demuestran que la administración crónica de Ket durante la adolescencia disminuye la excitabilidad de las PYN de la capa II/III de mPFC.



Propiedades intrínsecas de la membrana	Veh (n= 10)	Ket (n= 13)
(**) Rm (Mohm)	96.00 ± 2.79	101.73 ± 1.54
Vm (mV)	-61.28 ± 0.92	-59.87 ± 1.25
Tau (ms)	66.73 ± 5.15	75.59 ± 8.33
Cm (pF)	70.44 ± 6.31	74.71 ± 8.54
Treshold AP (mV)	-42.07 ± 1.02	-40.39 ± 1.69
Amplitude AP (mV)	70.30 ± 3.12	77.37 ± 2.01
Halft-width AP (ms)	3.95 ± 0.21	3.61 ± 0.13
(***) Fire-rate (Hz)	6.60 ± 0.67	1.92 ± 0.47

Figura Nº3: El tratamiento crónico con Ketamina durante la adolescencia cambia las propiedades eléctricas intrínsecas de la PYN de mPFC de ratones adultos. A.- Trazos representativos de la relación I/V obtenida entre los grupos (Izq, Ket; Der, Veh) **B.-** Trazos representativos de un protocolo de rampa (Izq, Ket; Der, Veh) **C.-**Gráfico de la curva I-V obtenida entre las dos condiciones experimentales. En el eje X se graficó la corriente (pA), mientras que en el eje Y se graficó el voltaje (mV) (Rojo, Ket; Gris, Veh). **D.-** Resumen de las principales propiedades de membrana de las PYN. Los valores corresponden al promedio ± SE. Rm: Resistencia de membrana en reposo; Vm: Potencial de membrana en reposo; Tau: Constante de tiempo de la membrana; Cm: Capacitancia o capacidad específica de la membrana. ± SEM. P <0,05 (*), p <0.01 (**), p <0.001 (***).

2.- El tratamiento crónico con Ketamina durante la adolescencia disminuye la eficacia sináptica GABAérgica en corteza prefrontal de ratones adultos.

Para determinar si la administración de Ket durante la adolescencia altera la eficacia sináptica GABAérgica sobre las PYN de la capa II/III de mPFC en adulto, se registraron las la sIPSC y mIPSC al mismo tiempo que bloqueamos farmacológicamente los receptores

ionotrópicos de glutamato (50 µM APV y 20 µM CNQX). Encontramos que la frecuencia de las sIPSC en el grupo Ket fue menor que en el Veh (Figura 4B) (Ket 2.18 ± 0.36 Hz (n=10); Veh 3.79 ± 0.23 Hz (n= 8); ANOVA; p= 0.00128). Sin embargo, no encontramos diferencias en la amplitud de las sIPCS (Figura 4C) (Ket 18.74 ± 2.06 pA (n= 10); Veh 20.85 ± 2.85 pA (n= 8); ANOVA; p= 0.55547). En relación con la liberación espontánea de GABA independiente de PA, se evaluaron los mIPSC bloqueando los canales de sodio activados por voltaje (1µM TTX). Observamos una reducción de la frecuencia de los mIPSC en el grupo Ket (Figura 4E) (Ket 0.84 ± 0.10 Hz (n=10); Veh 1.60 ± 0.16 Hz (n=8); ANOVA; p= $7.30x10^{-4}$), sin variaciones en la amplitud (Figura 4F) (Ket 14.93 ± 2.05 (n= 10); Veh 12.67 ± 0.90 pA (n=8); ANOVA; p= 0.37). Para estimar el grado de conectividad entre las INs y las PYN, evaluamos la relación entre las corrientes sIPSC y mIPSC. Con respecto a los sIPSC, al agregar TTX, en promedio la frecuencia disminuyó a un 38.51 ± 6.02% en los Ket y a un 41.20 ± 5.53% en los Veh. En relación con la amplitud, esta se redujo a un 69.22 ± 5.69 % en el grupo Ket y, a un 69.21± 4.31 % en el grupo Veh.

Considerando que el número de sitios de liberación es un factor importante en la modulación de la fuerza sináptica, se estimó el índice de multiplicidad de la transmisión sináptica inhibitoria en los grupos Ket y Veh. No encontramos diferencias en el índice de multiplicidad entre los grupos experimentales (figura 4G) (Ket 1.82 ± 0.43 (n=5); Veh 1.92 ± 0.40 (n=5); ANOVA; p= 0.87). Por lo tanto, este resultado nos sugiere que el número de sitios de liberación desde las sinapsis GABAérgicas sobre las PYN de la capa II/III de mPFC no fueron alterados por la administración crónica de Ket durante la adolescencia. Como aproximación experimental complementaria para determinar si los efectos de la administración crónica de Ket sobre la neurotransmisión GABAérgica ocurre a nivel pre o

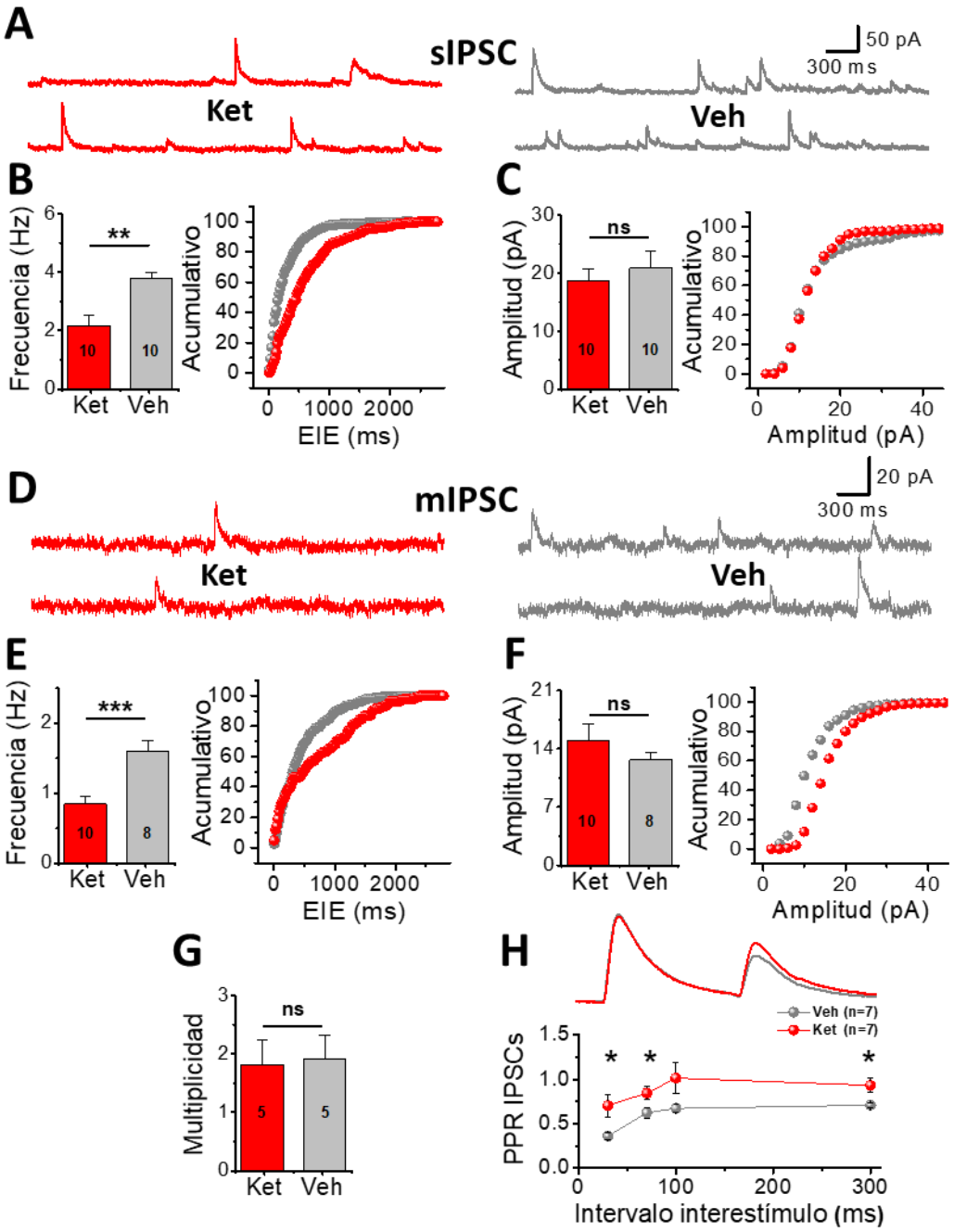


Figura Nº4: El tratamiento con Ket disminuye la eficacia sináptica GABAérgica en neuronas piramidales del mPFC. A.- Trazas representativas del sIPSC (Rojo, Ket; Gris, Veh) **B.-** Distribución de frecuencia promedio (izquierda) y fracción acumulativa (derecha) de sIPSCs en APV / CNQX. **C.-** Distribución de amplitud promedio (izquierda) y fracción acumulativa (derecha) de sIPSC en APV / CNQX, **D.-** Traza representativa de los registros de actividad de mIPSC. **E.-** Distribución de frecuencia promedio (izquierda) y fracción acumulativa (derecha) de los mIPSCs en APV / CNQX / TTX. **F.-** Distribución de amplitud promedio (izquierda) y fracción acumulativa (derecha) de los mIPSCs en APV / CNQX / TTX. **G.-** Distribución media del índice de multiplicidad de las sinapsis GABAérgicas. **H.-** Protocolo de pulso pareados a 30, 70, 100 y 300 ms en APV / CNQX. Resultados expresados como promedio ± SEM. P <0,05 (*) p <0.01 (**).

postsináptico, se aplicaron protocolos de PPR a intervalos temporales de 30, 70, 100 y 300 ms. En los animales tratados con Ket la PPR aumentó (Figura 4H). Lo anterior sugiere una menor probabilidad de liberación de GABA (Anexo 2).

En conjunto, estos resultados obtenidos sugieren la disminución de la liberación de GABA sobre las PYN de la capa II/III de mPFC. Probablemente esto sea debido a cambios en la maquinaria y/o mecanismos de liberación presináptica, sin embargo, no se descarta que el tratamiento con Ket pueda generar una disminución en el número de sinapsis desde las interneuronas hacia las neuronas piramidales, problema que será abordado próximamente en nuestro laboratorio.

3.- El tratamiento crónico con ketamina durante la adolescencia aumenta la neurotransmisión glutamatérgica en corteza prefrontal de ratones adultos.

