UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

COMUNICACIÓN ASTROCITO-INTERNEURONA Y EL PROCESAMIENTO DE INFORMACIÓN EN LAS REDES NEURONALES

Tesis Doctoral

Sara Mederos Crespo

Directora:

Gertrudis Perea Parrilla

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

COMUNICACIÓN ASTROCITO-INTERNEURONA Y EL PROCESAMIENTO DE INFORMACIÓN EN LAS REDES NEURONALES

TESIS DOCTORAL CON MENCIÓN INTERNACIONAL

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA PRESENTADA POR

Sara Mederos Crespo

Madrid, 2019

Directora:

Gertrudis Perea Parrilla

Tutor:

Manuel Guzmán Pastor

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE MADRID

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR

D./Dña. Sara Mederos Crespo,
estudiante en el Programa de Doctorado Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina,
de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y titulada:

COMUNICACIÓN ASTROCITO-INTERNEURONA Y EL PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN EN LAS REDES NEURONALES

y dirigida por: Gertrudis Perea Parrilla

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 13 de junio de 2019

Fdo.: _____

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.

Dña. Gertrudis Perea Parrilla, Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en el Instituto Cajal (CSIC), Avda. Doctor Arce 37, Madrid.

HACE CONSTAR:

Que **Dña. Sara Mederos Crespo** ha realizado bajo mi dirección los trabajos de investigación destinados a la obtención del grado de Doctor en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid, cuyos resultados están recogidos en la presente memoria de Tesis Doctoral titulada "*Comunicación Astrocito-Interneurona y el procesamiento de información en las redes neuronales*".

Para que así conste y surta los efectos oportunos, lo firmo en Madrid, a 6 de Septiembre de 2019.

Fdo. Dra. Gertrudis Perea

AVDA. DOCTOR ARCE, 37
28002 MADRID ESPAÑA
TEL.: 91 585 47 50
FAX: 91 585 47 54

Los resultados originales expuestos en la presente tesis doctoral han sido compilados en las siguientes publicaciones científicas:

- Melanopsin for precise optogenetic activation of astrocyte-neuron networks. Sara Mederos, Alicia Hernández-Vivanco, Jorge Ramírez-Franco, Mario Martín-Fernández, Marta Navarrete, Aimei Yang, Edward S. Boyden, Gertrudis Perea. Glia 2019 doi.org/10.1002/glia.23580

- Astrocyte refinement of inhibitory tone in prefrontal cortex dictates goal directed-behaviors. Sara Mederos, Julio Esparza, Cristina Sánchez-Puelles, Manuel Valero, Alexey Ponomarenko, Gertrudis Perea. Enviado.

Adicionalmente, en el marco de esta tesis se obtuvieron resultados para otros proyectos que, hasta la fecha, han derivado en la participación de la doctoranda en las siguientes publicaciones:

- Transient callosal projections of L4 neurons are eliminated for the acquisition of local connectivity. Noelia De León Reyes, Sara Mederos, Isabel Varela, Gertrudis Perea, Mª José Galazo, Marta Nieto. Nature Communications 2019. Aceptado.

- GABAergic-astrocyte signaling: A refinement of inhibitory brain networks. Sara Mederos, Gertrudis Perea. Glia. 2019 May 30. doi: 10.1002/glia.23644.

- Monitoring Interneuron-Astrocyte Signaling and Its Consequences on Synaptic Transmission. Sara Mederos, Gertrudis Perea. Methods Mol Biol. 2019 doi: 10.1007/978-1-4939-9068-9_9.

- Astrocyte-Neuron Networks: A Multilane Highway of Signaling for Homeostatic Brain Function. Sara Mederos, Candela González-Arias, Gertrudis Perea. Front Synaptic Neurosci. 2018. doi: 10.3389/fnsyn.2018.00045. eCollection 2018.

- Neuron–astrocyte signaling is preserved in the aging brain. Marta Gómez-Gonzalez, Mario Martín-Fernández, Ricardo Martínez-Murillo, Sara Mederos, Alicia Hernández-Vivanco, Stephanie Jamison, Ana P. Fernandez, Julia Serrano, Pilar Calero, Hunter S. Futch, Rubén Corpas, Coral Sanfeliu, Gertrudis Perea, Alfonso Araque. Glia 2017 doi.org/10.1002/glia.23112

- Activity-dependent switch of GABAergic inhibition into glutamatergic excitation in astrocyte-neuron networks. Gertrudis Perea, Ricardo Gómez, Sara Mederos, Ana Covelo, Jesús J Ballesteros, Laura Schlosser, Alicia Hernández-Vivanco, Mario Martín-Fernández, Ruth Quintana, Abdelrahman Rayan, Adolfo Díez, Marco Fuenzalida, Amit Agarwal, Dwight E Bergles, Bernhard Bettler, Denise Manahan-Vaughan, Eduardo D Martín, Frank Kirchhoff, Alfonso Araque. Elife. 2016 pii: e20362. doi: 10.7554/eLife.20362.

- Insulin Regulates Astrocytic Glucose Handling Through Cooperation With IGF-I. Fernandez AM, Hernandez-Garzón E, Perez-Domper P, Perez-Alvarez A, Mederos S, Matsui T, Santi A, Trueba-Saiz A, García-Guerra L, Pose-Utrilla J, Fielitz J, Olson EN, Fernandez de la Rosa R, Garcia Garcia L, Pozo MA, Iglesias T, Araque A, Soya H, Perea G, Martin ED, Torres Aleman I. Diabetes. 2017 Jan;66(1):64-74. doi: 10.2337/db16-0861. Epub 2016 Oct 10.

- A First-in-Class Small-Molecule that Acts as a Dual Inhibitor of HDAC and PDE5 and that Rescues Hippocampal Synaptic Impairment in Alzheimer's Disease Mice. Cuadrado-Tejedor M, Garcia-Barroso C, Sánchez-Arias JA, Rabal O, Pérez-González M, Mederos S, Ugarte A, Franco R, Segura V, Perea G, Oyarzabal J, Garcia-Osta A. Neuropsychopharmacology. 2017 Jan;42(2):524-539. doi: 10.1038/npp.2016.163. Epub 2016 Aug 23.

- Concomitant histone deacetylase and phosphodiesterase 5 inhibition synergistically prevents the disruption in synaptic plasticity and it reverses cognitive impairment in a mouse model of Alzheimer's disease. Cuadrado-Tejedor M, Garcia-Barroso C, Sanzhez-

Arias J, Mederos S, Rabal O, Ugarte A, Franco R, Pascual-Lucas M, Segura V, Perea G, Oyarzabal J, Garcia-Osta A. Clin Epigenetics. 2015 Oct 8;7:108. doi: 10.1186/s13148-015-0142-9. eCollection 2015.

Este trabajo se realizó con la ayuda económica del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (BFU2013-47265R). La doctoranda fue dotada con una Ayuda Predoctoral para la formación de personal investigador del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (BES-2014-067594), y una ayuda del mismo Ministerio para la estancia breve de 4 meses (EEBB-I-18-12868) en el laboratorio del Dr. Alexey Ponomarenko (Universidad Heinrich Heine de Düsseldorf, Alemania), junto con una ayuda EMBO short-term (8287) para una estancia breve de 5 semanas en el laboratorio del Dr. György Buzsáki (Universidad NYU, EEUU).

‘Cuando todo indica que por
un lugar no se puede pasar,
es necesario pasar’

A.F. Mummery

Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a Gertrudis Perea, directora de este trabajo, por sus constantes orientaciones, su apoyo y su motivación. Mi gratitud por haber compartido conmigo, con la mayor generosidad, su conocimiento, pasión y entusiasmo por la ciencia y por haber encontrado siempre el tiempo y la energía para orientarme en todos los aspectos científicos relativos a esta aventura. Asimismo, quiero agradecerle la paciencia demostrada en la lectura de los manuscritos de esta memoria. Todo ha sido posible gracias a tu cercanía, tu disponibilidad y por la enorme confianza que depositaste en mí desde el primer día, gracias Gertru.

A Manuel Guzmán, por su orientación académica, lidiar con la burocracia necesaria y sacar tiempo para hacerme la vida más sencilla.

A Alexey Ponomarenko, por abrirme las puertas de su laboratorio y darme la oportunidad de convertir unos meses en una increíble y apasionante aventura científica, nunca sobran las nuevas perspectivas.

A Washington Buño, Eduardo Martín, Ricardo Martín, Raquel Bajo, Marta Navarrete por las aportaciones científicas, las interesantes discusiones y las oportunidades de aprender a vuestro lado. Gracias.

Especialmente a Alicia Hernández por su paciencia y tener siempre alguna cucharada de ánimo, tangible o intangible y a Candela Gónzalez por haber sido una magnífica compañera y amiga, además de haber compartido siempre el momento para disfrutar de la maravillosa locura, necesaria para la felicidad.

A todos los que han pasado en este tiempo por el Laboratorio de Redes Neurogliales, habéis formado parte de esto. En especial nombrar a Jorge Ramírez, Cristina Sánchez y Julio Esparza, por compartir partes del trabajo realizado durante esta tesis y su motivación soporte y ganas. Gracias. A los que han sido y son parte de los laboratorios de Marta Navarrete, Liset Menéndez de la Prida, Eduardo Martín, Alexey Ponomarenko y György Buzsáki por su apoyo y ayuda durante la realización de esta tesis.

A Carla Heikenfeld por su inmensa bondad, al acogerme en su familia y apoyarme, cuando más falta hacía.

A Manuel Valero por ser un amigo y una fuente de motivación. Por las apasionantes discusiones científicas y por su enorme generosidad.

Han sido muchas personas las que han hecho que haya llegado aquí, agradeceros serían demasiadas páginas, de forma que prescindiré de hacerlo. A todos los que siento que son parte de esta historia al ser parte del camino de mi vida, y con todo siguen siempre. Especialmente a J.L y a M.L por los increíbles años de convivencia, sin vosotras esta sería seguramente otra historia, por vuestro apoyo. A M.A, I.L y A.J que dan un nuevo color a todos los momentos. A M.C y a I.V, por seguir creciendo juntas muchos años más. A C.L, L.G y E.H por el recorrido compartido, el académico y

el que está más allá, que aún nos queden nuevos de ambos. A R.C y L.D, por todo desde antes de que tenga memoria. A los que sabéis que formáis parte, gracias.

Quiero expresar mi agradecimiento a mi madre y a mi padre, por darme las herramientas para descubrir que la manera más bonita de estar en el mundo es encontrar algo que te apasione. Por apoyarme, por sujetarme y por animarme. Nunca habrá suficientes palabras para vosotros.

A Gonzalo, por su infinita paciencia, entendimiento y generosidad. Porque sigamos soñando con montañas y cielos estrellados.

A L . M . por mostrarme la ciencia. Fascinante.
A M . E . E . por enseñarme la creatividad. Imprescindible.
A G . R . por compartir aventuras. Indescriptibles.