Para determinar si la administración de Ket durante la adolescencia altera la eficacia sináptica glutamatérgica sobre las PYN de la capa II/III de mPFC en la adultez, se registraron las sEPSC y eEPSC. No encontramos diferencias en la frecuencia de las sEPCS (Figura 5B) (Ket 1.18 ± 0.12 Hz (n=8); Veh 1.12 ± 0.08 Hz (n= 9); ANOVA; p= 0.69599; en ACSF), pero la amplitud de las sEPSC en el grupo Ket fue mayor en comparación con el Veh (Figura 5C) (Ket 10.15 ± 0.70 pA (n= 8); Veh 7.29 ± 0.36 pA (n= 9); ANOVA; p= 0.00161; en ACSF). Para determinar si los efectos de la administración crónica de Ket sobre la neurotransmisión glutamatérgica ocurre a nivel pre o postsináptico, se aplicó un protocolo de PPR a intervalos temporales de 30, 70, 100 y 300 ms. No se encontraron diferencias entre los grupos experimentales (Figura 5D) (Anexo 3), lo cual sugiere que el aumento en la amplitud es un fenómeno postsináptico.

Para determinar si el tratamiento con Ket durante la adolescencia genera alteraciones en la expresión y/o función del receptor NMDA de las PYN de la capa II/III de mPFC, realizamos el análisis de la razón AMPA/NMDA y evaluamos la cinética (*Rise time* y *Decay time*) de las eEPSC en presencia del antagonista de GABAaR PTX (100 μM). En estas condiciones experimentales no encontramos diferencia en la razón AMPA/NMDA entre los grupos experimentales (Ket 1.44 ± 0.20 (n= 8); Veh 1.38 ± 0.08 (n=6); ANOVA; p= 0.67713), tampoco las hay en el *rise time* ni en el *decay time* (Anexo 4).

En resumen, estos resultados sugieren que los grupos experimentales poseen similar probabilidad de liberación de glutamato desde el terminal presináptico hacia las PYN de mPFC, además, el tratamiento con Ket no modifica el componente NMDA en las PYN. Sin embargo, el análisis de los sEPSC sugiere un aumento en la excitabilidad sináptica excitatoria sobre las PYN, un aumento del número de receptores AMPA a nivel postsináptico, o de su conductancia iónica.

Para determinar si el tratamiento con Ket genera un aumento en la excitabilidad sináptica, en el número de receptores o en su conductancia iónica, necesitamos analizar tanto las sEPSC como las mEPSC. Además, con estos datos se calculará el índice de multiplicidad, permitiendo estimar el número de sitios de liberación desde las sinapsis glutamatérgica sobre las PYN de la capa II/III de mPFC. Experimentos que serán abordados próximamente en nuestro laboratorio.

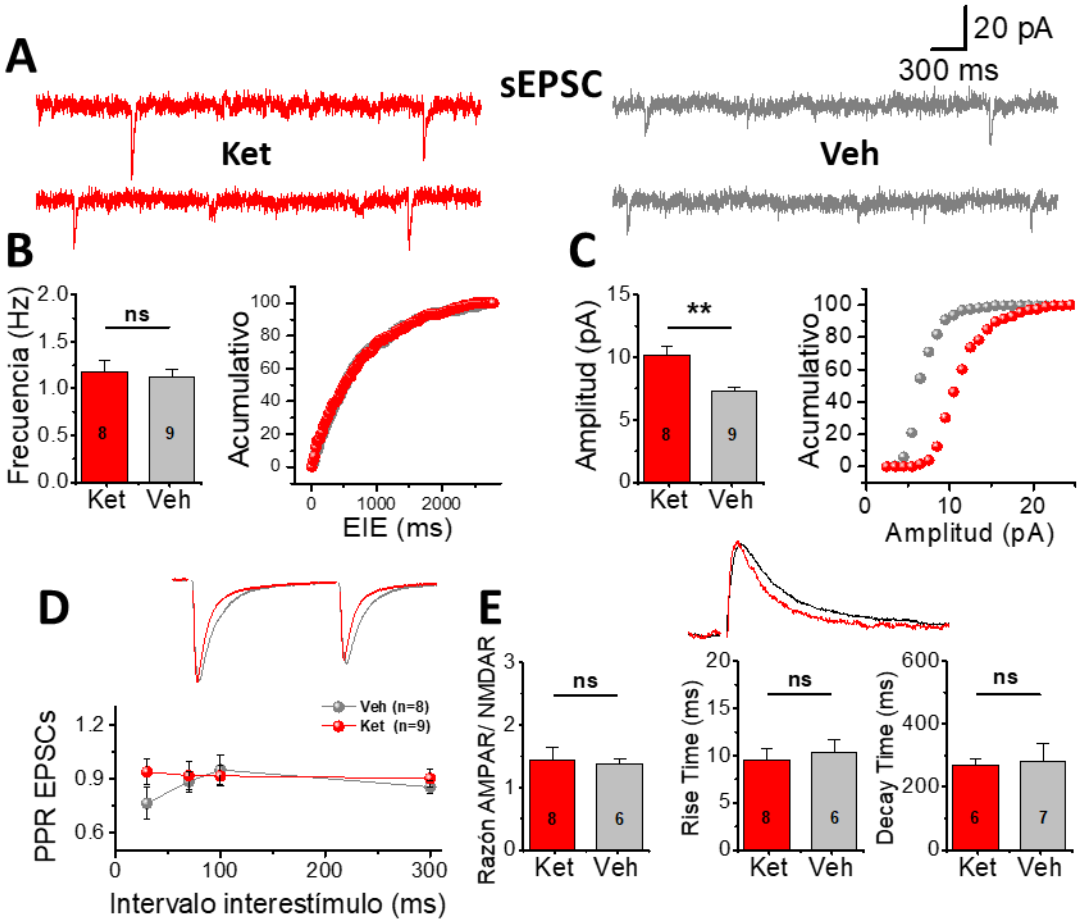


Figura Nº5: El tratamiento con Ket durante la adolescencia aumenta la eficacia sináptica glutamatérgica en neuronas piramidales del mPFC. A.- Trazas representativas del sEPSC (rojo: Ket; gris: Veh;) **B.-** Distribución de la frecuencia promedio (izquierda) y fracción acumulativa (derecha) de sEPSC en ACSF, **C.-** Distribución de la amplitud promedio (izquierda) y fracción acumulativa (derecha) de sEPSCs en ACSF. **D.-** Protocolo de pulso emparejado a 30, 70, 100 y 300 ms en ACSF. **E.-** (Izq) distribución promedio de AMPA/NMDA ratio y cinética de las respuestas de NMDA, *rise time* (medio), *decay time* (der). Resultados expresados como promedio ± SEM. P <0,05 (*) p <0.01 (**).

4.- El tratamiento crónico con ketamina convierte la LTD en LTP.

Dado que el tratamiento con Ket disminuye la eficacia inhibitoria de las PV-IN, y que la hipofunción GABAérgica es capaz de transformar una LTD en LTP (Paille et al., 2013; Caballero et al., 2014), hipotetizamos que la disminución en la eficacia GABAérgica en mPFC por el tratamiento con Ket es capaz de alterar la plasticidad sináptica excitatoria a

largo plazo. Para aquello, se registraron PYN de la capa II/III de mPFC, luego de un registro de una línea base estable de 10 min, se indujo la depresión a largo plazo mediante protocolos de t-LTD (-20 ms post-pre, 100 estímulos a 1 Hz, con 1 o 2 potenciales de acción asociados al EPSP) (Cui et al., 2018). En los animales del grupo Veh, el protocolo de t-LTD generó una depresión a largo plazo o LTD de la transmisión sináptica excitatoria. La amplitud de las EPSCs se redujo hasta un 53.26 ± 8.52 % con respecto a la línea base (n= 5 de un total de 7 células registradas). En rebanadas de mPFC de animales tratados con Ket, el protocolo de t-LTD contrariamente a lo observado en el Veh, generó una LTP de la transmisión sináptica excitatoria, aumentando la amplitud de las EPSCs a un 200.16 ± 36.87 % con respecto a la línea base (Figura 6A y 6B Izq) (n=4 de un total de 7 células registradas) (Ket 198.83 ± 36.35 (n=4); Veh 53.26 ± 8.52 (n=5); p=0.0033). En ambas condiciones no se observaron cambios significativos en la PPR 35 min después de la aplicación del protocolo de STDP (Figura 6B, Derecha), lo cual sugiere que la plasticidad sináptica esta mediada por mecanismos postsinápticos (Veh PPR basal: 1.06 ± 0.06; PPR post-STDP: 1.04 ± 0.05 (n=5); p= 0.56396) (Ket PPR basal: 0.97 ± 0.09; PPR post-STDP: 0.93 ± 0.06 (n=4); p= 0.21746). Además, no se encontraron diferencias significativas en la PPR previo al protocolo de plasticidad entre los grupos experimentales (Veh: 1.06 ± 0.06 (n=5); Ket 0.97 ± 0.09; (n=4); p= 0.44155 (Figura 6B, Centro), lo que sugiere que ambos grupos poseen similar probabilidad de liberación glutamatérgica. Sin embargo, cuando analizamos la cinética tanto de los EPSC y EPSP evocados previos a la inducción de plasticidad por STDP, encontramos que el *decay time* en ambas es menor en el grupo Ket (Figura 6C y 6D) (Anexo 5). En conjunto, estos resultados nos señalan que el tratamiento con Ket durante la adolescencia modifica la plasticidad sináptica en las PYN de la capa II/III de mPFC de ratones adultos.

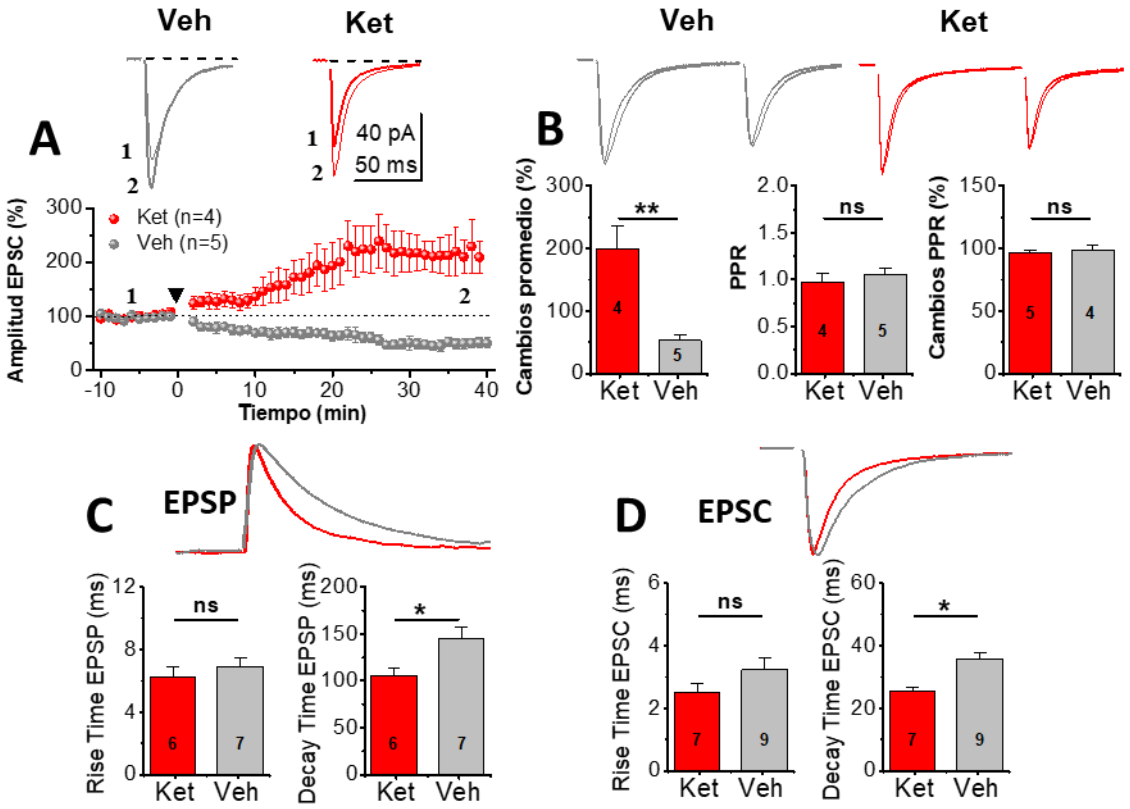


Figura Nº6: La inducción de depresión a largo plazo (LTD) por STDP produce la potenciación a largo plazo de la transmisión sináptica excitatoria en ratones tratados con ketamina. **A-** Gráfico de los experimentos de t-LTD (-20) Veh (gris) y Ketamina (rojo). Cada punto denota la amplitud promedio normalizada de la corriente postsináptica excitatoria (EPSC) por minuto. **B.-** (izquierda) Distribución promedio de amplitud normalizada de los EPSC en los experimentos t-LTD. (medio)**.** Distribución promedio de la PPR entre los grupos experimentales (derecha) Distribución promedio de los cambios en la PPR antes y después de la STDP. **C.-** Distribución promedio de la cinética de los potenciales postsinápticos excitatorios (EPSP), *rise time* (izquierda), *decay time* (derecha). **D.-** Distribución promedio de la cinética de las corrientes postsinápticas excitatorias (EPSC), *rise time* (izquierda), *decay time* (derecha). Resultados expresados como promedio ± SEM. P <0,05 (*) p <0.01 (**).

5.- El bloqueo de los receptores GABA-A en ratones adultos no bloquea la inducción de t-LTD en las sinapsis glutamatérgicas de la capa II/III mPFC.

Para determinar si el bloqueo parcial (proveniente de las PV-IN) y/o total de la neurotransmisión GABAérgica ionotrópica durante la adultez es suficiente para bloquear y/o

modificar la t-LTD, se registraron PYN de la capa II/III de mPFC del grupo Veh y se aplicaron protocolos de t-LTD en presencia de: (a) DAMGO (encefalina [D-Ala (2), N-Me-Phe (4), Gly (5)- ol]), un agonista de los receptores μ-opioides que genera la inhibición de la liberación de GABA desde las PV-IN (Shao et al., 2019), y en otro set de experimentos (b) PTX (Pricrotoxina), antagonista no competitivo de los receptores GABAA, que impide el flujo de iones de Cl^- a través del receptor de GABA (Olsen, 2006). Se observó que el protocolo de t-LTD en presencia de DAMGO (1μM) generó una robusta LTD similar al control (DAMGO 65.13 ± 8.31 (N=5); Veh 53.26 ± 8.52 (n=5); p= 0.35957). No se encontraron diferencias en la PPR entre la línea base y 35 minutos después de aplicado el protocolo (Veh PPR basal: 1.10 ± 0.06; PPR post-STDP= 1.13 ± 0.06 (n=5); p = 0.67352). Utilizando PTX (100μM), encontramos que el protocolo de t-LTD generó una menor t-LTD en comparación al Veh (PTX a 76.34 ± 3.98 (N=4); Veh 47.23 ± 7.77 (n=5); p= 0.01576), mientras que la PPR no fue diferente (Veh PPR basal: 1.07 ± 0.08; PPR post-STDP= 1.02 ± 0.05 (n=5); p= 0.72353). Tomados en conjunto, estos datos nos sugieren que a pesar de que el bloqueo de los receptores de GABAA mediante PTX redujo la LTD en comparación al Veh, el bloqueo de la neurotransmisión GABAérgica ionotrópica durante la adultez es incapaz de replicar la LTP observada en el grupo Ket.

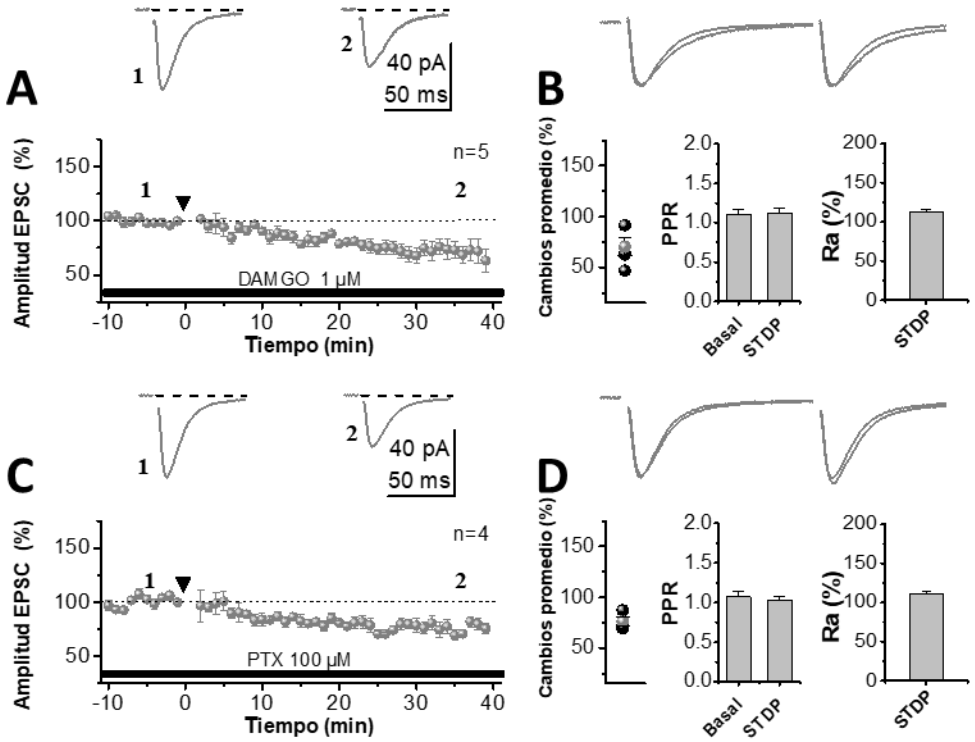


Figura Nº7: El bloqueo de los receptores GABAA en ratones adultos no afecta la inducción de LTD en las sinapsis glutamatérgicas. Gráfico de los experimentos de t-LTD en presencia de DAMGO (1µM) **A** y en PTX (100 µM) **C**. Cada punto denota la amplitud promedio normalizada de la corriente postsináptica excitatoria (EPSC) por minuto. **B y D.-** (izquierda) Cambios promedios de amplitud normalizada de los EPSC. (medio) Distribución promedio de los cambios en la PPR antes y después de la STDP, (derecha) Distribución promedio la resistencia de acceso normalizada (Ra) durante la línea base y 35 minutos después al protocolo de STDP. Resultados expresados como media ± SEM. * P <0,05.

DISCUSIÓN

La adolescencia es un período de importantes cambios morfológicos y funcionales en todo el cerebro. El sistema nervioso central (SNC) adolescente, en particular la corteza prefrontal (Bossong y Niesink, 2010; Chambers et al., 2003), se encuentra en un estado de extrema vulnerabilidad debido a que es una de las últimas áreas en alcanzar la madurez (Gogtay, 2004). Durante este periodo la mPFC está sometida al explosivo proceso de mielinización, aumento de la conectividad sináptica, poda sináptica, remodelación sináptica y consolidación de los circuitos neuronales entre las estructuras corticales y subcorticales, el crecimiento volumétrico y cambios en la distribución de receptores (Giedd et al., 1999; Spear, 2000; Bartzokis et a., 2001; Andersen, 2003). Esta remodelación neuronal del mPFC da como resultado el establecimiento del equilibrio excitador-inhibidor esencial para la maduración de los comportamientos y la cognición normales del adulto (Caballero et al., 2014; Cass et al., 2014; Caballero y Tseng, 2016). Así, es esperable que una alteración del sistema GABAérgico durante periodos críticos del desarrollo produzca un mal funcionamiento de la mPFC y de sus funciones asociadas. Defectos en la eficacia de las sinapsis GABAérgicas se han relacionado con la patogenia de diversos trastornos neuropsiquiátricos tales como la EZ.

A nivel neuronal, el tratamiento con Ket genera un aumento en la Rm y una disminución en la frecuencia de disparo de PA en las PYN de la capa II/III de mPFC. El aumento en la Rm puede deberse a una disminución en la conductancia de los canales de potasio (K^+), una disminución en su número, o una reducción del tamaño de la neurona. Existe escasa evidencia que demuestre interacciones entre Ket y la actividad de los canales de K^+ a nivel de SNC, sin embargo, se ha descrito que dosis anestésicas agudas de Ket genera

en ratones una inhibición de los canales catiónicos activados por nucleótidos cíclicos (HCN1), con la consecuente disminución de la corriente Ih, y un aumento en la Rm en PYN de corteza somatosensorial (Chen et al., 2009). La corriente H, también conocida como corriente activada por hiperpolarización (Ih), es una corriente de entrada generada por los canales catiónicos HCN activados por hiperpolarización. Ih desempeña un papel esencial en la regulación de la integración sináptica, la plasticidad, y la actividad sincrónica en el cerebro (Momin et al., 2008; Yang et al., 2018). Sin embargo, se desconoce si Ket genera una disminución a largo plazo de la Ih y en consecuencia un aumento en la Rm en PYN de la capa II/III de mPFC.

El tratamiento crónico con Ket durante la adolescencia genera en adultez una disminución en el número de PA de las PYN de mPFC. Amplia evidencia sugiere que la disminución en el número de PA ocurre producto de un aumento en su adaptación (Partridge y Stevens,1976; Storm, 1990; Ha y Cheong, 2017), que corresponde a la disminución progresiva de la frecuencia de disparo de las neuronas. Los procesos de adaptación subyacen en parte a corrientes de K^+ sensible al voltaje de tipo I_m desarrollada al final de un potencial de acción, y a las corrientes lentas de K^+ activada por Ca^{2+}(IKCa) durante la fase tardía de la hiperpolarización AHP, tal como la mAHP y sAHP (Storm, 1990; Ha y Cheong, 2017).