Índice general

Agradecimientos I

Índice V

Resumen XVII

Summary XXII

1. Introducción **3**

1.1. Sinapsis Tripartita 7

1.1.1. Astrocitos y su relevancia en la función cerebral 8

1.1.2. La excitabilidad astrocitaria: la señalización por el ion calcio 9

1.1.3. Comunicación bidireccional astrocito-neurona 12

1.2. Estimulación selectiva de astrocitos 15

1.2.1. Aproximaciones experimentales para la activación de astrocitos 16

1.2.2. Optogenética en astrocitos 19

1.3. La inhibición y la actividad cortical 20

1.3.1. Interneuronas: clasificación y propiedades generales 21

1.3.2. Balance excitación/ inhibición 24

1.3.3. Oscilaciones de los circuitos neuronales 25

1.3.4. Astrocitos y el sistema GABAérgico 29

1.4. Memoria y cognición 31

1.4.1. El hipocampo: estructura y función 31

1.4.2. Plasticidad sináptica y memoria 32

1.4.3. Corteza Prefrontal Medial: estructura y función 34
1.4.4. Circuitos cerebrales y toma de decisiones 36

2. Objetivos **41**

3. Materiales y Métodos **45**

3.1. Animales de experimentación 45
3.2. Cirugías 46
3.2.1. Infecciones virales 46
3.2.2. Implantación de fibras ópticas 47
3.2.3. Implantación de electrodos para registro, *silicon probes* 48
3.3. Obtención de rodajas de cerebro 50
3.4. Imagen de calcio 51
3.5. Electrofisiología 53
3.5.1. Electrofisiología *in vitro* 53
3.5.2. Electrofisiología *in vivo* 57
3.6. Técnicas inmunohistológicas 58
3.7. Paradigmas comportamentales 59
3.7.1. Laberinto en T 60
3.7.2. Tareas de reconocimiento de objetos 60
3.7.3. Campo abierto 61
3.7.4. Laberinto en cruz elevado 61
3.7.5. Seguimiento de la posición 62
3.8. Análisis de datos 63
3.8.1. Análisis de señales de calcio 63
3.8.2. Análisis de datos de electrofisiología *in vitro* 64
3.8.3. Análisis de datos de electrofisiología *in vivo* 65
3.8.4. Análisis histológicos y de co-localización 74
3.8.5. Procedimientos estadísticos 75

4. Resultados **79**

4.1. Melanopsin controla de forma precisa las redes neuro-gliales 79

4.1.1. Melanopsin: nueva herramienta optogenética para el control de calcio astrocitario 80

4.1.2. La activación de melanopsin en astrocitos aumenta la eficacia de la transmisión sináptica 90

4.1.3. ChR2 estimula la señal de Ca^{2+} en astrocitos y la modulación sostenida de la transmisión sináptica 95

4.1.4. La activación de melanopsin estimula vías acopladas a proteínas G y Ca^{2+} intracelular 101

4.1.5. La señalización purinérgica es la responsable de la plasticidad sináptica inducida por melanopsin 104

4.1.6. La estimulación de astrocitos con melanopsin a baja frecuencia induce potenciación a largo plazo (LTP) en el hipocampo 107

4.1.7. Melanopsin como herramienta optogenética para estudios *in vivo* . . 113

4.2. La señalización GABAérgica en astrocitos participa en el balance E/I de los circuitos corticales 115

4.2.1. La estimulación de PV+ en CPFm con un patrón theta-gamma recluta la actividad astrocitaria 115

4.2.2. La señalización GABAérgica estimula la liberación de glutamato en astrocitos que contribuye al incremento del tono inhibitorio 123

4.2.3. La estimulación selectiva de astrocitos con melanopsin recapitula la potenciación de la transmisión GABAérgica 124

4.2.4. La activación de receptores $GABA_B$ en astrocitos es necesaria para la correcta ejecución de funciones cognitivas 125

4.2.5. La ausencia de $GABA_BR$ en astrocitos modifica los patrones de oscilación de la CPFm *in vivo* 132

4.2.6. Modificación de los patrones de disparo de las neuronas de CPFm en ratones GbKO 136

4.2.7. La activación de astrocitos con melanopsin mejora la realización de tareas cognitivas 139
4.2.8. La estimulación con melanopsin en animales GbKO rescata las deficiencias observadas en la toma de decisiones 141

5. Discusión **147**
5.1. Melanopsin para el control preciso de redes neuro-gliales 147
5.2. La señalización GABAérgica en astrocitos es necesaria para la correcta planificación y toma de decisiones 153

Conclusiones **163**

Conclusions **165**

Bibliografía **167**

A. Publicaciones **199**
A.0.1. Melanopsin for precise optogenetic activation of astrocyte-neuron networks 199

Índice de figuras

1.1. Redes Neuro-gliales: unidades de señalización en el cerebro 5
1.2. Sinapsis Tripartita 8
1.3. Excitabilidad astrocitaria: variaciones de calcio intracelular 11
1.4. Heterogeneidad de las redes Neuro-Gliales 14
1.5. Control de la actividad celular: optogenética 19
1.6. Diversidad de interneuronas y conectividad en capas corticales 23
1.7. Excitación/Inhibición: un balance necesario para la correcta función cerebral 25
1.8. Coherencia y sincronización en áreas corticales 28
1.9. Esquema de la estructura del hipocampo 31
1.10. Corteza prefrontal medial (CPFm) 34
1.11. Conexiones entre la corteza prefrontal (CPF) y el hipocampo 36

3.1. Esquema de los pasos llevados a cabo en las cirugías 47
3.2. Imágenes del diseño de electrodos para registros *in vivo* 49
3.3. Preparación de rodajas de cerebro 51
3.4. GDPβS bloquea de manera eficaz la red astrocitaria 53
3.5. Intensidades de estimulación con luz en astrocitos 55
3.6. Protocolos de estimulación 56
3.7. La estimulación con láser no generan reactividad y daño tisular 59
3.8. Esquema de pruebas comportamentales 62
3.9. Definición de eventos de calcio en regiones de interés 64
3.10. Potencial de Campo (*Local Field Potential*) 67

3.11. Clasificación de las neuronas unitarias/(*spikes*) en excitadoras e inhibidoras . 69
3.12. Épocas Theta/Delta 71

4.1. Estrategia viral con melanopsin y expresión selectiva en astrocitos 80
4.2. Distribución de la expresión de melanopsin en astrocitos 81
4.3. La expresión de AAVs no promueve la activación microglial 83
4.4. Co-expresión de melanopsin y GCaMP6 en astrocitos 84
4.5. La expresión de melanopsin en astrocitos estimula la señalización Ca^{2+} . . . 85
4.6. La estimulación de melanopsin recluta la señalización Ca^{2+} en los microdominios 87
4.7. Confirmación de la estimulación de eventos de Ca^{2+} somáticos por melanopsin 88
4.8. La expresión ectópica de melanopsin induce corrientes de salida en la membrana de astrocitos 89
4.9. La activación por luz de astrocitos que expresan melanopsin induce la potenciación de la transmisión sináptica excitadora en neuronas de CA1 91
4.10. La activación de melanopsin potencia la liberación de glutamato en los terminales sinápticos 92
4.11. Modificaciones de las condiciones estimulación con melanopsin 93
4.12. Señales de Ca^{2+} en astrocitos transfectados con vector 94
4.13. Estimulación de astrocitos transfectados con vector no provoca cambios sinápticos 95
4.14. La activación selectiva de ChR2 de los astrocitos hipocampales estimula la señalización de Ca^{2+} 96
4.15. Propiedades electrofisiologicas astrocitos-ChR2 97
4.16. Modulación sináptica inducida por estimulación de ChR2 98
4.17. Comparativa de las respuestas inducidas por melanopsin y ChR2 en las redes astrocito-neurona del hipocampo 99
4.18. Expresión del reportero mCherry de los distintos constructos virales 100
4.19. Melanopsin desencadena señalización dependiente de Ca^{2+} y GPCR 101
4.20. Melanopsin desencadena señales de Ca^{2+} dependientes de Ip3R2 en los astrocitos 103

4.21. La modulación de la transmisión sináptica por melanopsin está ausente en ratones Ip3r2$^{-/-}$ . . . 104
4.22. La transmisión sináptica inducida por melanopsin requiere señalización purinérgica por parte de astrocitos . . . 106
4.23. Protocolo de baja frecuencia (LFS) en astrocitos . . . 108
4.24. La activación por LFS induce potenciación de las respuestas de Ca^{2+} en astrocitos . . . 109
4.25. La activación de astrocitos con LFS induce LTP hipocampal . . . 111
4.26. Contribución de los NMDARs en la LTP inducida por astrocitos . . . 112
4.27. LFS en astrocitos aumenta el rendimiento de la memoria . . . 113
4.28. Identificación de neuronas PV+ y células PC en CPFm . . . 116
4.29. Patrón anidado theta-gamma a diferentes duraciones provoca distintas respuestas de la transmisión sináptica inhibidora en CPFm . . . 117
4.30. La activación de interneuronas PV+ con un patrón theta-gamma de 30s es eficiente en reclutar astrocitos que participan en la modulación sináptica inhibitoria . . . 118
4.31. Respuesta de Ca^{2+} en astrocitos mediada por $GABA_BR$ tras la estimulación de PV+ . . . 119
4.32. Fenómeno presináptico: análisis CV y parejas monosinápticas de PV-PC . . . 120
4.33. $GABA_BR$ astrocitario regula la potenciación de la inhibición inducida por las PV+ sobre neuronas PC . . . 121
4.34. Estimulación poblacional de células PV+ mediante ChR2 . . . 122
4.35. La potenciación de la inhibición es dependiente de la liberación de glutamato por los astrocitos . . . 123
4.36. Melanopsin recapitula la potenciación de la inhibición . . . 124
4.37. Expresión de GFAPCre en astrocitos de CPFm . . . 126
4.38. Disminución de niveles $GABA_BR1$ en astrocitos GbKO . . . 127
4.39. Los astrocitos GbKO no responden al agonista baclofen . . . 128

4.40. La ausencia de $GABA_BR$ en astrocitos de CPFm condiciona la conducta de ratones GbKO . . . 129
4.41. La ausencia de $GABA_BR$ en astrocitos de CPFm disminuye la memoria de trabajo . . . 131
4.42. Potencia del LFP durante la exploración activa . . . 132
4.43. Disfunción de las oscilaciones neuronales relacionadas con la toma de decisiones en la CPFm de ratones GbKO . . . 134
4.44. Alteración de PAC en ratones GbKO . . . 135
4.45. La ausencia de $GABA_BR$ altera los patrones de actividad neuronal en CPFm 137
4.46. Las neuronas de ratones GbKO pierden el disparo acoplado a la fase gamma durante la realización de tareas cognitivas . . . 139
4.47. La activación de astrocitos con melanopsin mejora la toma de decisiones . . . 140
4.48. La expresión de melanopsin en astrocitos mejora OIP . . . 141
4.49. La expresión de melanopsin en astrocitos rescata las deficiencias de animales GbKO en la toma de decisiones . . . 142

5.1. Melanopsin discrimina frecuencias de estimulación . . . 151
5.2. Activación de astrocitos por protocolos de estimulación theta-gamma sobre las neuronas PV+ . . . 154
5.3. Realización de tareas cognitivas en animales control, GbKO y transfectados con melanopsin . . . 158
5.4. Los astrocitos participan en la modulación de la actividad de los circuitos corticales, aumentando sus posibilidades computacionales . . . 159

Acrónimos

ACC	Corteza cingulada anterior, del inglés *Anterior cigulate cortex*
ACh	Acetilcolina
Ado	Adenosina
Arch	Archeorhodopsin
ATP	Adenosín trifosfato
Axx	Axoaxónicas
A1Rs	Receptores adenosina de tipo I
BC	Del inglés *basket cells*, células en cesto
BS	Biestratificadas
CA	*Cornu Ammonis*
Ca^{2+}	Ion calcio
CCK	Colecistoquinina
ChR	Channelrhodopsin
CM	Corteza motora
CNO	Clozapine-N-oxide
CPFm	Corteza prefrontal medial
CS	Corteza somatosensorial
CTC	Del inglés *Communication Through Coherence*
CV	Corteza visual
DBC	Células *double bouquet*
DG	Giro Dentado, del inglés *dentate gyrus*
DREADDS	Del inglés *Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs*
EC	Corteza entorrinal, del inglés *entorinal cortex*
eCBs	Endocannabionoides
EEG	Electroencefalograma
E/I	Excitación/Inhibición
EPSC	Del inglés *Excitatory postsynaptic current*
GABA	Ácido γ-aminobutírico
$GABA_B$	Receptor GABA tipo B
GAD	Glutamato descarboxilasa
GATs	Transportadores de GABA
GbKO	Animales con delección $GABA_B$ en astrocitos de mPFC
GbWT	Animales silvestres con infección GFAP-Cre en mPFC
GECIs	Del inglés *Genetically Encoded Calcium Indicators*
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GPCRs	Receptor acoplado a proteínas G
Gts	Gliotransmisores

hM3	Del inglés *human M3 muscarinic*
hM4	Del inglés *human M4 muscarinic*
IL	Corteza infralímbica, del inglés *Infralimbic cortex*
IPSC	Del inglés *Inhibitory postsynaptic current*
IP3	Inositol trifosfato
IP3R2	Receptor IP3 tipo 2
LFP	Potencial de campo, *Local Field Potential*
LTD	Depresión a largo plazo, del inglés *Long Term Depression*
LTP	Potenciación a largo plazo, del inglés *Long Term Potentiation*
mGluR1	Receptor metabotrópico de glutamato tipo I
NMDA	Ácido N-metil-D-aspártico
NMDAR	Receptor de NMDA
NOL	Del inglés *Novel Object Location*
Nts	Neurotransmisores
OIP	Del inglés *Object in Place*
PA	Potencial Acción
PC	Célula piramidal glutamatérgica (célula principal)
PFA	Paraformaldehido
PL	Corteza prelímbica, del inglés *Prelimbic cortex*
PV+	Célula parvoalbúmina positiva
RE	Retículo endoplasmático
RyR	Rianodina
SICs	Del inglés *Slow inward currents*
SLM	*Stratum lacunosum-moleculare*
SNARE	Del inglés *Soluble NSF Attachment Protein REceptor*
SNC	Sistema Nervioso Central
SPM	Hipótesis plasticidad y memoria, del inglés *synaptic plasticity and memory*
SR	*Stratum Radiatum*
Sst	Somatostatina
STD	Depresión a corto plazo, del inglés *Short Term Depression*
STP	Potenciación a corto plazo, del inglés *Short Term Potentiation*
TNF	Factor de necrosis tumoral
TRPA1	Del inglés *Transient Receptor Potential*
VIP	Péptido intestinal vasoactivo, del inglés *vasoactive intestinal peptide*
3D	Tres dimensiones
5-HT3	5-hidroxitriptamina receptor tipo 3 para serotonina

Resumen

Bajo el título 'COMUNICACIÓN ASTROCITO-INTERNEURONA Y EL PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN EN LAS REDES NEURONALES' se recoge el trabajo realizado durante la ejecución de esta tesis doctoral, en la que se ha estudiado el control GABAérgico y el papel de los astrocitos en la regulación del tono inhibitorio y los procesos cognitivos. El procesamiento de la información en el cerebro refleja la relación entre eventos sinápticos excitatorios e inhibitorios que dan lugar a respuestas fisiológicas relevantes. El papel crucial de la inhibición GABAérgica en la modulación la actividad espontánea e inducida en los circuitos neuronales, la posiciona en el centro de estudio para un mejor entendimiento de los procesos cognitivos que subyacen el comportamiento animal. En el Sistema Nervioso destaca la presencia de las células de glía, con funciones diversas y, al mismo tiempo, esenciales en su fisiología. Los astrocitos, las células gliales más numerosas, establecen una comunicación dinámica con los elementos neuronales, conocida como Sinapsis Tripartita. Sin embargo, el conocimiento de las propiedades que rigen esta señalización proviene fundamentalmente del estudio de sinapsis excitadoras sobre neuronas piramidales, relegando a un segundo plano el análisis de la interacción entre interneuronas GABAérgicas y astrocitos, así como las implicaciones funcionales de esta interacción.

El estudio de la señalización astrocito-neurona requiere del uso de nuevos métodos y herramientas experimentales y de análisis, que permitan la monitorización y manipulación de los astrocitos sin alterar de forma directa la respuesta neuronal, con el fin de determinar el papel que juegan estas células en los circuitos cerebrales.

Por tanto, el objetivo de esta tesis doctoral ha sido en primer lugar, desarrollar y caracterizar herramientas ópticas que faciliten el estudio de la comunicación astrocito-neurona desde un punto de vista fisiológico, basándose en el uso de melanopsin, una proteína-G fotosensible, que permite controlar la actividad astrocitaria. Y en segundo lugar, estudiar las propiedades que subyacen la señalización entre astrocitos y neuronas GABAérgicas, y su participación en los eventos sinápticos y los circuitos corticales gobernados por estas células inhibitorias.

Para el abordaje de tales objetivos se emplearon: registros de patch-clamp en la configuración célula entera *in vitro* en secciones de hipocampo y corteza prefrontal medial (CPFm),

registros extracelulares *in vivo* en la CPFm, imagen de Ca^{2+}, empleo de opsinas para control optogénetico de la actividad celular, identificación histológica de poblaciones celulares y marcadores de membrana, estudios de comportamiento de los sujetos de experimentación y análisis computacional.

Los resultados obtenidos muestran por primera vez el uso de melanopsin, un fotopigmento sensible a luz visible y acoplado a proteínas G, para la manipulación de las señales intracelulares de Ca^{2+} en astrocitos, tanto a nivel del soma celular como de los procesos ramificados de los astrocitos. El análisis de las respuestas inducidas por luz demuestra que melanopsin recapitula la señalización intracelular inducida por receptores metabotrópicos acoplados a proteínas Gq sensibles a neurotransmisores, indicando que se trata de una herramienta optogenética idónea para inducir respuestas astrocitarias similares a las producidas por la actividad neuronal. Asimismo, modificar el patrón de estimulación por luz de melanopsin permite generar respuestas no lineales, tanto en las señales de Ca^{2+} astrocitarias como en las respuestas sinápticas derivadas de su activación; con lo que se consigue controlar de forma exógena el grado de activación de los astrocitos y evaluar su impacto tanto en los circuitos donde están localizados como en el comportamiento animal. Por tanto, estos resultados muestran la viabilidad de melanopsin como herramienta de control de la actividad astrocitaria *in vitro* e *in vivo* y ponen en relieve el papel central que juegan los astrocitos en los procesos cognitivos.

Adicionalmente, los resultados derivados de esta tesis doctoral revelan las propiedades de la señalización entre neuronas GABAérgicas, en concreto de las interneuronas parvoalbúmina positivas (PV+), y astrocitos indicando la contribución decisiva de esta comunicación en la respuesta final de las neuronas principales, y durante los procesos de memoria y la toma de decisiones. Así, hemos encontrado que los astrocitos responden a diferentes patrones de actividad de las interneuronas PV+ aumentando el tono inhibitorio en las capas 2/3 de la corteza prefrontal medial (CPFm), que resulta en una alteración del balance excitación/inhibición en los circuitos corticales. El estudio farmacológico demostró que la potenciación de la inhibición está mediada por receptores de $GABA_B$ ($GABA_BRs$) en los astrocitos, y es dependiente de la señalación por Ca^{2+} en los astrocitos. Asimismo, la potenciación de la inhibición requiere de la activación de receptores metabotrópicos de glutamato de tipo I (mGluRI) en los terminales presinápticos inhibitorios que aumentan la eficacia en la liberación de GABA. El uso de melanopsin para activar de forma específica astrocitos imitando la actividad de las

interneuronas PV+ induce un aumento del tono inhibitorio sobre las neuronas principales de CPFm, al mismo tiempo que ratones que expresan melanopsin en astrocitos y son estimulados con luz presentan una mejora en la ejecución de tareas cognitivas y la toma de decisiones que requieren la participación directa de la CPFm, recuperando incluso los déficits cognitivos encontrados en modelos que presentan ausencia de GABABRs específica en astrocitos.

En conclusión, estos resultados indican que los astrocitos participan en la regulación del tono inhibitorio de los circuitos de la corteza prefrontal de ratón, crucial para la correcta ejecución de tareas relacionadas con la toma de decisiones. Los resultados de este estudio evidencian el impacto de la unidad de señalización astrocito-PV+ en las funciones cerebrales, contribuyendo así a nuestro conocimiento del papel que tienen los astrocitos en el balance excitación/inhibición (E/I) cortical y su relación con los procesos cognitivos.

Summary

Under the title 'INTERNEURON-ASTROCYTE BIDIRECTIONAL COMMUNICATION AND INFORMATION PROCESING IN NEURONAL NETWORKS' we have collected the work done during the execution of this doctoral thesis, which has studied the GABAergic control and role of astrocytes in the regulation of inhibitory tone and related cognitive processes. Information processing in the brain reflects the relationship between excitatory and inhibitory synaptic events that give rise to relevant physiological responses. The crucial role of GABAergic inhibition in shaping spontaneous and evoked activity in neural circuits, has positioned it in the center of research to reach the understanding of cognitive processes underlying animal behavior. Within the Nervous System, it is important to highlight the presence of glial cells, with diverse functions that are essential in the physiology of the brain, Astrocytes, one of the most numerous types of glial cells, establish a dynamic crosstalk with neurons, term as the Tripartite Synapse. However, the knowledge of the properties that govern this signaling is mainly based on the study of excitatory synapses onto pyramidal neurons, relegating the analysis of the interaction between Gabaergic interneurons and astrocytes, as their functional implications.

The study of astrocyte-neuronal signaling requires the use of new methods together with novel experimental tools and analyses that allow to monitore and to manipulate astrocytes, without indirectly altering neuronal responses, with the porpouse of determine the role of these astrocytic cells in brain circuits.

Therefore, the aim of this doctoral thesis has been first, to develop and characterize optical tools that enable the study of this communication, astrocyte-neuron, from a physiological point of view, based on the use of melanopsin a protein-G photosensitive that allows the specific control of astrocytic activity. Second, to study the properties underlying the signaling between astrocytes-GABAergic neurons and their role in the synaptic events and cortical circuites that are shaped and ruled by these inhibitory cells.

To achieve these goals, we used multidisciplinary methods, including: patch-clamp slices recordings in the whole cell configuration in sections of hippocampus and medial prefrontal cortex (CPFm), *in vivo* extracellular recordings in CPFm, Ca^{2+} imaging, optogenetics to control cellular populations by light, histological profiling of cells by specific markers, beha-

vioral tasks and computational analysis.

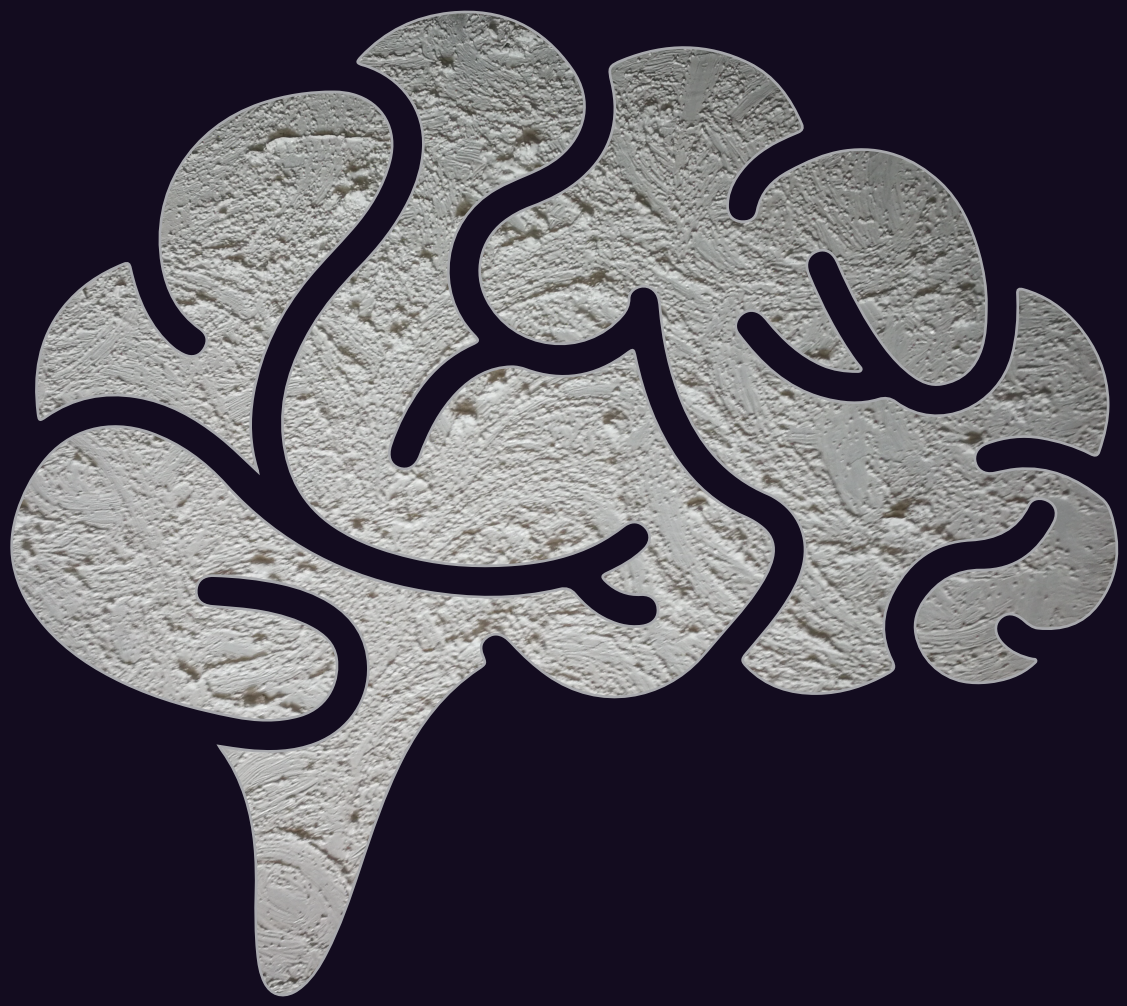
These results are the first evidence of the use of melanopsin, a G-protein photopigment, for manipulating intracellular Ca^{2+} signals in astrocytes, which manages to recruit Ca^{2+} increases both at the level of cell soma as in the branched processes of astrocytes. The analysis of these light-induced responses demonstrates that melanopsin recapitulates the intracellular signaling induced by metabotropic G protein coupled receptors that are sensitive to neurotransmitters, indicating it is a valuable tool for astrocytes. Likewise, melanopsin allows to modify the patterns of stimulation by light and generate nonlinear responses in both Ca^{2+} signals and synaptic responses derived from their activation. Thus,by using melanopsin it is possible to precisely tune their modulation by exogenously manipulation the level of activation of astrocytes and evaluate their impact on the circuits where they are located. Finally, these results demonstrate the viability of melanopsin as a tool to control the astrocitic activity *in vitro* and *in vivo* and highlight the essential role of astrocytes in cognitive processes.