Tzingounis et al., el año 2007 demostraron que la proteína censora de Ca^{2+} hipocalcina regula la sAHP. Los animales knockout de hipocalcina muestran una reducción drástica de la corriente sAHP, mientras que la sobreexpresión de la hipocalcina la aumenta (Tzingounis et al., 2007). Inyecciones subanestésicas de Ket inducen un aumento en la expresión de hipocalcina en PYN de la corteza cingulada (Bernstein et al., 2003). Así Ket mediante el aumento de hipocalcina puede aumentar la sAHP, lo cual disminuiría el número

de potenciales de acción en las PYN de mPFC. Sin embargo, la sAHP de las PYN no fue evaluada en este estudio, experimentos que serán abordados próximamente en nuestro laboratorio.

En relación con la neurotransmisión inhibitoria, nuestros datos señalan que: 1) El tratamiento crónico con Ket durante la adolescencia genera en ratones adultos una disminución de la eficacia de la transmisión GABAérgica, manifestado como una reducción en la frecuencia de las sIPSC y mIPSC sobre las PYN de la capa II/III de mPFC, 2) El tratamiento con Ket produce una disminución en la probabilidad de liberación GABAérgica. 3) El número de sitios de liberación en las sinapsis GABAérgica no fue alterado por el tratamiento con Ket. Previamente, se ha descrito en modelos murinos que el tratamiento crónico con Ket durante la etapa neonatal o en la adultez, reduce la inmunorreactividad en mPFC para los marcadores de interneuronas GABAérgicas GAD67 y PV, junto con el deterioro en la eficacia sináptica GABAérgica (Zhang et al., 2008, 2016; Gastambide et al., 2013; Jeevakumar et al., 2015; Jeevakumar and Kroener, 2016). Recientemente, en nuestro laboratorio demostramos que el tratamiento crónico con Ket durante la adolescencia tardía, genera la disminución de la eficacia GABAérgica sobre PYN de la capa II/III de mPFC de ratas, expresada como una disminución en frecuencia de las mIPSCs y de las sIPSCs, en conjunto el aumento en la PPR y una disminución del marcaje para PV y GAD67. Además, estos animales presentaron un peor desempeño en tareas ejecutivas que dependen de la integridad y el funcionamiento adecuado del mPFC (Pérez et al., 2019). Resta determinar si el tratamiento con Ket en nuestros animales deteriora el desempeño de tareas conductuales dependientes de mPFC, o si afecta el número y el inmunomarcaje para PV y GAD67. Problema que será próximamente abordado.

La disminución de la frecuencia de sIPSC y mIPSC podría estar determinada por el efecto del tratamiento con Ket sobre los NMDAR en las PV-IN de mPFC. Durante la adolescencia las PV-IN de mPFC experimentan cambios drásticos en la composición de los receptores glutamatérgicos (Wang et al, 2009). En la primera semana postnatal el número de subunidades NR2B predomina por sobre las subunidades NR2A (Paoletti et al. 2013), esta distribución se invierte durante el desarrollo con una máxima expresión de las subunidades NR2A durante la adultez temprana (Monyer et al., 1994; Liu et al., 2004; Paoletti et al. 2013), esto hacen que las PV-IN sean particularmente vulnerables a insultos medioambientales durante la adolescencia (Wang et al, 2009). En las PV-IN la expresión de subunidades NR2A/NR2B está en una razón aproximada de 4, mientras que, en las células piramidales, esta razón alcanza un valor aproximado de ≈ 0,8 (Kinney et al., 2006). La mayor expresión de la subunidad NR2A en las PV-IN parece ser clave para explicar su susceptibilidad, puesto que el uso del antagonista selectivo para esa subunidad NR2A (NVP-AAM077), reproduce los cambios en la expresión de PV y GAD67 similar al inducido por Ket, no así RO-25-6981, antagonista selectivo para NR2B (Kinney et al., 2006). Estos resultados se correlacionan con que el tratamiento crónico con MK-801 en ratas jóvenes induce una disminución del mRNA de las subunidades NR2A, NR1, NR2B y NR2C en interneuronas PV^+ de ratas adultas (Xi et al., 2009).

El cambio de las subunidades de los receptores NMDA depende de, entre otros factores, la actividad de los NMDAR y la liberación de Ca^{2+} interno de los receptores de inositol trifosfato (IP3) (Matta et al., 2011; Taylor y Tovey 2010). Por lo tanto, el bloqueo crónico de los NMDAR por Ket durante la adolescencia tardía podría interferir con los mecanismos dependientes de Ca^{2+} que generan el cambio en las subunidades de los NMDAR

en las PV-IN. En conjunto, estas evidencias sugieren que el tratamiento con Ket podría reducir la expresión de la subunidad NR2A del NMDAR, la subunidad más expresada en las PV-IN, lo que generaría una disminución de la eficacia glutamatérgica sobre las interneuronas, reduciendo su excitabilidad, lo que posteriormente podría manifestarse como una disminución en la eficacia GABAérgica sobre las PYN de la capa II/III de mPFC.

Alternativamente, el daño por estrés oxidativo está involucrado en el deterioro de la neurotransmisión GABAérgica sobre las PYN de mPFC. A pesar de que Ket es menos citotóxica en comparación con otros antagonistas del receptor NMDA, tal como PCP (Zanos et al., 2018), se ha reportado que la administración de Ket potencia el estrés oxidativo (Reus et al., 2017). Además, el estrés oxidativo se ha correlacionado negativamente con la integridad de los PV-IN (Steullet et al., 2017). Particularmente se ha descrito que la PFC es más susceptible al daño oxidativo que otras estructuras cerebrales tales como el hipocampo (Fowler et al., 2014; Zlatkovic et al., 2014), por lo cual no podemos descartar un efecto citotóxico. Problema que será abordado próximamente en nuestro laboratorio.

En relación con la neurotransmisión excitatoria, nuestros datos demuestran que: 1) Los animales tratados con Ket presentan en adultez un aumento en la amplitud de las sEPSC sobre las PYN de la capa II/III de mPFC, 2) Los animales tratados con Ket poseen una disminución en el *decay time* tanto de EPSP como EPSC evocados, 3) Ambos grupos experimentales poseen similar probabilidad de liberación glutamatérgica, 4) Ambos grupos poseen similar razón AMPA/NMDA, 5) La cinética del receptor NMDA es similar en ambos grupos.

La mayor amplitud de las sEPSC podría estar mediado a nivel presináptico por una mayor excitabilidad de las fibras glutamatérgica sobre las PYN, mientras que a nivel postsináptico por el aumento en el número y/o conductancia de receptores AMPA

A nivel presináptico, el uso agudo de antagonistas del receptor NMDA como PCP, MK-801 y Ket, generan una disminución de la neurotransmisión GABAérgica sobre las neuronas PYN (Homayoun & Moghaddam, 2007; Zanos et al., 2018), lo que trae como consecuencia: un aumento en la excitabilidad de las PYN, un aumento de las salidas excitatorias desde la PFC hacia estructuras subcorticales, excitotoxicidad, disrupción de ritmos cerebrales y deficiencia de la memoria de trabajo (Homayoun & Moghaddam, 2007; Rotaru et al., 2012; Coyle et al., 2012). Sin embargo, se desconoce si estos efectos perduran a largo plazo. A nivel postsináptico, se ha reportado que la Ket puede aumentar la expresión de proteínas Homer1A en mPFC e hipocampo (Serchov et al., 2015). Las proteínas Homer se localizan predominantemente en la densidad postsináptica (PSD) en las neuronas de mamíferos, y actúan como proteínas adaptadoras para muchas proteínas en la PSD, las cuales han sido implicadas en la regulación funcional de los receptores para glutamato (Ango et al., 2001; Kammermeier and Worley, 2007). Las proteínas Homers1A pueden regular la remodelación dependiente de actividad de las estructuras sinápticas (Inoue et al., 2007) y han sido descritas como un miembro de las llamadas proteínas que promueven la plasticidad sináptica a largo plazo (Okada et al., 2009). Recientemente, se reportó que un aumento de la expresión de Homer1A mediante la aplicación de Homer1A fusionado al dominio de transducción de proteínas (TAT), tanto *in-vivo* como *in-vitro* desacopla el receptor metabotrópico de glutamato 5 (mGlu5) de sus blancos rio abajo, lo que resulta en un aumento de la activación de la vía mTOR y, en consecuencia, una mayor expresión y funcionalidad

del receptor AMPA a nivel postsináptico (Holz et al., 2019). Alternativamente, en base a los trabajos de Ket como fármaco antidepresivo, se ha descrito que la Ket aplicada en dosis subanestésicas aumenta a largo plazo la neurotransmisión glutamatérgica, mediante el incremento tanto de la liberación de glutamato desde el terminal presináptico, como por una mayor expresión e inserción del receptor AMPA en la densidad postsináptica (Duman et al., 2012; Li et al., 2012). Esto causa un incremento secundario en la liberación de BDNF y, por lo tanto, en la activación de la señalización ERK que luego estimula a la diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR), la cual activa quinasas que controlan la traducción de proteínas y, por lo tanto, conduce a una mayor expresión de proteína sináptica de tipo GluR1 y una mayor inserción y densidad de sinapsis que conduce a una mayor conectividad estructural entre las neuronas, particularmente en la mPFC (Duman et al., 2012). Por lo tanto, hipotetizamos que el tratamiento con Ket podría generar la sobreexpresión de los receptores AMPA y/o modificar su conformación, explicando así el aumento en la amplitud de los sEPSCs y la disminución de *decay time* de los EPSP y EPSC.

Para determinar si el aumento en la amplitud es un fenómeno pre o post sináptico resulta necesario analizar tanto las sEPSC como las mEPSC, paralelamente con estos datos se calculará el índice de multiplicidad lo que permitirá estimar el número de sitios de liberación de las sinapsis glutamatérgica sobre las PYN de la capa II/III de mPFC. En el escenario en donde no encontremos un aumento en la amplitud de los mEPSC, se estimará el número de receptores AMPA mediante técnicas inmunohistoquímicas (Bahr et al., 1992). Conjunto de experimentos que serán abordados próximamente en nuestro laboratorio.

Finalmente, en relación con la transmisión sináptica excitatoria, los resultados obtenidos en el análisis de la razón AMPA/ NMDA, en conjunto con el análisis de la cinética

de los receptores NMDA, nos permite descartar que el tratamiento crónico con Ket genere modificaciones en los receptores NMDA de las PYN de la capa II/III de mPFC.

En relación con la plasticidad sináptica, los circuitos GABAérgicos son uno de los principales moduladores de la coincidencia temporal necesaria para inducir plasticidad por STDP en los circuitos cerebrales (Paille et al., 2013). En base a nuestros hallazgos previos, que demostraron una hipofunción del sistema GABAérgico sobre las PYN de la capa II/III de mPFC en los animales tratados crónicamente con Ket, evaluamos la plasticidad sináptica excitatoria de las PYN mediante protocolos de t-LTD, en slices de PFC que presentaran una hipofunción GABAérgica.