Furthermore, our results show signaling properties between interneurons, namely parvalbumin positive interneurons (PV+) and astrocytes, indicating the decisive contribution of this communication in the final synaptic output of principal neurons and during memory retrieval and decision making. Furthermore, we have found that astrocytes respond to different patterns of PV + activity increasing the inhibitory tone of layer 2/3 of the medial prefrontal cortex (mPFC), resulting in a modulation of excitation/inhibition balance in cortical circuits. Pharmacological studies demonstrated that potentiation of inhibition is mediated by $GABA_B$ receptor ($GABA_BRs$) in astrocytes, and is dependent on Ca^{2+} signaling by astrocytes. Additionally, the potentiation of inhibition requires activation of metabotropic glutamate receptors type I (mGluRl) in inhibitory presynaptic terminals that increase the efficacy of GABA release. By using melanopsin to activate astrocytes simulating the inputs by PV + interneurons we were able to recapitulate the increased in inhibitory tone on principal neurons of mPFC, while mice expressing melanopsin that were stimulated with light improve the performance of tasks that rely on mPFC and decision-making, or are even able to recover deficits associated models showing the absence of $GABA_BRs$ in astrocytes.

To conclude, the results shown indicate that astrocytes are involved in the increased tone inhibitory circuits of the prefrontal cortex of mouse, crucial for the proper execution of decisions related tasks. The results of this study highlight the impact of astrocyte-PV

units signaling in brain functions, thereby contributing to our understanding of the role of astrocytes in the cortical excitation / inhibition (E / I) balance and its relationship for cognitive processes.

Capítulo 1



Introducción

1 | Introducción

El cerebro ha cautivado la atención de la ciencia durante siglos de estudio por ser el órgano al que se le atribuyen las claves de los procesamientos sensoriales, comportamientos innatos, la memoria y las capacidades cognitivas (Carus-Cadavieco et al., 2017; Moser et al., 2014; Simonov; Robbins, 2011; Beltramo and Scanziani, 2019; Gazzaniga et al.). El Sistema Nervioso (SN) se encarga de producir respuestas comportamentales que son la consecuencia del procesamiento de la información proveniente del medio externo y del estado interno del sujeto. El cerebro de los mamíferos ha evolucionado dando lugar a una especialización única, la Neocorteza (Kaas, 2011; Krubitzer, 1995). Esta estructura destaca por presentar una organización y circuitos con una arquitectura muy compleja, siendo clave el papel de cada una de las células que componen estas regiones cerebrales y sus funciones en la percepción de estímulos y la ejecución de respuestas activas (Alivisatos et al., 2012). Si bien se ha avanzado en la comprensión de cómo las conexiones intracorticales procesan las representaciones sensoriales, las ejecuciones comportamentales y cuál es el papel de los diferentes tipos neuronales en este procesamiento de la información (Ko et al., 2011; Hubel and Wiesel, 1962; Haider et al., 2010; Cossell et al., 2015), aún queda por dilucidar el impacto de los astrocitos, un tipo de célula glial, en la modulación de la actividad de los circuitos corticales y sus consecuencias para el comportamiento animal.

Así surge la necesidad de abordar empíricamente las siguientes preguntas: ¿la activación de los diferentes circuitos en el cerebro durante la realización de tareas involucra la actividad de los astrocitos? Si es así ¿de qué forma participan los astrocitos en este procesamiento de la información?¿por medio de qué mecanismos?

Responder a estas preguntas supone un desafío a nivel tecnológico, y no ha sido hasta comienzos de los años 90 con el desarrollo de las técnicas de imagen de calcio (Ca^{2+}) (Nagai et al., 2001; Stosiek et al., 2003; Miyawaki et al., 1997), y posteriormente con la expansión de las técnicas de biología molecular y edición genética (Geschwind and Konopka, 2009;

Sandberg et al., 2000) cuando comienzan a aparecer evidencias de la variabilidad de funciones que los astrocitos cumplen en el SN (Kastanenka et al., 2019; Dallérac et al., 2018; Mederos et al., 2018). En el panorama científico actual, son diversas las razones que subyacen la *sobrerrepresentación* de las neuronas frente a los astrocitos en cuanto a su papel en el procesamiento de información, destacando como principales factores la combinación de causas históricas (Bullock et al., 2005), junto con una de sus más destacadas características: la generación del potencial de acción (Armstrong and Hille, 1998). La excitabilidad eléctrica neuronal permite la transmisión de la información, dando lugar a un eficiente procesamiento y almacenamiento de la misma (Katz, 1969; Südhof, 2013; Johnson, 2000). Sin embargo, las neuronas no suponen más de la mitad del total de las células del cerebro de los mamíferos (Herculano-Houzel, 2014; Azevedo et al., 2009). Lo que hace imprescindible incluir en esta presentación de los circuitos cerebrales a las células de la glía [1] (Jäkel and Dimou, 2017; Allen and Lyons, 2018).

La Neuroglía fue descrita por primera vez en 1846 por el patólogo Virchow (Virchow, 1858), quien la definió como un 'aglutinante' o 'pegamento' nervioso y propuso el nombre de glía. Las teorías de relleno y de soporte trófico [2] estuvieron en vigor durante casi un siglo. Sin embargo, en 'Histologie du systeme nerveux de lhomme et des vertebre', Ramón y Cajal ya nombraba a las células de la glía, otorgándoles mayor complejidad y relevancia en la función cerebral (Ramón y Cajal, 1909). Las células de glía engloban varios tipos celulares que se pueden diferenciar en dos grupos: microglía y macroglía. La microglía se origina durante el desarrollo a partir de precursores mesenquimales y actúan como macrófagos con capacidad fagocítica que se encargan principalmente de la reacción inmunológica dentro del Sistema Nervioso Central (SNC) (Tay et al., 2017). La macroglía comprende un grupo heterogéneo que incluye: astrocitos, ependimocitos, oligodendrocitos y células de Schwann (Jäkel and Dimou, 2017), (Allen and Lyons, 2018), a cargo de diversas funciones en el SN entre las que cabe destacar el soporte metabólico, la generación de la vaina de mielina que rodea los axones, la metabolización de residuos y la participación en el crecimiento de neuritas, entre otros; para una visión simplificada de estas características ver Figura 1.1.

[1] Neuroglía, en el presente texto se utilizarán estas terminologías refiriéndose al grupo mencionado, que forman una categoría heterogénea en la que se engloban tipos celulares muy diversos

[2] Se conoce con este nombre a las funciones que se habían establecido para la neuroglia: La función de relleno de la glía, defendida por Weigert (1895), así como su papel de soporte trófico para las neuronas, postulado por Golgi (1871) (Hubbard and Binder)

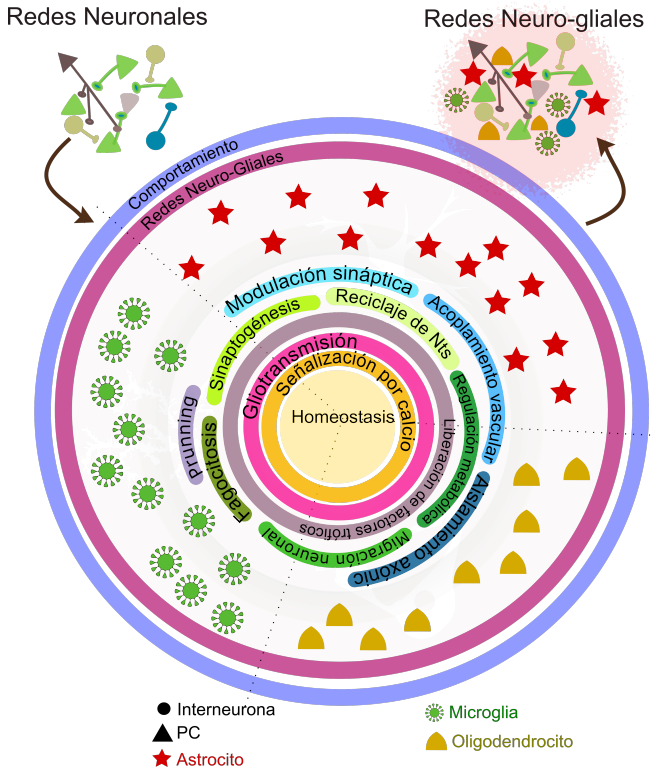


Figura 1.1 / ***Redes Neuro-gliales: unidades de señalización en el cerebro.*** Las células gliales cumplen una función estructural, metabólica y moduladora de la actividad neuronal. Desde el punto de vista metabólico los astrocitos nutren a la neurona, sintetizan y recogen Nts y participan en la reparación y modulación de la actividad neuronal y sináptica. Los oligodendrocitos, generan la vaina de mielina, contribuyen a la señalización y crecimiento de neuronas y ayudan a la nutrición y mantenimiento de las mismas. Por su parte, la microglía juega un importante papel en la respuesta inmune del SNC.

No obstante, no fue hasta entrada la década de los 90 cuando se retoma el estudio de la astroglía, comenzando, así, a poner de manifiesto la importante función de estas células en la formación de sinapsis, el reciclaje de neurotransmisores (Nts), el control del flujo sanguíneo cerebral y la homeostasis cerebral, entre otras (Walz and Wuttke, 1989; Hatten and Mason, 1990; Vernadakis, 1996; Ullian et al., 2001; Mederos et al., 2018); mostrando su relevancia en funciones cerebrales complejas. Si bien, la generalidad de estos fundamentos depende de la relevancia que toma el área de estudio (hipocampo, estriado, cerebelo, entre otras) (Chai et al., 2017; Martin et al., 2015; Martin-Fernandez et al., 2017; Perea and Araque, 2007; Paukert et al., 2014; Brancaccio et al., 2017), y de las diferencias entre las rutas de señalización que utilizan los astrocitos. Un conocimiento más detallado del papel de estas células en las funciones cognitivas se torna fundamental para consolidar la existencia de una función activa [3] de los astrocitos en el procesamiento de la información por parte de los circuitos cerebrales y los mecanismos subyacentes.

[3] Se les ha atribuido tradicionalmente una función pasiva respecto a las neuronas. Sin embargo, en los últimos años se ha descrito que tienen un papel activo en el procesamiento de la información nerviosa (Araque et al., 2014; Oliveira et al., 2015).

En los últimos años, se ha demostrado la función relevante de los astrocitos en materias tan importantes como (i) la modulación de la transmisión sináptica (Eroglu and Barres, 2010; Perea et al., 2014; Bazargani and Attwell, 2016); (ii) la participación en el sistema glio-linfático (Plog and Nedergaard, 2018) (iii); la maduración de las sinapsis (Chung et al., 2015); (iV) la regulación metabólica e implicación en los mecanismos de homeostasis rédox (Bouzier-Sore and Pellerin, 2013; Attwell et al., 2010; Ferris et al., 2017).

El manuscrito de la presente tesis doctoral contiene un primer capítulo de Introducción, que pretende dar una visión general de conceptos fundamentales para entender el contexto del tema de estudio objeto de este trabajo, focalizando la atención en los astrocitos, la búsqueda de herramientas optogenéticas para el control de la actividad celular y el comportamiento, la señalización astrocito-interneurona, la plasticidad sináptica, memoria y cognición.

El Capítulo de Resultados constituye una aportación original al conocimiento de la señalización astrocito-neurona, y en particular a la participación de los astrocitos en la regulación de la transmisión sináptica y los procesos cognitivos y comportamentales que emergen de esta regulación. La primera parte (Sección 4.1), detalla en profundidad las propiedades de melanopsin como herramienta optogenética dirigida a manipular de forma selectiva y con precisión temporal la actividad de los astrocitos, así como las consecuencias de esta activación optogenética para las redes neuronales locales y el comportamiento animal; mostrándose como una herramienta útil para el estudio de la señalización astrocito-neurona (Mederos et al., 2019). La segunda parte (Sección 4.2) aborda las propiedades de la comunicación interneurona-astrocito. Contribuciones previas del laboratorio de Redes-Neurogliales han mostrado que los astrocitos de hipocampo decodifican las señales de las interneuronas, transformando las señales GABAérgicas, inhibitorias, en señales excitadoras (Perea et al., 2016). En esta tesis se han explorado las propiedades de la comunicación entre astrocitos e interneuronas parvoalbumina+ (PV+), el tipo de interneurona más abundante en los circuitos corticales, empleando un abordaje multidisciplinar en la Corteza Prefrontal medial (CPFm) para dilucidar los mecanismos moleculares y celulares que subyacen a la memoria de trabajo y la toma de decisiones.

La memoria finaliza con un breve capítulo de discusión general y conclusiones, que pone de manifiesto el impacto que los resultados de este estudio tendrán en el campo de la neurociencias en general, y de la señalización neurona-astrocito en particular, junto con una visión

de los subsiguientes pasos para el abordaje de esta temática.

1.1. Sinapsis Tripartita

Los astrocitos suponen un 40 % del total de las células del cerebro (Barres, 2008; Herculano-Houzel, 2014). Sin embargo, la visión clásica que excluía a los astrocitos de una participación activa en la fisiología del sistema nervioso (SN) se basaba en que carecen de la propiedad fundamental que poseen las neuronas, la excitabilidad eléctrica (Rutecki, 1992).

Las neuronas generan grandes variaciones del potencial transmembrana en la proximidad del cuerpo celular, que se conoce como potencial de acción (PA). El PA es el resultado de la integración de distintas señales locales recogidas de forma gradual y/o temporal. El PA se propaga por el axón despolarizando el terminal pre-sináptico provocando la liberación de Nts a la hendidura sináptica, y la consiguiente activación de receptores en la membrana de la próxima neurona. De manera que se produce la comunicación entre neuronas en la sinapsis [4], esto es la transmisión sináptica química [5].

Los astrocitos, pese a presentar en su membrana una amplia batería de canales iónicos (Sontheimer et al., 1994), son células no excitables eléctricamente. Dado el elevado número de canales de potasio (Kir4.1 y canales de fuga (del inglés, *leak channels*) (Orkand et al., 1966; Goldstein et al., 2001) y el bajo nivel de expresión y/o concentración relativa de los canales voltaje-dependientes cruciales para la generación de respuestas activas (ausencia de canales de sodio en una zona similar al elemento inicial del axón de las neuronas), la generación de cambios significativos en su potencial de membrana es limitada (Amzica and Neckelmann, 1999; Perea and Araque, 2005b). Los astrocitos presentan una arquitectura celular ramificada (Kosaka and Hama, 1986; Nixdorf-Bergweiler et al., 1994; Bushong et al., 2002), que reciben el nombre de procesos, siendo las terminaciones de éstos los que están en contacto con las sinapsis (Ventura and Harris, 1999). Su íntima asociación con las sinapsis contribuyó al desarrollo de un nuevo término en la fisiología sináptica: la Sinapsis Tripartita (Araque et al., 1999) que sustituía la idea neurocéntrica de la transmisión de la información en el SN. Se demostró que los astrocitos sí pueden ser considerados células

[4] En la versión clásica del término (proveniente del griego -unión-) se dice del espacio en el que se produce la aproximación (funcional) intercelular especializada entre neuronas.

[5] Existe una transmisión sináptica eléctrica en la que no requiere liberación de Nts, ya que la transferencia de información se realiza mediante el paso de iones de una neurona a la siguiente a través de uniones de membrana tipo *gap*

excitables, basándose en variaciones de Ca^{2+} intracelular y que podían activamente señalizar a los elementos neuronales próximos (Cornell-Bell et al., 1990; Charles et al., 1991).

1.1.1. Astrocitos y su relevancia en la función cerebral

Los astrocitos cumplen funciones destacadas en la dinámica cerebral contribuyendo de forma decisiva en la homeostasis iónica y metabólica de las neuronas (Walz and Wuttke, 1989; Hatten and Mason, 1990; Vernadakis, 1996). Además, resultados experimentales obtenidos durante las últimas dos décadas han demostrado que los astrocitos están directamente implicados en la regulación sináptica controlando la sinaptogénesis, la maduración sináptica, el mantenimiento y la reorganización de las conexiones sinápticas (Chung et al., 2015; Hines, 2017), sensando la actividad de la sinapsis respondiendo a diferentes Nts y liberando sustancias neuroactivas denominadas gliotransmisores (Gts). Entre estos Gts se incluyen: glutamato, D-serina, ATP, Adenosina (Ado), GABA, TNF-alfa que contribuyen a la regulación de la transmisión sináptica (Araque et al., 2001; Nedergaard et al., 2003; Volterra and Meldolesi, 2005; Haydon and Carmignoto, 2006; Mederos et al., 2019).

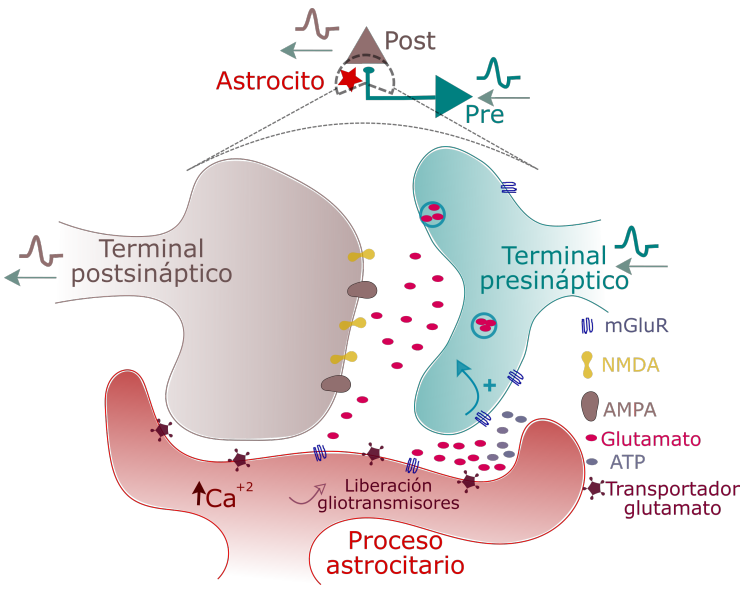


Figura 1.2 / *Sinapsis Tripartita.* Esquema simplificado del concepto que involucra a los astrocitos en la modulación de la transmisión sináptica. La señal de Ca^{2+} de astrocitos se desencadena por la activación de receptores en respuesta a la liberación de Nts por los terminales neuronales, que estimula la liberación de gliotransmisores por parte de los astrocitos. Estos gliotransmisores actúan sobre tipos específicos de receptores en las membranas neuronales, activando receptores para glutamato AMPA, NMDAR y mGluR y adenosina (A1 y A2A) localizados en la neurona pre- o postsináptica, modificando sus respuestas.

De este modo, el intercambio bidireccional de señales entre los astrocitos y los elementos sinápticos neuronales, denominado Sinapsis Tripartita, da lugar a la modulación de la actividad sináptica con distintas escalas temporales, ya sea a corto como a largo plazo (Fields and Stevens-Graham, 2002; Fields et al., 2014; Araque et al., 2014)(Figura 1.2). Desde su

conceptualización, la Sinapsis Tripartita se ha consolidado como un elemento clave en la fisiopatología del SN (Perea et al., 2014), demostrando que los astrocitos, a través de diversos mecanismos dependientes de variaciones de Ca^{2+} intracelular, así como cambios en la actividad de sus canales y transportadores de membrana, participan activamente en la señalización entre neuronas (Araque et al., 2014; Mederos et al., 2018).

1.1.2. La excitabilidad astrocitaria: la señalización por el ion calcio

Las variaciones en los niveles de Ca^{2+} a nivel citoplasmático tienen importantes funciones fisiológicas estando relacionados con vías de señalización que intervienen en el ciclo celular, metabolismo y el tráfico de vesículas (Clapham, 2007; Kawamoto et al., 2012). En relación con el tráfico vesicular cabe destacar que las variaciones de Ca^{2+} intracelular son esenciales para la activación del complejo SNARE (del inglés *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*), una familia de proteínas que median la fusión de membranas en la célula, y en particular la exocitosis de las vesículas sinápticas en los terminales nerviosos (Martens and McMahon, 2008; Jahn et al., 2003). Los astrocitos son células excitables que sensan la información del medio mediante variaciones en sus niveles de Ca^{2+} intracelular, entre otros mecanismos. De esta manera, en los astrocitos los aumentos de Ca^{2+} estimulan la liberación de sustancias activas denominadas Gts al espacio extracelular donde ejercerán su acción en las dianas de las células vecinas (Araque et al., 2000; Zorec et al., 2012), tanto a través de mecanismos dependientes (Araque et al., 2000; Bezzi et al., 2004; Marín, 2012; Schwarz et al., 2017; Bowser and Khakh, 2007; Parpura and Zorec, 2010; Schwarz et al., 2017) e independientes del tráfico vesicular (Hamilton and Attwell, 2010; Evanko et al., 2004; Duan et al., 2003; Lee et al., 2010; Woo et al., 2012); que han sido objeto de un gran número de excelentes revisiones en el campo (Verkhratsky et al., 2016; Bazargani and Attwell, 2016; Allen and Eroglu, 2017; Parpura and Zorec, 2010).

El retículo endoplasmático (RE) es uno de los principales reservorios de Ca^{2+} en astrocitos. El RE presenta en su membrana receptores para inositol 1,4,5-trisfosfato (IP3) de tipo 2 (IP3R2) y de rianodina (RyR), que tras ser activados por IP3 y por Ca^{2+}, respectivamente, inducen la salida de este ion desde el RE al citoplasma (Hua et al., 2004; Parpura and Zorec, 2010; Zorec et al., 2012)(ver Figura 1.3).