Nuestros datos demuestran que el tratamiento crónico con Ket durante la adolescencia tardía invierte la polaridad del STDP-LTD en ratones adultos, es decir, el protocolo de t-LTD generó contrariamente al Veh, LTP de la transmisión sináptica excitatoria. No se observaron cambios en la PPR 35 minutos después del protocolo de STDP en comparación con el basal, lo cual sugiere que la plasticidad sináptica esta mediada por mecanismos postsinápticos, además, tampoco en la PPR entre ambos grupos previo al protocolo de plasticidad, lo que sugiere que poseen similar probabilidad de liberación glutamatérgica, descartando que esta sea la responsable en la alteración en la plasticidad a largo plazo. Sin embargo, similar a trabajos anteriores, el protocolo de t-LTP por sí solo no generó cambios en la eficacia a largo plazo de la transmisión sináptica excitatoria en mPFC (ver anexo 1) (Seol, 2007; Xu et al., 2010; Zaitsev & Anwyl., 2012; Ruan et al., 2014).

Previamente trabajos *in-vivo* con otros antagonistas del NMDAR mostraron que la aplicación repetida de MK-801 durante la adolescencia era capaz de inducir LTP en la PFC de ratas en adultez, en condiciones en que las ratas control inducían LTD, proceso debido a

falta de regulación inhibitoria (Caballero et al., 2014). En relación con la actividad ionotrópica, a pesar de que se ha descrito que GABA posee un efecto dual a nivel dentrítico y somático (Miles et al., 1996; Tsubokawa y Ross 1996; Gulledge y Stuard, 2003), la disminución y/o bloqueo de la neurotransmisión GABAérgica ionotrópica en adulto puede facilitar la inducción de plasticidad a largo plazo (Paille et al., 2013; Caballero et al., 2014).

La hipofunción del sistema GABAérgico podría generar que las neuronas piramidales de la capa II/III de mPFC pierdan inhibición somática, lo que puede producir un aumento en la retropropagación del potencial de acción (Miles et al., 1996, Tsubokawa y Ross, 1996) proceso relevante para la asociación temporal entre estímulos, condición necesaria para inducir plasticidad por STDP (Bi y Poo, 1999). Además, la hipofunción del sistema GABAérgico sobre las PYN podría producir la disminución de los potenciales postsinápticos inhibitorios (IPSP), lo cual disminuiría el bloqueo de Mg^{+} de los receptores NMDA aumentando indirectamente la amplitud de las EPSP y, en consecuencia, la entrada de Ca^{2+} a la neurona postsináptica (Morrisett et al., 1991; Otmakhova y Lisman, 2004; Benardo, 1994; Newberry y Nicoll, 1984).

En resumen, dichos antecedentes podrían explicar porque la inducción de la depresión a largo plazo mediada por STDP se encuentra alterada en animales tratados con Ket, ya que producto de la hipoactividad del sistema GABAérgico, la elevada excitabilidad, el aumento en la retropropagación del potencial de acción, la reducción de la activación de los canales de K+ rectificadores de entrada, la elevada cantidad Ca^{2+} que podría entrar postsinapticamente, sean más que suficiente para activar los mecanismos celulares dependientes de Ca^{2+} encargadas de potenciar la transmisión sináptica en estas neuronas bajo el protocolo de STDP utilizado. Sin embargo, encontramos que en los animales controles el

bloqueo parcial (proveniente de las PV-IN) y/o total de la neurotransmisión GABAérgica ionotrópica durante la adultez es insuficiente para convertir la LTD en LTP.

Aunque nuestros datos señalan que la alteración de los circuitos inhibitorios durante la adolescencia es crítica para el correcto funcionamiento sináptico de los circuitos de la mPFC en la adultez, se necesitan más experimentos para demostrar que la modificación de la eficacia GABAérgica es capaz de revertir y/o modificar la LTP inducida por el protocolo t-LTD en los animales tratados con Ket. En este escenario, resulta interesante evaluar en los animales tratados con Ket que presentan una hipofunción GABAérgica y la conversión anómala de LTD a LTP, sí es que el aumento en la eficacia sináptica GABAérgica mediante el uso de agonistas GABA-A es capaz de restaurar o impedir el cambio en la polaridad del t-LTD.

Es importante señalar que a pesar de que la reducción en la amplitud y duración del EPSP, reduce la ventana temporal de coincidencia para STDP (Fuenzalida et al., 2007; Fuenzalida et al., 2010) y que nuestros datos señalan una reducción de la duración de los EPSPs en el grupo Ket. El resultado final del protocolo t-LTD sigue siendo la generación de LTP. Por lo tanto, no podemos descartar que el efecto del tratamiento con Ket sobre la plasticidad sináptica es un mecanismo mediado por efectos de la Ket sobre otros sistemas de neurotransmisores y/o neuromoduladores independientes del sistema GABAérgico.

En un nuevo escenario donde el aumento de la neurotransmisión GABAérgica no revierta y/o modifique este cambio en la polaridad de la anormal t-LTD en el grupo Ket, el tratamiento con Ket además de producir una disminución en la neurotransmisión GABAérgica, también podría generar alteraciones en la neurotransmisión dopaminérgica en distintas estructuras corticales y subcorticales, incluida la mPFC (Liu et al., 2017; Chiamulera et al., 2018). La DA es capaz de modular tanto la transmisión excitatoria como inhibitoria

(Ruan et al., 2014; Gao y Goldman-Rakic, 2003). La aplicación de DA durante protocolos de t-LTD en PYN de la capa V de mPFC genera anómalamente una LTP, la cual es dependiente de los receptores de NMDA que contienen GluN2B. El bloqueo de los receptores D1 por SCH23390 (10 μM), pero no D2 por Haloperidol (2 μM), revierte dicha potenciación, lo cual sugiere que este proceso es mediado por la vía D1R-cAMP / PKA postsináptico (Ruan et al., 2014). La exposición crónica e intermitente a cocaína extiende la ventana temporal de asociación para la inducción de t-LTP de +10 a +30 ms, un intervalo de tiempo normalmente ineficaz para la inducción de t-LTP en la capa V de mPFC, esto se acompaña de una mayor susceptibilidad a la LTP mediado por un menor número de asociaciones pre y postsinápticas necesarias para inducirla, lo que indica una reducción en el umbral de inducción de t-LTP, umbral que podría estar modificado en los animales tratados con Ket.

La facilitación de la inducción de t-LTP mediada por cocaína es causada por la señalización de D1-cAMP / PKA, que luego recluta patológicamente a los canales de Ca^{+2} tipo L activados por voltaje, que se sinergizan con los receptores NMDA que contienen GluN2A (Ruan y Yao, 2017). En el hipocampo, se ha observado que la DA puede convertir la t-LTD en t-LTP, este efecto requiere a los receptores NMDA y está mediado en parte a través de la activación de la cascada de cAMP / PKA. La aplicación combinada SCH23390 y Sulpirida (50 μM) antagonistas de D1 y D2 respectivamente, impide la conversión de t-LTD en t-LTP inducida por DA (Brzosko et al., 2015; Brzosko et al., 2017). Sin embargo, esto no ha sido confirmado que la DA modifique la polaridad de la LTD en la capa II/III de mPFC.

Considerando los antecedentes previamente señalados, es posible que la alteración en la neurotransmisión GABAérgica no afecte directamente la plasticidad excitatoria de las PYN de la capa II/III de mPFC, si no que sea producto de un efecto indirecto mediado por

DA. Resulta interesante evaluar en los animales tratados con Ket que presentan una hipofunción GABAérgica y la conversión anómala de LTD a LTP, sí es que el bloqueo de la neuromodulación dopaminérgica es capaz de restaurar o impedir el cambio en la polaridad del t-LTD.

Finalmente, los efectos observados en este trabajo producto del tratamiento crónico con Ket son a largo plazo, ya que el tratamiento es generado durante la adolescencia tardía y los ensayos electrofisiológicos son realizados en edad adulta, periodo en el cual la Ket ya fue metabolizada, pero las alteraciones en los circuitos de la PFC por la exposición crónica a Ket aún están presentes, por lo tanto, es poco probable un efecto directo de la Ket sobre el receptor NMDA durante los protocolos de inducción de plasticidad por STDP.

Considerando que la coincidencia temporal entre los EPSPs y los PA gobiernan la plasticidad inducida por STDP (Magee y Johnston, 1997; Markram et al., 1997), posiblemente existen modificaciones adicionales en otros intervalos de asociación temporal que no fueron evaluados en este trabajo, por lo cual en futuros experimentos resulta interesante evaluar distintos intervalos de asociación para STDP (pre-post o post-pre) en los animales tratados crónicamente con Ket durante la adolescencia tardía.

CONCLUSIÓN

Durante esta investigación, mostramos que la administración crónica de ketamina durante la adolescencia produce en mPFC en la adultez:

- Disminución en el disparo de PA y aumenta la Rm de PYN.
- Disminución en la eficacia sináptica GABAérgica.
- Aumento en la eficacia sináptica glutamatérgica.
- Convierte la t-LTD en LTP en ratones adultos.
- Finalmente, el bloqueo de la neurotransmisión GABAérgica ionotrópica durante la adultez es insuficiente para convertir la t-LTD en LTP.

Concluimos que bajo nuestras condiciones experimentales el tratamiento con Ket durante la adolescencia genera un amplio espectro de modificaciones a la transmisión sináptica tanto excitatoria como inhibitoria en la adultez. Sumado a los antecedentes bibliográficos discutidos, aun no podemos descartar una relación causativa entre la hipofunción del sistema GABAérgico y la alteración en la plasticidad sináptica excitatoria de las PYN de la capa II/III de mPFC. Finalmente, estos resultados ayudan a la comprensión de la plasticidad sináptica mediada por STDP en mPFC y el papel del sistema GABAérgico en dicho proceso, sumado a aquello, aporta información sináptica relevante para comprender las alteraciones en la plasticidad sináptica y parte de la fisiopatología de enfermedades que presentan alteraciones de la mPFC y sus circuitos.

PROYECCIONES

Obtenidos estos resultados, pensamos que es relevante continuar el estudio respondiendo los siguientes objetivos:

- Evaluar la amplitud y frecuencia de las mEPSC junto con su multiplicidad.
- Determinar si un aumento en la eficacia GABAérgica puede revertir y/o alterar la LTP inducida por t-LTD en los animales tratados con Ket.
- Determinar si el sistema dopaminérgico participa en el cambio de la polaridad de la plasticidad excitatoria a largo plazo en los ratones tratados con Ket.
- Determinar alteraciones en el número de interneuronas de mPFC en ratones adultos tras la administración crónica de Ket mediante técnicas de inmunohistoquímica.
- Evaluar el desempeño cognitivo de los ratones tratados con Ket en tareas dependientes de mPFC.