Un gran número de los receptores presentes en la membrana de los astrocitos para los que se ha descrito una participación en fenómenos de modulación sináptica son de naturale-

za metabotrópica (Nash et al., 2001; Bradley and Challiss, 2012; Zur Nieden and Deitmer, 2006), implicando que se activan cascadas de señalización intracelular ligadas a la producción de segundos mensajeros, entre los que se incluye la vía de IP3 como una de las principales vías de señalización en astrocitos (Figura 1.3) (Holtzclaw et al., 2002; Fiacco and McCarthy, 2004; Takata et al., 2011; Navarrete et al., 2012). Sin embargo, las fuentes de Ca^{2+} intracelular en astrocitos son diversas e incluyen diferentes mecanismos, entre ellos cabe destacar la activación de canales TRPA1 (del inglés *Transient Receptor Potential*). Estos canales se encuentran en la membrana citoplasmática y son responsables de la entrada de Ca^{2+} desde el espacio extracelular (Shigetomi et al., 2012, 2013). Además, se ha demostrado en los microdominios la existencia de actividad independiente de la activación de IP3, que proviene del Ca^{2+} liberado por la mitocondria tras breves aperturas de su poro de transición (Agarwal et al., 2017). Mediante la localización de la mitocondria en los microdominios los astrocitos aseguran un correcto soporte metabólico local, así como una señalización de Ca^{2+} restringida. Asimismo, la existencia del transportador Na^{+}-Ca^{2+} en la membrana celular puede actuar como fuente de Ca^{2+} intracelular (Halnes et al., 2013; Doengi et al., 2009). La descripción de cada una de estas vías y el estudio detallado de la señalización por Ca^{2+} en astrocitos sigue siendo un tema controvertido, y por tanto, objeto de diversos trabajos de revisión (Araque et al., 2014; Parpura et al., 2011; Rusakov, 2015; Fiacco and McCarthy, 2018; Savtchouk and Volterra, 2018).

Independientemente de los mecanismos que los subyacen, el aumento de Ca^{2+} en los astrocitos tiene lugar en los microdominios donde la señal de Ca^{2+} puede ser inducida por los Nts liberados por los terminales sinápticos (Grosche et al., 1999; Perea and Araque, 2005b; Di Castro et al., 2011; Panatier et al., 2011). El uso de microscopía multifotón con elevada velocidad de escaneo junto con el desarrollo de herramientas genéticas específicas para la visualización de las señales de Ca^{2+} en astrocitos, permiten la monitorización de los gradientes de Ca^{2+} con una mayor sensibilidad y han puesto de manifiesto la delicada dinámica de este ion en el interior de un astrocito completo en tiempo real y en las 3 dimensiones (3D) (Bindocci et al., 2017; Savtchouk et al., 2018); lo que supone un nuevo campo de estudio en la señalización neurona astrocito.

Una vez generada en los microdominios, la señal de Ca^{2+} puede expandirse bajo diferentes condiciones a regiones adyacentes dentro del mismo proceso, a procesos diferentes, a la célula entera o incluso a células vecinas, conocidas como ondas de Ca^{2+} (Bazargani and Att-

well, 2016; Volterra et al., 2014), siendo este proceso fuertemente regulado por la actividad sináptica (Di Castro et al., 2011; Perea and Araque, 2005a).

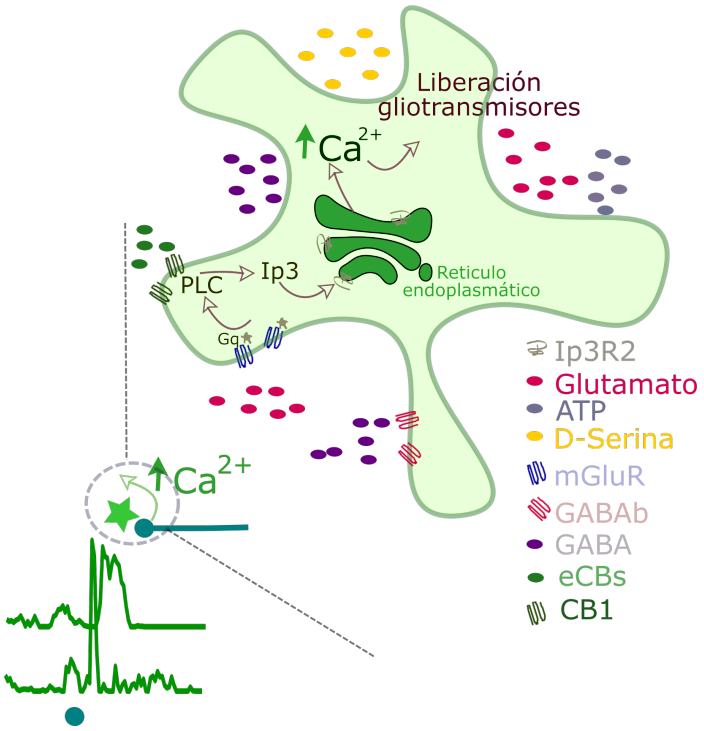


Figura 1.3 / ***Excitabilidad astrocitaria: variaciones de calcio intracelular.*** Elevaciones de Ca^{2+} intracelular desde el RE, inducidas por la activación de receptores acoplados a proteína G. Los Nts glutamato, GABA y ATP (o Ado) provocan a su vez la liberación de los Gts como ATP, glutamato, D-serina y GABA. El Ca^{2+} que se origina en los microdominios puede viajar a través de los procesos del astrocitos hacia el soma y otros procesos, donde se podrán liberar los Gts.

Las ondas de Ca^{2+} son una forma de señalización astrocito-astrocito, descritas originalmente en preparaciones en cultivo, donde esta comunicación se produce a través de uniones de tipo gap (Charles et al., 1992; Suadicani et al., 2004), formadas por hemicanales hexaméricos que ponen en contacto los citoplasmas de células contiguas (Orthmann-Murphy et al., 2008; Bennett et al., 2003). Se ha propuesto que por medio de estas uniones de tipo gap el propio Ca^{2+} citosólico o, alternativamente, el IP3 pasarían de una célula a otra generando esta onda de Ca^{2+}. Una segunda hipótesis plantea un mecanismo paracrino basado en la secreción dependiente de Ca^{2+} de gliotransmisores liberados al medio extracelular, entre los que destaca el ATP (Arcuino et al., 2002). Tanto la hipótesis de las uniones tipo gap (Rash et al., 2001; Pannasch et al., 2011; Wallraff et al., 2006; Houades et al., 2008), como la liberación activa de ATP (Figueiredo et al., 2014; Shen et al., 2017) han sido demostradas en secciones de tejido cerebral, lo cual indica la alta probabilidad de que en la naturaleza, *de facto*, se encuentren coexistiendo ambos mecanismos (Dallérac et al., 2018; Dallérac and Rouach, 2016; Scemes and Giaume, 2006).

La llegada de indicadores genéticos de Ca^{2+} (del inglés *Genetically Encoded Calcium Indicators*, GECIs [6]) ha revolucionado el estudio de las señales intraceluares de Ca^{2+} tanto en neuronas como en astrocitos (Tian et al., 2012; Pérez Koldenkova and Nagai, 2013), superando las limitaciones de las sondas tradicionales de Ca^{2+}[7] (Fluo-4, Fura-2, OGB1) (Atkin et al., 2009; Shigetomi et al., 2013), y consolidándose como una herramienta crucial para estudiar la dinámica de Ca^{2+} de los astrocitos *in vitro* e *in vivo* dada su expresión en procesos finos (Atkin et al., 2009; Shigetomi et al., 2013; Srinivasan et al., 2015). Sin embargo, el paso limitante para el estudio de las variaciones intracelulares de Ca^{2+} en astrocitos es la ausencia de un criterio funcional/morfológico definido y consensuado por la comunidad científica que permita determinar con precisión la actividad de Ca^{2+} dentro de los microdominios y su distribución espacial y temporal en la célula. Dada la relevancia de este ion para la señalización entre astrocitos y su comunicación con los elementos sinápticos, es necesario el desarrollo de nuevos algoritmos de análisis que permitan esclarecer el lenguaje de los astrocitos mediante la decodificación de las señales de Ca^{2+} (Bindocci et al., 2017; Agarwal et al., 2017; Poskanzer and Molofsky, 2018; Srinivasan et al., 2015; Stobart et al., 2018).

1.1.3. Comunicación bidireccional astrocito-neurona

La liberación de moléculas capaces de activar los receptores neuronales por parte de los astrocitos, Gts, modulando la transmisión sináptica supuso la demostración de su implicación en los fenómenos de plasticidad sináptica en el cerebro (Perea and Araque, 2007)[8].

La gliotransmisión ha sido demostrada en diferentes regiones cerebrales (Haydon and Carmignoto, 2006; D'Ascenzo et al., 2007; Perea and Araque, 2007; Di Castro et al., 2011; Jiménez-González et al., 2011; Panatier et al., 2011; Takata et al., 2011; Min and Nevian, 2012; Navarrete et al., 2012; Perea et al., 2014; Martin et al., 2015; Martin-Fernandez et al., 2017; Yang et al., 2015). Como paradigma de este fenómeno se puede nombrar el hipocampo, donde se ha detallado que los astrocitos responden con elevaciones de Ca^{2+} intracelular a glutamato, GABA y acetilcolina (ACh) (Kang et al., 1998; Perea and Araque, 2005a); libe-

[6] Consistente en un domino de unión a Ca^{2+} (un péptido que permite su cambio conformacional (péptido M13)) y una o dos proteínas fluorescentes.

[7] A pesar de su aplicación en rodajas de animales jóvenes en los que la carga celular tiene lugar con facilidad, las sondas tradicionales presentan limitaciones en animales adultos e *in vivo*, y su especificidad celular es limitada.

[8] La plasticidad sináptica se define como la propiedad del SNC que permite modificar la eficiencia sináptica mediante un cambio de la actividad neuronal entre determinadas conexiones (Bliss, 1979), se detalla este concepto de plasticidad en la Sección 1.4.2.

rando a su vez ATP, glutamato o D-serina, entre otros (Perea and Araque, 2007; Serrano et al., 2006; Navarrete and Araque, 2008; Henneberger et al., 2010; Mederos et al., 2019) (Figura 1.3), que impactan sobre las neuronas adyacentes.

Esta comunicación astrocito-neurona no se encuentra necesariamente restringida a las sinapsis activas y al astrocito que las rodea. Considerando las propiedades morfológicas y funcionales de los astrocitos, la extensión espacial de la señal de Ca^{2+} dentro de la propia célula (Grosche et al., 1999; Perea and Araque, 2005b; Di Castro et al., 2011; Panatier et al., 2011), la comunicación intercelular entre astrocitos (Giaume and McCarthy, 1996; Rouach et al., 2008; Giaume et al., 2010; Gajardo-Gómez et al., 2017), y su compleja morfología -muy ramificada- que permite que un solo astrocito pueda estar en contacto con unas cien mil sinapsis (Ventura and Harris, 1999; Bushong et al., 2002; Halassa et al., 2007; Khakh and Sofroniew, 2015), suponen que la activación de estas células por la actividad de ciertas sinapsis se traduzca, en ocasiones, en la modulación de sinapsis distales y neuronas que no participaron de ese primer estímulo (Navarrete and Araque, 2010). Este fenómeno se ha denominado modulación lateral de la transmisión sináptica por astrocitos (Covelo and Araque, 2016), y se refiere a la capacidad de los astrocitos para integrar y transferir señales desde una sinapsis a otra más alejada incluso cuando no existe una comunicación neuronal directa entre ellas, lo que aumenta la capacidad de regulación por parte de los astrocitos al estar implicadas en una modulación espacial de la señal nerviosa (Covelo and Araque, 2016). Este fenómeno podría suponer importantes implicaciones funcionales, tanto a corto como a largo plazo.

La actividad neuronal también puede reclutar a los astrocitos a través de la señalización por eCBs (Navarrete and Araque, 2008; Martin et al., 2015). Los eCBs desempeñan un papel crítico en la plasticidad a corto y largo plazo en las sinapsis excitatorias e inhibitorias, principalmente a través de la señalización retrógrada (Kano, 2014; Kano et al., 2009). Así, se ha demostrado que los astrocitos participan en la señalización por eCBs (Navarrete and Araque, 2008, 2010; Min and Nevian, 2012; Gómez-Gonzalo et al., 2015; Martin et al., 2015; Martin-Fernandez et al., 2017; Andrade-Talavera et al., 2016; Robin et al., 2018), contribuyendo a lograr una actividad coordinada entre grupos neuronales.