BIBLIOGRAFÍA

- **Aldrin-Kirk, P., Davidsson, M., Holmqvist, S., Li,J.Y., and Bjork lund, T.** (2014). Novel AAV-based rat model of forebrain synucleinopathy show extensive Pathologies and progressive loss of cholinergic interneurons. PLoS One. Jul 7;9(7).
- **Andersen SL.** (2003) Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity? Neurosci Biobehav Rev. 27:3–18.
- **Ango, F., Prezeau, L., Muller, T., Tu, J.C., Xiao, B., Worley, P.F., Pin, J.P., Bockaert, J., and Fagni, L.** (2001). Agonist-independent activation of metabotropic glutamate receptors by the intracellular protein Homer. Nature 411, 962–965.
- **Bahr, B. A., Godshall, A. C., Hall, R. A., & Lynch, G**. (1992). Mouse telencephalon exhibits an age-related decrease in glutamate (AMPA) receptors but no change in nerve terminal markers. Brain Research, 589(2),
- **Bartos M, Vida I, Jonas P.** (2007) Synaptic mechanisms of synchronized gamma oscillations in inhibitory interneuron networks. Nat Rev Neurosci. Jan;8(1):45-56
- **Bartzokis G, Beckson M, Lu PH, Nuechterlein KH, Edwards N, Mintz J.** (2001) Age-related changes in frontal and temporal lobe volumes in men: a magnetic resonance imaging study. Arch Gen Psychiatry 58:461–5.
- **Becker, A., Peters, B., Schroeder, H., Mann, T., Huether, G., and Grecksch, G.** (2003). Ketamine-induced changes in rat behaviour: a possible animal model of schizophrenia. Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry 27, 687–700.
- **Belforte JE, Zsiros V, Sklar ER, Jiang Z, Yu G, Li Y, Quinlan EM, Nakazawa K.** (2010) Postnatal NMDA receptor ablation in corticolimbic interneurons confers schizophrenia-like phenotypes. Nat Neurosci. Jan;13(1):76-83.

- **Benardo LS.** (1994) Separate activation of fast and slow inhibitory postsynaptic potentials in rat neocortex in vitro. The Journal of Physiology; 476:203–215.
- **Bernstein, H.-G., Becker, A., Keilhoff, G., Spilker, C., Gorczyca, W. A., Braunewell, K.-H., & Grecksch, G.** (2003). Brain region-specific changes in the expression of calcium sensor proteins after repeated applications of ketamine to rats. Neuroscience Letters, 339(2), 95–98.
- **Bi G, Poo M**. (1998). Distributed synaptic modification in neural networks induced by patterned stimulation. Nature. Oct 21;401(6755):792-6.
- **Bossong MG, Niesink RJ.** (2010) Adolescent brain maturation, the endogenous cannabinoid system and the neurobiology of cannabis-induced schizophrenia. Prog Neurobiol. 92:370–85.
- **Brzosko Z, Mierau SB, Paulsen O.** (2019) Neuromodulation of Spike-Timing-Dependent Plasticity: Past, Present, and Future. Neuron. 21;103(4):563-581.
- **Brzosko Z, Schultz W, Paulsen O.** (2015) Retroactive modulation of spike timing-dependent plasticity by dopamine. Elife. Oct 30;4.
- **Brzosko Z, Zannone S, Schultz W, Clopath C, Paulsen O.** (2017) Sequential neuromodulation of Hebbian plasticity offers mechanism for effective reward-based navigation. Elife. 10;6.
- **Bu DF, Erlander MG, Hitz BC, Tillakaratne NJ, Kaufman DL, Wagne-rMcPherson CB, Evans GA, Tobin AJ.** (1992) Two human glutamate decarboxylases, 65-kDa GAD and 67-kDa GAD, are each encoded by a single gene. Proc Natl Acad Sci USA 89: 2115–2119,

- **Caballero A, Thomases DR, Flores-Barrera E, Cass DK, Tseng KY.** (2014) Emergence of GABAergic-dependent regulation of input-specific plasticity in the adult rat prefrontal cortex during adolescence. Psychopharmacology (Berl). Apr; 231(8):1789-96.
- **Caballero A, Tseng KY (**2016) GABAergic Function as a Limiting Factor for Prefrontal Maturation during Adolescence. Trends Neurosci. Jul;39 (7):441-8.
- **Carlén M, Meletis K, Siegle JH, et al.** (2012) A critical role for NMDA receptors in parvalbumin interneurons for gamma rhythm induction and behavior. Mol Psychiatry. May;17(5):537-48.
- **Cass DK, Flores-Barrera E, Thomases DR, Vital WF, Caballero A, Tseng KY.** (2014) CB1 cannabinoid receptor stimulation during adolescence impairs the maturation of GABA function in the adult rat prefrontal cortex. Mol Psychiatry 19:536–43.
- **Chambers RA, Taylor JR, Potenza MN.** (2003) Developmental neurocircuitry of motivation in adolescence: a critical period of addiction vulnerability. Am J Psychiatry 160:1041–52.
- **Changeux JP, Danchin A.** (1976) Selective stabilisation of developing synapses as a mechanism for the specification of neuronal networks. Nature. Dec 23-30;264(5588):705-12.
- **Chen, X., Shu, S., & Bayliss, D. A.** (2009). HCN1 Channel Subunits Are a Molecular Substrate for Hypnotic Actions of Ketamine. Journal of Neuroscience, 29(3), 600–609.

- **Chiamulera C, di Chio M, Cavalleri L, Venniro M, Padovani L, Collo G.** (2018) Ketamine effects on mammalian target of rapamycin signaling in the mouse limbic system depend on functional dopamine D3 receptors. Neuroreport. May 23;29(8):615-620.
- **Chung DW, Fish KN, Lewis DA**. (2016) Pathological Basis for Deficient Excitatory Drive to Cortical Parvalbumin Interneurons in Schizophrenia. Am J Psychiatry. Nov 1;173(11):1131-1139.
- **Citri A, Malenka RC**. (2008). Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. Neuropsychopharmacology. Jan;33(1):18-41.
- **Coyle JT, Basu A, Benneyworth M, Balu D, Konopaske G.** (2012) Glutamatergic synaptic dysregulation in schizophrenia: therapeutic implications. Handb Exp Pharmacol. (213):267-95.
- **Coyle JT**. (2012) NMDA receptor and schizophrenia: a brief history. Schizophr Bull. Sep;38(5):920-6.
- **Cui Y, Perez S, Venance L.** (2018) Endocannabinoid-LTP Mediated by CB1 and TRPV1 Receptors Encodes for Limited Occurrences of Coincident Activity in Neocortex. Front Cell Neurosci. Jul 5; 12:182.
- **Cutsuridis V., Cobb S., Graham B.P.** (2008) Modelling the STDP symmetry-to-asymmetry transition in the presence of GABAergic inhibition Neural Network World 19(5):471-81.
- **Dalley, J.W., Cardinal, R.N., and Robbins, T.W.** (2004). Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. Neurosci. Biobehav. Rev. 28, 771–784.

- **Dan Y and Poo M** (2006). Spike timing-dependent plasticity: from synapse to perception. Physiol Rev. 86(3):1033-48.
- **Ferguson BR, Gao WJ.** (2018) Thalamic Control of Cognition and Social Behavior Via Regulation of Gamma-Aminobutyric Acidergic Signaling and Excitation/Inhibition Balance in the Medial Prefrontal Cortex. Biol Psychiatry. 15;83(8):657-669.
- **Fowler, A.-K., Thompson, J., Chen, L., Dagda, M., Dertien, J., Dossou, K. S. S., et al.** (2014). Differential sensitivity of prefrontal cortex and hippocampus to alcohol-induced toxicity. PLoS One 9: e106945.
- **Freund TF, Katona I.** (2007) Perisomatic inhibition. Neuron. 4;56(1):33.
- **Frohlich J, Van Horn JD.** (2014) Reviewing the ketamine model for schizophrenia. J Psychopharmacol. 28(4):287-302.
- **Fuenzalida M, Fernandez de Sevilla D, Buño W**. (2007) Changes of the EPSP waveform regulate the temporal window for spike-timing-dependent plasticity. J Neurosci. Oct 31;27(44):11940-8.
- **Fuenzalida M, Fernández de Sevilla D, Couve A, Buño W**. (2010) Role of AMPA and NMDA receptors and back-propagating action potentials in spike timing-dependent plasticity. J Neurophysiol. Jan;103(1):47-54.
- **Gao WJ, Goldman-Rakic PS**. (2003) Selective modulation of excitatory and inhibitory microcircuits by dopamine. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Mar 4;100(5):2836-41.
- **Gastambide, F., Mitchell, S. N., Robbins, T. W., Tricklebank, M. D., and Gilmour, G.** (2013). Temporally distinct cognitive effects following acute

administration of ketamine and phencyclidine in the rat. Eur. Neuropsychopharmacol. 23, 1414–1422.

- **Giedd JN, Blumenthal J, Jeffries NO, Castellanos FX, Liu H, Zijdenbos A, et al.** (1999) Brain development during childhood and adolescence: a longitudinal MRI study. Nat Neurosci. 2:861–3.
- **Godavarthi, S.K., Sharma, A., and Jana, N. R.** (2014). Reversal of reduced parvalbumin neurons in hippocampus and amygdala of Angelman syndrome model mice by chronic treatment of fluoxetine. *J. Neurochem.* 130, 444–454.
- **Gogtay N, Giedd JN, Lusk L, Hayashi KM, Greenstein D, Vaituzis A C, et al.** (2004) Dynamic mapping of human cortical development during childhood through early adulthood. Proc Natl Acad Sci U S A. 101:8174–9.
- **Groenewegen, H.J., and Uylings, H.B.** (2000). The prefrontal cortex and the integration of sensory, limbic and autonomic information. Prog. Brain Res. 126, 3–28.
- **Guiffa F., Morales K., Sotomayor-Zárate R., Bonansco C. and Fuenzalida M.** (2019) Impairment of spike timing-dependent plasticity in prefrontal cortex in a ketamine. Revista-SOFARCHI-Final-Resúmenes-Vol-12-N3.
- **Gulledge AT, Stuart GJ**. (2003) Excitatory actions of GABA in the cortex. Neuron 37:299–309.
- **Ha, G. E., & Cheong, E.** (2017). Spike Frequency Adaptation in Neurons of the Central Nervous System. Experimental Neurobiology, 26(4), 179. doi:10.5607/en.2017.26.4.179
- **Hebb, D.O.** (1949). The Organization of Behavior. New York: Wiley & Sons.

- **Higley MJ, Contreras D.** (2006) Balanced excitation and inhibition determine spike timing during frequency adaptation. J Neurosci. Jan 11;26(2):448-57.
- **Hoftman GD, Datta D, Lewis DA.** (2016) Layer 3 Excitatory and Inhibitory Circuitry in the Prefrontal Cortex: Developmental Trajectories and Alterations in Schizophrenia. Biol Psychiatry. Jun 4. (16)32427-1
- **Holz A, Mülsch F, Schwarz MK, Hollmann M, Döbrössy MD, Coenen VA, Bartos M, Normann C2, Biber K, van Calker D, Serchov T.** (2019) Enhanced mGlu5 Signaling in Excitatory Neurons Promotes Rapid Antidepressant Effects via AMPA Receptor Activation. Neuron. 104(2): 338-352.
- **Homayoun, H., and Moghaddam, B. (**2007). NMDA Receptor Hypofunction Produces Opposite Effects on Prefrontal Cortex Interneurons and Pyramidal Neurons. J. Neurosci. 27, 11496–11500.
- **Huerta PT and Lisman JE.** (1993) Heightened synaptic plasticity of hippocampal CA1 neurons during a cholinergically induced rhythmic state. Nature. Aug 19;364(6439):723-5.
- **Inoue Y, Udo H, Inokuchi K, Sugiyama H.** (2007) Homer1a regulates the activity-induced remodeling of synaptic structures in cultured hippocampal neurons. Neuroscience. 150:841–852.
- **Jeevakumar V, Kroener S.** (2016) Ketamine Administration During the Second Postnatal Week Alters Synaptic Properties of Fast-Spiking Interneurons in the Medial Prefrontal Cortex of Adult Mice. Cereb Cortex. Mar;26(3):1117-29.
- **Jeevakumar, V., Driskill, C., Paine, A., Sobhanian, M., Vakil, H., Morris, B., et al**. (2015). Ketamine administration during the second postnatal week induces

enduring schizophrenia-like behavioral symptoms and reduces parvalbumin expression in the medial prefrontal cortex of adult mice. Behav. Brain Res. 282, 165–175.

- **Kammermeier, P.J., and Worley, P.F.** (2007). Homer 1a uncouples metabotropic glutamate receptor 5 from postsynaptic effectors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104, 6055–6060.
- **Kim, E. H., Thu, D. C., Tippett, L.J., Oorschot, D.E., Hogg, V.M., Roxburgh, R., et al.** (2014). Cortical interneuron loss and symptom heterogeneity in Huntington disease. Ann. Neurol. 75, 717–727.
- **Kinney JW, Davis CN, Tabarean I, Conti B, Bartfai T, Behrens MM.** (2006) A specific role for NR2A-containing NMDA receptors in the maintenance of parvalbumin and GAD67 immunoreactivity in cultured interneurons. J Neurosci. Feb 1;26 (5):1604-15.
- **Knoferle, J., Yoon, S.Y., Walker, D., Leung, L., Gillespie, A.K., Tong, L.M., Et al.** (2014). A polipoproteine 4 produced in GABAergic interneurons causes learning and memory deficits in mice. J. Neurosci. 34, 14069–14078.
- **Lamsa K, Irvine E, Giese P, and Kullmann D** (2007) NMDA receptor-dependent long-term potentiation in mouse hippocampal interneurons shows a unique dependence on Ca2+/calmodulin-dependent kinases. J Physiol. Nov 1; 584(Pt 3): 885–894.
- **Langlois LD, Dacher M, Nugent FS.** (2018) Dopamine Receptor Activation Is Required for GABAergic Spike Timing-Dependent Plasticity in Response to

Complex Spike Pairing in the Ventral Tegmental Area. Front Synaptic Neurosci. Sep 21; 10:32.

- **Lisman J.** (2012). Excitation, inhibition, local oscillations, or large-scale loops: what causes the symptoms of schizophrenia? Curr Opin Neurobiol. Jun;22(3):537-44.
- **Liu Q, Xu TY, Zhang ZB, Leung CK, You DY, Wang SW, Yi S, Jing Q, Xie RF, Li HJ, Zeng XF.** (2017) Effects of co-administration of ketamine and ethanol on the dopamine system via the cortex-striatum circuitry. Life Sci. Jun 15;179:1-8.
- **Liu X-B, Murray KD, Jones EG.** (2004). Switching of NMDA receptor 2A and 2B subunits at thalamic and cortical synapses during early postnatal development. J Neurosci. 24:8885–8895.
- **Magee JC, Johnston D.** (1997) A synaptically controlled, associative signal for Hebbian plasticity in hippocampal neurons. Science. 10;275(5297):209-13.
- **Markram H, Lübke J, Frotscher M, Sakmann B. (**1997). Regulation of synaptic efficacy by coincidence of postsynaptic APs and EPSPs. Science. 10;275(5297):213-5.
- **Matta JA, Ashby MC, Sanz-Clemente A, RocheKW, Isaac JTR**. (2011). mGluR5 and NMDA receptors drive the experience- and activity- dependent NMDA receptor NR2B to NR2A subunit switch. Neuron. 70:339–351.
- **Miles R, Toth K, Gulyas AI, Hajos N, Freund TF**. (1996) Differences between somatic and dendritic inhibition in the hippocampus. Neuron 16:815–23
- **Momin, A., Cadiou, H., Mason, A., & McNaughton, P. A.** (2008). Role of the hyperpolarization-activated currentIhin somatosensory neurons. The Journal of Physiology, 586(24), 5911–5929.

- **Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH.** (1994). Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. Neuron. 12:529–540.
- **Morrisett R, Mott D, Lewis D, Swartzwelder H, Wilson W.** (1991) GABAB-receptor-mediated inhibition of the N-methyl-D-aspartate component of synaptic transmission in the rat hippocampus. J Neurosci; 11:203–209.
- **Murray AJ, Woloszynowska-Fraser MU et al**. (2015) Parvalbumin-positive interneurons of the prefrontal cortex support working memory and cognitive flexibility. Sci Rep. Nov 26; 5:16778.
- **Myme, C. I. O., Sugino, K., Turrigiano, G. G., & Nelson, S. B.** (2003). The NMDA-to-AMPA Ratio at Synapses Onto Layer 2/3 Pyramidal Neurons Is Conserved Across Prefrontal and Visual Cortices. Journal of Neurophysiology, 90(2), 771–779.
- **Newberry NR, Nicoll RA**. (1984) A bicuculline-resistant inhibitory post-synaptic potential in rat hippocampal pyramidal cells in vitro. J Physiol; 348:239–254.
- **Okada D, Ozawa F, Inokuchi K.** (2009) Input-specific spine entry of soma-derived Vesl-1S protein conforms to synaptic tagging. Science.; 324:904–909.
- **Olsen, R.W** (2006) Picrotoxin-like channel blockers of GABAA receptors». PNAS. 103(16): 6081–6082.
- **Otmakhova N, Lisman J.** (2004) Contribution of Ih and GABAB to synaptically induced afterhyperpolarizations in CA1: a brake on the NMDA response. J Neurophysiol; 92:2027–2039.

- **Paille V, Fino E, Du K, Morera-Herreras T, Perez S, Kotaleski JH, Venance L.** (2013) GABAergic circuits control spike-timing-dependent plasticity. J Neurosci. 2013 May 29;33(22):9353-63.
- **Paoletti P, Bellone C, Zhou Q.** (2013) NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. Nat Rev Neurosci. 14:383–400.
- **Partridge LD, Stevens CF** (1976) A mechanism for spike frequency adaptation. J Physiol 256:315-332
- **Pavlov, I., Scimemi, A., Savtchenko, L., Kullmann, D. M., & Walker, M. C.** (2011). Ih-mediated depolarization enhances the temporal precision of neuronal integration. Nature Communications, 2(1).
- **Peng, Z., Zhang, N., Wei, W., Huang, C.S., Cetina, Y., Otis, T.S., et al.** (2013) A reorganized GABAergic circuit in a model of epilepsy: evidence from Optogenetic labeling and stimulation of somatostatin interneurons. J. Neurosci. 33, 14392–14405.
- **Perez, S. M., and Lodge, D. J.** (2013). Hippocampal interneuron transplants Reverse aberrant dopamine system function and behavior in a rodent model of schizophrenia. Mol. Psychiatry 18, 1193–1198.
- **Perlstein WM, Carter CS, Noll DC, Cohen JD.** (2001) Relation of prefrontal cortex dysfunction to working memory and symptoms in schizophrenia. Am J Psychiatry.158(7):1105-13.
- **Pouille F, Scanziani M**. (2001) Enforcement of temporal fidelity in pyramidal cells by somatic feed-forward inhibition. Science. 10;293(5532):1159-63.

- **Rotaru DC, Lewis DA, Gonzalez-Burgos G.** (2012) The role of glutamatergic inputs onto parvalbumin-positive interneurons: relevance for schizophrenia. Rev Neurosci. Jan 9;23(1):97-109.
- **Ruan, H., and Yao, W.-D.** (2017). Cocaine promotes coincidence detection and lowers induction threshold during Hebbian associative synaptic potentiation in prefrontal cortex. J. Neurosci. 37, 986–997.
- **Ruan, H., Saur, T., and Yao, W.-D.** (2014). Dopamine-enabled anti-Hebbian timing-dependent plasticity in prefrontal circuitry. Front. Neural Circuits 8,38.
- **Rudy B, Fishell, Lee S, Hjerling-Leffler J.** (2011) Three groups of interneurons account for nearly 100% of neocortical GABAergic neurons. Dev Neurobiol. 71(1):45-61.
- **Seol GH, Ziburkus J, Huang S, Song L, Kim IT, Takamiya K, Huganir RL, Lee HK, Kirkwood A**. (2007) Neuromodulators control the polarity of spike-timing-dependent synaptic plasticity. Neuron. 20;55(6):919-29.
- **Serchov, T., Clement, H.W., Schwarz, M.K., Iasevoli, F., Tosh, D.K., Idzko, M., Jacobson, K.A., de Bartolomeis, A., Normann, C., Biber, K., and van Calker, D.** (2015). Increased signaling via adenosine A1 receptors, sleep deprivation, imipramine, and ketamine inhibit depressive-like behavior via induction of Homer1a. Neuron 87, 549–562.
- **Shao, C., Chen, P., Chen, Q., Zhao, M., Zhang, W.-N., & Yang, K**. (2019). Mu opioid receptors inhibit GABA release from parvalbumin interneuron terminals onto CA1 pyramidal cells. Biochemical and Biophysical Research Communications.

- **Singer W.** (1995) Development and plasticity of cortical processing architectures. Science. Nov 3;270 (5237):758-64.
- **Sohal VS, Zhang F, Yizhar O, Deisseroth K**. (2009) Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. Nature. 4;459(7247):698-702.
- **Somogyi P, Klausberger T.** (2005) Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus. J Physiol. Jan 1;562 (Pt 1):9-26.
- **Spear LP.** (2000) The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. Neurosci Biobehav Rev. 24:417–63.
- **Spruston N.** (2008) Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration. Nat Rev Neurosci.9(3):206-21
- **Steullet, P., Cabungcal, J.-H., Coyle, J., Didriksen, M., Gill, K., Grace, A. A., et al.** (2017). Oxidative stress-driven parvalbumin interneuron impairment as a common mechanism in models of schizophrenia. Mol. Psychiatry 22:936.
- **Storm, J. F.** (1990). Chapter 12 Potassium currents in hippocampal pyramidal cells. Understanding the Brain Through the Hippocampus the Hippocampal Region as a Model for Studying Brain Structure and Function, 161–187.
- **Takkala P, Woodin MA.** (2013) Muscarinic acetylcholine receptor activation prevents disinhibition-mediated LTP in the hippocampus. Front Cell Neurosci. Feb 28; 7:16.
- **Taylor, C. W., & Tovey, S. C.** (2010). IP3 Receptors: Toward Understanding Their Activation. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2(12), a004010–a004010.
- **Tong LM, Djukic B, Arnold C, Gillespie AK, Yoon SY, Wang MM, Zhang O, Knoferle J, Rubenstein JL, Alvarez-Buylla A, Huang Y.** (2014) Inhibitory

interneuron progenitor transplantation restores normal learning and memory in ApoE4 knock-in mice without or with Aβ accumulation. J Neurosci Jul 16;34 (29):9506-15.