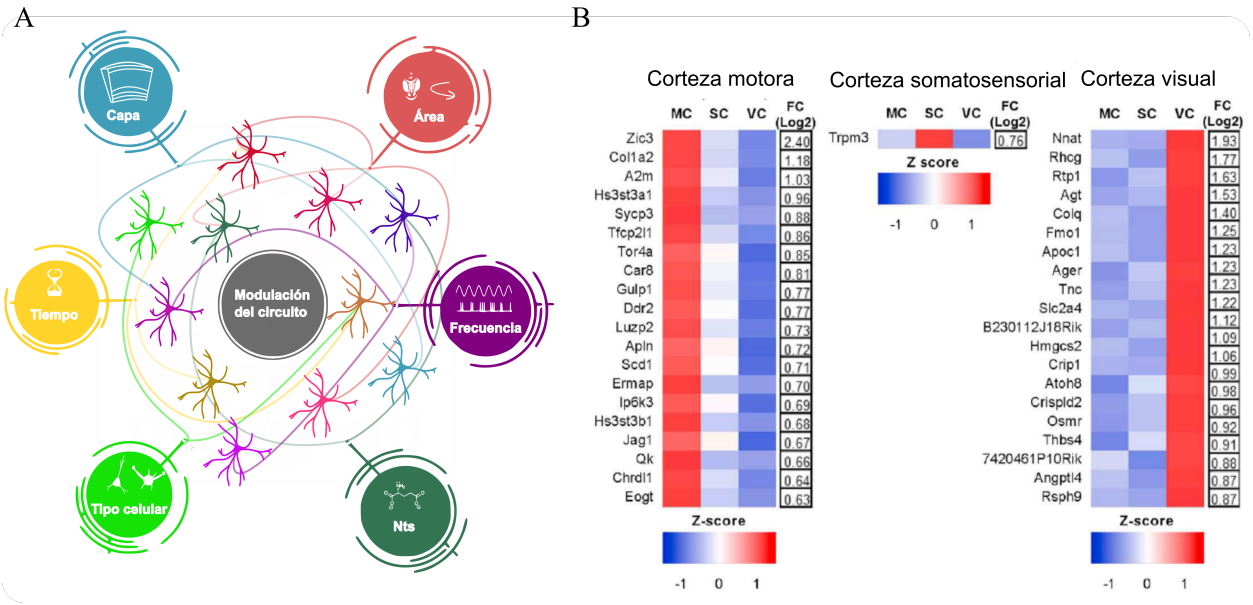


Figura 1.4 / ***Heterogeneidad de las redes Neuro-Gliales.*** **A.** Los astrocitos son capaces de responder a diferentes NT, tipos celulares en diferentes áreas del cerebro y bajo diversos patrones de estimulación. Modulan la actividad mediante la liberación diferentes principios activos, contribuyendo a dar forma a la actividad neuronal y los circuitos cerebrales. Sin embargo, se desconoce si los mismos o diferentes subtipos de astrocitos median estos efectos diferenciales. El esquema ilustra la evidencia reciente de la diversidad molecular y funcional de los astrocitos (adaptado de (Mederos et al., 2018)). En este contexto, los astrocitos individuales pueden verse afectados por más de una característica fisiológica (representada como círculos de colores que conectan con los astrocitos), o los subconjuntos de astrocitos pueden mostrar preferencia por características fisiológicas particulares, lo que sugiere la existencia de diferentes poblaciones de astrocitos que exhiben propiedades específicas (código de color de los astrocitos). **B.** La expresión de genes astrocitarios difiere entre distintas áreas. Datos de RNA-seq muestran enriquecimiento de algunos genes de forma específica en corteza motora (MC), corteza somatosensorial (SC) y corteza visual (VC). Panel adaptado de (Boisvert et al., 2018).

Otro factor importante liberado por los astrocitos es S100β, una proteína de unión de Ca^{2+} involucrada en la actividad rítmica tanto en la parte dorsal del núcleo sensorial principal del trigémino (Morquette et al., 2015), como en la corteza prefrontal, donde mejora la sincronización entre las oscilaciones theta-gamma y mejora la flexibilidad cognitiva (Brockett et al., 2018). Es importante tener en cuenta que los astrocitos también pueden responder a otros neuromoduladores, como la norepinefrina (Bekar et al., 2008; Paukert et al., 2014), acetilcolina (Takata et al., 2011; Chen et al., 2012; Navarrete et al., 2012; Papouin et al., 2017), dopamina (Jennings et al., 2017), y moléculas derivadas del sistema neuroendocrino (Fuente-Martin et al., 2013; Kim et al., 2014). Los astrocitos en el hipotálamo responden a las hormonas leptina, ghrelina e insulina, y regulan la actividad neuronal liberando ATP (Kim et al., 2014; García-Cáceres et al., 2016), controlando así el consumo de alimentos. Ade-

más de liberar ATP en el hipotálamo, los astrocitos presentes en el núcleo supraquiasmático dorsal (SCN) controlan el ciclo circadiano mediante la liberación de glutamato (Brancaccio et al., 2017).

Los astrocitos representan un grupo celular altamente heterogéneo (Mederos et al., 2018; Khakh and Sofroniew, 2015), que muestra especializaciones muy precisas dependientes de circuito, esto es, un amplio número de receptores, transportadores y proteínas concretas, así como las diversas funciones que exhiben en función del área donde se localizan (Zhang and Barres, 2010; Zhang et al., 2016; Freeman and Rowitch, 2013; Khakh and Sofroniew, 2015; Mederos et al., 2018). Por lo tanto, descifrar los mecanismos moleculares que impulsan la diversidad funcional de los astrocitos perisinápticos de acuerdo con el área del cerebro donde se localizan, la etapa de desarrollo y el régimen de actividad (Figura 1.4), no solo mejorará nuestra comprensión del desarrollo cerebral y la plasticidad sináptica, sino también proporcionará nuevas herramientas para la identificación y tratamiento de las disfunciones sinápticas subyacentes a los trastornos neurológicos o psiquiátricos (Dallérac et al., 2018).

1.2. Estimulación selectiva de astrocitos

Como se ha mencionado, los astrocitos presentan en su membrana una amplia batería de receptores, entre ellos, los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) [9]. Hay cuatro familias principales de GPCRs que se distinguen por su composición, la capacidad de activar las cascadas de señalización intracelulares y las consecuencias funcionales asociadas con su activación (Strader et al., 1995). Los astrocitos expresan cada una de las principales clases de GPCRs (Porter and McCarthy, 1997) demostrando que estas células están acopladas dinámicamente a la actividad de su entorno celular y químico. Por tanto, resulta clave la utilización de estrategias experimentales que permitan diseccionar la actividad fisiológica de los astrocitos y discriminar cuál es su grado de contribución en las respuestas de los circuitos neuronales de los cuales forman parte.

[9] Son los principales representantes de la transducción de señales en astrocitos (Bradley and Challiss, 2012; Durkee et al., 2019).

1.2.1. Aproximaciones experimentales para la activación de astrocitos

Se han empleado diversos métodos con el fin de modular la actividad astrocitaria en los circuitos, desde la aplicación local de agonistas selectivos (Martin et al., 2015) y jaulas de Ca^{2+} [10] (Perea and Araque, 2007; Parpura and Zorec, 2010; Sasaki et al., 2012), a nuevas herramientas basadas en receptores quimiogenéticos y optogenéticos (Li et al., 2013; Bang et al., 2016), que permiten obtener la suficiente precisión celular y/o temporal, superando las limitaciones de los métodos tradicionales. Entre las principales limitaciones de las técnicas clásicas destacan que la aplicación de agonistas sobre astrocitos puede derivar en una respuesta inespecífica dada la expresión de los mismos receptores en otros tipos celulares, y que la utilización de quelantes de Ca^{2+} limita la actividad basal de las células, pudiendo enmascarar la respuesta objeto de estudio.

Las herramientas quimiogenéticas denominadas DREADDs (del inglés *Designer Receptor Exclusively Activated by Designer Drugs*) (Wess et al., 2013), se basan en la manipulación selectiva de receptores muscarínicos asociados a proteínas G que únicamente pueden ser activados mediante un ligando exógeno (ver (Urban and Roth, 2015; Roth, 2016; Whissell et al., 2016)), y han sido utilizados en estudios de interacción glia-neurona. Se implementaron con el desarrollo de ratones que los expresaban bajo el promotor específico de astrocitos la proteína ácida fibrilar glial (del inglés *Glial fibrillary acidic protein*, GFAP), GFAP-Gq-DREADD para activar específicamente vías Gq-GPCR *in vivo* (Agulhon et al., 2013). El desarrollo de este modelo permitió estudiar las consecuencias comportamentales y fisiológicas de activar específicamente la señalización Gq-GPCR en astrocitos. Una ventaja significativa de los DREADDs es que su ligando, la clozapina N-óxido (CNO), cruza la barrera hematoencefálica (Bender et al., 1994), permitiendo por lo tanto la manipulación no invasiva de la actividad del receptor a través de inyecciones periféricas (por ejemplo, intraperitoneal o inyecciones intravenosas). Los DREADDs más utilizados son los excitatorios Gq- o los inhibitorios Gi-, hM3Dq y hM4Di, respectivamente, derivados de los receptores muscarínicos humanos 3 y 4 (Roth, 2016). Esta aproximación quimiogenética ofrece la oportunidad de una activación o inhibición selectiva de las células de interés.

[10] La jaula de Ca^{2+} retiene el Ca^{2+} hasta que éste es liberado ante la estimulación con luz ultravioleta. El agente quelante de Ca^{2+} utilizado es el o-nitrofenil EGTA (NP-EGTA). La molécula NP-EGTA presenta una alta afinidad por Ca^{2+} que disminuye drásticamente (hasta 12.000 veces) después de la fotoestimulación con luz UV, permitiendo de este modo el incremento de Ca^{2+} en el interior celular.

La activación por DREADDs se ha aplicado de manera satisfactoria a astrocitos (Adamsky et al., 2018; Agulhon et al., 2013; Bonder and McCarthy, 2014; Bull et al., 2014; Chai et al., 2017; Martin-Fernandez et al., 2017). Así, se ha descrito la implicación de los astrocitos en la modulación de la ingesta en el hipotálamo (Yang et al., 2015), en la modulación de los estados de recompensa y motivación en el núcleo acumbens (Bull et al., 2014), han permitido evidenciar la rehabilitación de ratones expuestos a cocaína (Scofield et al., 2016), la participación de los astrocitos en la modulación del miedo condicionado al ser expresados específicamente en astrocitos de la amígdala (Martin-Fernandez et al., 2017), y han servido para mostrar la capacidad de los astrocitos para potenciar la memoria (Adamsky et al., 2018; Mederos et al., 2019). Resulta llamativo que ambas vías, Gq- y Gi, inducen en astrocitos una activación de las mismas vías de señalización de Ca^{2+} y una liberación de Gts (Durkee et al., 2019), revelando de este modo una mayor complejidad en las consecuencias de la señalización excitadora e inhibidora sobre las redes astrocitarias, a diferencia de lo que ocurre en neuronas donde los Gq tienen un efecto excitador y los Gi un efecto inhibidor (Roth, 2016; Smith et al., 2016; Durkee et al., 2019; Stachniak et al., 2014; Armbruster et al., 2007). Sin embargo, pese a que los DREAADs logran activar de forma específica vías de señalización de proteínas G en astrocitos, presentan limitaciones en cuanto a la duración de su acción, ya que su activación puede permanecer durante unas dos horas tras la aplicación del ligando (Guettier et al., 2009), no permitiendo el control temporal de su inactivación. En este contexto, el estudio de fenómenos transitorios relacionados con episodios concretos de la actividad neuronal queda lejos del alcance de esta herramienta, siendo el principal atractivo de otras aproximaciones genéticas para la manipulación de la actividad celular, como es el caso de la optogenética, con la que se consigue una precisión temporal 3 órdenes de magnitud más rápida que con los DREADDs (Keenan et al., 2017; Roth, 2016).