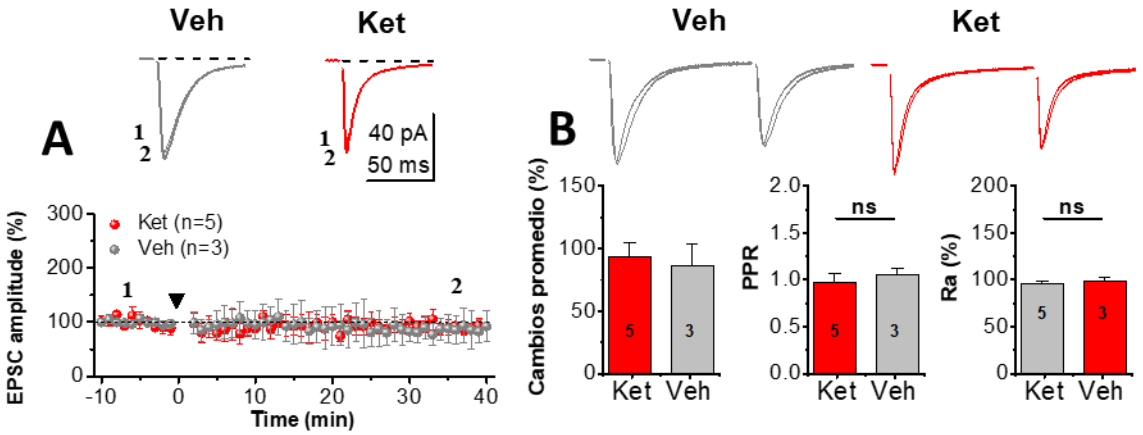
- **Tsubokawa H, Ross WN**. (1996) IPSPs modulate spike backpropagation and associated [Ca^{2+}]i changes in the dendrites of hippocampal CA1 pyramidal neurons. J. Neurophysiol. 76:2896– 906.
- **Tsubokawa H1, Ross WN.** (1996) IPSPs modulate spike backpropagation and associated [Ca^{2+}]i changes in the dendrites of hippocampal CA1 pyramidal neurons. J Neurophysiol. Nov;76(5):2896-906.
- **Tyler MW, Yourish HB, Ionescu DF, Haggarty SJ.** (2017) Classics in Chemical Neuroscience: Ketamine. ACS Chem Neurosci. 8(6):1122-1134.
- **Tzingounis, A. V., M. Kobayashi., R. A. Nicoll.** 2007. Hippocalcin gates the calcium activation of the slow afterhyperpolarization in hippocampal pyramidal cells. Neuron.53:487–493.
- **Uhlhaas PJ, Pipa G, Lima B, Melloni L, Neuenschwander S, Nikolić D, Singer W.** (2009) Neural synchrony in cortical networks: history, concept and current status. Front Integr Neurosci. 30; 3:17.
- **Wang, H.-X., & Gao, W.-J.** (2009). Cell Type-Specific Development of NMDA Receptors in the Interneurons of Rat Prefrontal Cortex. Neuropsychopharmacology, 34(8), 2028–2040.
- **Wespatat V, Tennigkeit F, Singer W.** (2004) Phase sensitivity of synaptic modifications in oscillating cells of rat visual cortex. J Neurosci. 13;24(41):9067

- **Whissell PD, Cajanding JD, Fogel N, Kim JC**. (2015) Comparative density of CCK- and PV-GABA cells within the cortex and hippocampus. Front Neuroanat. 23; 9:124.
- **Wong RO, Ghosh A**. (2002) Activity-dependent regulation of dendritic growth and patterning. Nat Rev Neurosci. Oct;3(10):803-12.
- **Xu TX, Yao WD.** (2010) D1 and D2 dopamine receptors in separate circuits cooperate to drive associative long- term potentiation in the prefrontal cortex. Proc Natl Acad Sci U S A. Sep 14;107(37):16366-71.
- **Xue M, Atallah BV, Scanziani M** (2014) Equalizing excitation-inhibition ratios across visual cortical neurons. Nature. Jul 31;511(7511):596-600.
- **Yang, S.-S., Li, Y.-C., Coley, A. A., Chamberlin, L. A., Yu, P., & Gao, W.-J.** (2018). Cell-Type Specific Development of the Hyperpolarization-Activated Current, Ih, in Prefrontal Cortical Neurons. Frontiers in Synaptic Neuroscience, 10.
- **Zaitsev, A. V., & Anwyl, R.** (2012). Inhibition of the slow afterhyperpolarization restores the classical spike timing-dependent plasticity rule obeyed in layer 2/3 pyramidal cells of the prefrontal cortex. Journal of Neurophysiology, 107(1), 205–215.
- **Zamberletti E, Beggiato S, Steardo L Jr, Prini P, Antonelli T, Ferraro L, Rubino T, Parolaro D.** (2014) Alterations of prefrontal cortex GABAergic transmission in the complex psychotic-like phenotype induced by adolescent delta-9-tetrahydrocannabinol exposure in rats. Neurobiol Dis. Mar; 63:35-47.
- **Zanos P, Moaddel R, Morris PJ, Riggs LM, Highland JN, Georgiou P, Pereira EFR, Albuquerque EX, Thomas CJ, Zarate CA Jr, Gould TD.** (2018) Ketamine

and Ketamine Metabolite Pharmacology: Insights into Therapeutic Mechanisms. Pharmacol Rev. 70(3):621-660.

- **Zhang, H., Sun, X., Wang, J., Zhang, Z., Zhao, H., Li, H., et al**. (2016). Reactive oxygen species-mediated loss of phenotype of parvalbumin interneurons contributes to long-term cognitive impairments after repeated neonatal ketamine exposures. Neurotox. Res. 30, 593–605.
- **Zhang, Y., Behrens, M. M., and Lisman, J. E**. (2008). Prolonged exposure to NMDAR antagonist suppresses inhibitory synaptic transmission in prefrontal cortex. J. Neurophysiol. 100, 959–965.
- **Zlatkovic, J., Todoroviæ, N., Boškoviæ, M., Pajoviæ, S. B., Demajo, M., and Filipoviæ, D.** (2014). Different susceptibility of prefrontal cortex and hippocampus to oxidative stress following chronic social isolation stress. Mol. Cell. Biochem. 393, 43–57.

ANEXOS



Anexo 1: La inducción de Potenciación a largo plazo (LTP) por STDP no genera cambios en la eficacia sináptica excitatoria. A- Gráfico de los experimentos de t-LTP (-10) Ketamina (rojo) y Veh (gris). Cada punto denota la amplitud promedio normalizada de las corrientes postsinápticas excitatorias (EPSC) por minuto. **B.-** (izquierda) Distribución promedio de amplitud normalizada de los EPSC en los experimentos t-LTP. (medio) Distribución promedio de los cambios en la PPR antes y después de la STDP (derecha) Distribución promedio la resistencia de acceso normalizada (Ra) durante la línea base y 35 minutos después al protocolo de STDP.

Intervalo (ms)	PPR Ket (n=7)	PPR Veh (n=7)	pValue
30	0.71 ± 0.13	0.36 ± 0.04	0.023 (*)
70	0.85 ± 0.07	0.62 ± 0.06	0.037 (*)
100	1.02 ± 0.17	0.67 ± 0.04	0.06
300	0.93 ± 0.08	0.71 ± 0.03	0.016 (*)

Anexo 2: Los animales tratados con Ketamina poseen una menor probabilidad de liberación GABAérgica. Tabla resumen con los valores obtenidos durante los protocolos de pulsos pareados entre los grupos experimentales, se muestra un aumento de la facilitación en los animales tratados con Ket, lo cual señala una menor probabilidad de liberación de GABA respecto al control. Se indica el intervalo entre el primer estímulo (R1) y el segundo (R2), la PPR fue calculada mediante la división del segundo estímulo en el primero (R2/R1). Resultados expresados como media ± SEM. * P <0,05.

Intervalo (ms)	PPR Ket (n=9)	PPR Veh (n=8)	pValue
30	0.94 ± 0.07	0.76 ± 0.09	0.150
70	0.92 ± 0.08	0.89 ± 0.06	0.743
100	0.92 ± 0.06	0.92 ± 0.08	0.738
300	0.90 ± 0.05	0.86 ± 0.03	0.441

Anexo 3: Los animales de los grupos Ketamina y Vehículo poseen similar probabilidad de liberación glutamatérgica. Tabla resumen con los valores obtenidos durante los protocolos de pulsos pareados entre los grupos experimentales. se observa una similar PPR, lo cual señala una similar probabilidad de liberación de glutamato. Se indica el intervalo entre el primer estímulo (R1) y el segundo (R2), la PPR fue calculada mediante la división del segundo estímulo en el primero (R2/R1). Resultados expresados como media ± SEM. * P <0,05.

	NMDA	
	Rise time	Decay time
Ket (n=8)	9.51 ± 1.29 ms	268.95 ± 22.41 ms
Veh (n=6)	10.33 ± 1.38 ms	283.00 ± 54.18 ms
pValue	0.677	0.816

Anexo 4: Los receptores NMDA de las PYN de mPFC poseen similar cinética entre los grupos experimentales. Tabla resumen con los valores obtenidos del análisis de la cinética del componente NMDA de los EPSCs evocados. Tanto el *rise time* como *el decay time* de la respuesta NMDA es similar entre los grupos experimentales. Resultados expresados como media ± SEM.

A	EPSP	
	Rise time	Decay time
Ket (n=6)	6.24 ± 0.67 ms	105.79 ± 8.10 ms
Veh (n=7)	6.91 ± 0.55 ms	144.99 ± 11.96 ms
pValue	0.45962	0.019 (**)

B	EPSC	
	Rise time	Decay time
Ket (n=9)	3.24 ± 0.37 ms	25.56 ± 1.15 ms
Veh (n=7)	2.52 ± 0.29 ms	35.72 ± 2.13 ms
pValue	0.183	0.001 (**)

Anexo 5: Los animales tratados con ketamina poseen un menor *decay* time de las eEPSP y eEPSC. Tabla resumen con los valores obtenidos del análisis de la cinética tanto de los EPSP (a) y EPSC (b) evocados previos a la inducción de plasticidad por STDP. El *decay time* tanto los EPSP como de las EPSC es menor en los animales tratados con Ket en comparación al control. No se encontraron cambios en el *rise time*. Resultados expresados como media ± SEM. P <0,05(*) p <0.01 (**).