A finales de la década de 1970, Francis Crick ya apuntaba que el mayor reto al que se enfrentaba la neurociencia de aquel entonces era el de conseguir un control preciso de la actividad de un único tipo neuronal, mientras el resto se mantenían inalterados (Deisseroth, 2010), sugiriendo que la luz podría ser el interruptor de control ideal, pese a que nunca llegó a especificar como podría alcanzarse esta idea (esta historia se ha revisado en (Yizhar et al., 2011b; Deisseroth and Hegemann, 2017)). La llegada de la optogenética ha resuelto este desafío. La optogenética es una técnica desarrollada en la última década que combina factores genéticos y propiedades ópticas para conseguir una manipulación precisa de la acti-

vidad de distintos tipos celulares, que puede derivar en el control por luz del comportamiento animal (Yizhar et al., 2011b; Deisseroth, 2015). Esta tecnología emplea proteínas sensibles a luz, opsinas, que van a ser expresadas en la membrana de las células de interés. Una vez estimuladas con longitudes de onda propias de estas opsinas se producen una serie de cambios conformacionales y estructurales en la proteína (Oesterhelt and Stoeckenius, 1971, 1973; Matsuno-Yagi and Mukohata, 1977; Hegemann et al., 1985; Harz and Hegemann, 1991; Nagel et al., 2002; Deisseroth, 2015), que finalmente derivan en la apertura de canales iónicos o la activación de cascadas de señalización intracelulares (Zhang et al., 2011).

El desarrollo de esta técnica ha revolucionado el estudio de la Neurociencia, ayudando a decodificar la actividad de poblaciones neuronales concretas, así como su relación con determinados fenómenos de comportamiento asociados a la activación o inhibición de subtipos celulares (Carter and de Lecea, 2011; Tye and Deisseroth, 2012). Actualmente, la mayoría de las herramientas optogenéticas se basan en el uso de proteínas de rodopsina microbiana (opsinas de tipo I), y suponen que una sola proteína es capaz de detectar luz y generar un flujo de iones. Las opsinas de tipo I utilizan el isómero todo-trans del retinal, que como resultado de la absorción de fotones se isomeriza pasando a la configuración de 13-cis. De este modo la molécula de retinal se activa al estar asociada con la opsina y posteriormente revierte térmicamente a la configuración todo-trans. Debido a que esta reacción reversible se produce en tiempos del orden de milisegundos, permite el uso de rodopsinas microbianas como herramientas de control de la actividad neuronal con alta precisión temporal (Zhang et al., 2011). De esta familia de moléculas tres miembros han encontrado uso en estudios optogenéticos: las bacteriorrodopsinas, las halorodopsinas y las channelrodopsinas [11].

Channelrhodopsin (ChR) es un canal de membrana identificado en el alga verde Chlamydomonas reinhardtii (ChR1) (Nagel et al., 2002). En respuesta a la luz, ChR1 abre un canal de cationes en la membrana, lo que implica que el flujo de iones depende de la cinética del canal en lugar de la isomerización retiniana. Un segundo ChR, channelrhodopsin-2 (ChR2), fue caracterizado posteriormente (Nagel et al., 2003) y se usó para controlar la excitabilidad neural (Li et al., 2005). Al igual que ChR1, ChR2 también conduce cationes (monovalentes y divalentes), y ambos ChR tienen cinética de apertura y cierre rápido, aunque ChR2 se expresa en niveles más altos que ChR1 en sistemas de mamíferos (Zhang et al., 2011), lo que le ha dado un papel reconocido dentro de las herramientas optogenéticas disponibles para

[11] Todas ellas han sido revisadas en (Deisseroth, 2015) puesto que en este capítulo de introducción nos centraremos en describir únicamente Channelrhodopsin (ChR).

estudios en Neurociencia. El espectro de absorción de ChR2 muestra un máximo a 470 nm (Nagel et al., 2003; Ernst et al., 2014)(Figura 1.5).

Las técnicas de optogenética han sido utilizadas principalmente para manipular la actividad neuronal debido a que las neuronas, y no la glía, basan su actividad en cambios rápidos en su potencial de membrana. Sin embargo, ChR2 ha sido recientemente aplicada para la manipulación de la actividad de los astrocitos (Cho et al., 2016).

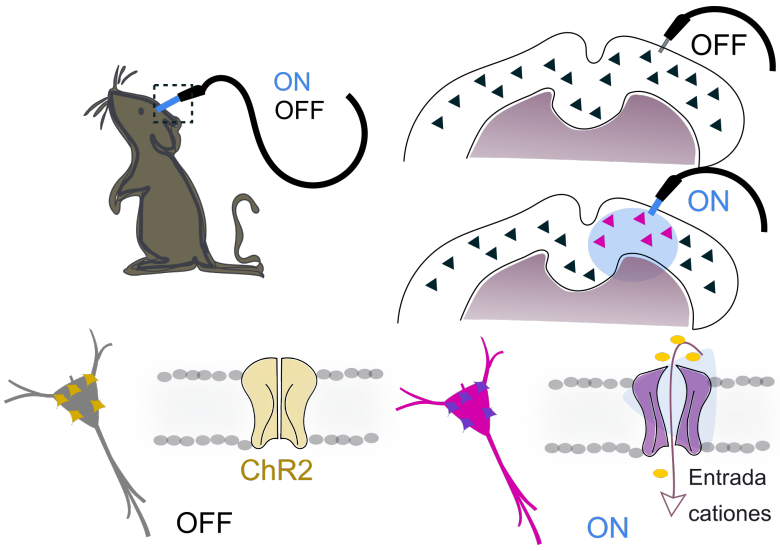


Figura 1.5 / ***Control de la actividad celular: optogenética.*** Se muestra ChR2 para el control neuronal a modo de ejemplo. La luz azul activa la opsina, como resultado el canal se abre y se produce el paso de cationes haciendo que se genere el PA.

1.2.2. Optogenética en astrocitos

La optogenética en astrocitos se empleó por primera vez en 2009 (Gradinaru et al., 2009), mostrando la eficiencia de ChR2 para modular los niveles de Ca^{2+} astrocitario. Poco después Gourine y colaboradores (Gourine et al., 2010), mostraron cómo la estimulación óptica de astrocitos que expresaban ChR2 suponía una disminución del pH que implicaba la liberación de ATP, capaz de activar quimioreceptores en neuronas que estaban implicadas en el control de la respiración. Asimismo, ChR2 estimula la liberación de glutamato por parte de los astrocitos de cerebelo, siendo este glutamato el responsable de la activación de receptores AMPA en las células de Purkinje, en las que induce una depresión a largo plazo de las sinapsis aferentes a estas células (Sasaki et al., 2012). El uso de ChR2 también ha demostrado la capacidad de los astrocitos para modular la integración de estímulos visuales regulando la selectividad de la respuesta de las neuronas de la corteza visual (Perea et al., 2014), incrementando tanto la transmisión sináptica excitadora como la inhibidora de las neuronas vecinas. Este efecto

regulador es dependiente de la activación de receptores metabotrópicos de tipo 1 (mGluR1) en los terminales sinápticos tras la manipulación optogenética de los astrocitos (Perea et al., 2014). Recientemente, mediante el uso de ChR2, se ha relacionado a los astrocitos del hipotálamo y de la corteza cingulada anterior en el control del sueño (Yamashita et al., 2014).

Sin embargo, existe cierta controversia en cuanto a los mecanismos que subyacen a la modulación inducida por ChR2 en astrocitos, debido a su naturaleza de canal iónico permite la entrada de H^+ junto con Na^+ y Ca^{2+}, lo que induce una acidificación del pH dentro de los astrocitos (Beppu et al., 2014). En esta línea, se ha utilizado archaerhodopsin (Arch), una bomba de protones que genera aumentos de Ca^{2+} y supone también la alcalinización de los astrocitos, demostrándose cómo estas células a través de la acción de glutamato participan de la modulación de la actividad neuronal a nivel poblacional (Poskanzer and Yuste, 2011, 2016).

Estos resultados demuestran la utilidad y eficiencia de la optogenética basada en el uso de ChR2 y Arch para el control de astrocitos, pero dejan abierto el debate de las limitaciones que supone su uso en astrocitos. Entre ellas, que el aumento de Ca^{2+} intracelular no reproduce las características fisiológicas que subyacen esta respuesta (Mederos et al., 2019; Octeau et al., 2019), fundamentalmente basada en la activación de las vias GPCRs. ChR2 conseguía aumentar los niveles de Ca^{2+} mediante su entrada desde el medio extracelular que activa reservorios intracelulares (Gourine et al., 2010). De forma que la señalización inducida por canales o bombas de iones sobre astrocitos es probable que no represente las repuestas fisiológicas de los astrocitos inducidas por la actividad sináptica (Octeau et al., 2019).

Por tanto, es necesario el desarrollo de nuevas herramientas ópticas basadas en la activación de GPCRs, que permitan recapitular las respuestas endógenas de los astrocitos para dilucidar de forma inequívoca sus funciones en los distintos circuitos cerebrales.

1.3. La inhibición y la actividad cortical

Los circuitos excitadores son inherentemente inestables debido a que en ausencia de mecanismos inhibitorios los circuitos no serían capaces de alcanzar un límite a la excitación recurrente (Csicsvari et al., 2003), reduciendo drásticamente la potencia computacional de los mismos (Isaacson and Scanziani, 2011). La asociación dinámica entre las células excitadoras e inhibidoras asegura una homeostasis en sus patrones de disparo, lo cual permite

cambios significativos de la excitabilidad a nivel local en momentos puntuales, permitiendo así la codificación y el envío de información por la red neuronal. En este contexto, una inhibición sincrónica y/o coordinada asegura una ruta adecuada para la salida de la excitación del circuito. Esto es, la inhibición, en base al grado de actividad de las neuronas inhibidoras en un determinado momento, proporciona un amplio rango de respuestas por parte de la misma red de neuronas excitadoras ante un mismo estímulo (Isaacson and Scanziani, 2011). De esta forma, la dinámica cerebral excitadora está equilibrada por la contribución de poblaciones especializadas inhibidoras (Isaacson and Scanziani, 2011).

La co-existencia de excitación e inhibición no está limitada a la actividad generada por estímulos sensoriales [12], si no que la señalización entre neuronas excitadoras e inhibidoras (Okun and Lampl, 2008) que se establece durante la actividad cerebral endógena deriva en la aparición de oscilaciones (Atallah and Scanziani, 2009; Haider et al., 2006). Esta sinergia entre excitación e inhibición ha dado lugar a un incremento de la especialización de los tipos celulares correspondientes, los cuales sustentan una mayor demanda computacional requerida en el avance evolutivo de los circuitos cerebrales. Las regiones de la corteza cerebral, además de una modesta diversificación de sus neuronas excitadoras, presentan un asombroso grado de especialización en la población de neuronas inhibidoras, capaces de procesar, combinar y responder a la actividad de las distintas células excitadoras (Halasy and Somogyi, 1993; Freund and Buzsáki, 1998).

Las interneuronas establecen una conectividad altamente específica con el resto del circuito (Tremblay et al., 2016), que les permite controlar la generación de PAs y la frecuencia de disparo de las células vecinas (células piramidales y otras interneuronas) y, por tanto, moldear la actividad del circuito (Roux and Buzsáki, 2015). De este modo, el SN establece distintos niveles de actividad donde las señales inhibidoras contribuyen de forma decisiva a la aparición de oscilaciones neuronales sincronizadas (Dichter and Ayala, 1987).

1.3.1. Interneuronas: clasificación y propiedades generales

La gran diversificación - heterogeneidad celular - de las células GABAérgicas es incluso más llamativa si se considera que representan una fracción mínima de la población neuronal total (20-30 %) (Bezaire and Soltesz, 2013). Las interneuronas se diferencian de las neuronas

[12] De aquí en adelante en este texto se utilizará el término *input*, del inglés, para referirse a entradas de información, así como *output* para referirse a salida de información de la neurona o del sistema.

excitadoras en múltiples aspectos, entre los que destacan su organización dendrítica, la conectividad axonal, los patrones de disparo y las propiedades biofísicas internas (Freund and Buzsáki, 1998; Somogyi et al., 1998; McBain and Fisahn, 2001; Somogyi and Klausberger, 2005; Buzsaki and Draguhn, 2004; Markram et al., 2004; Soltesz and Staley, 2006). La complejidad alcanzada por el cerebro de mamíferos ha sido posible al generarse un entramado muy exquisito mediante la diversificación de la inhibición en tipos celulares que han visto modificadas sus propiedades y funcionalidades para dar lugar a una mayor variedad de respuestas. La clasificación de esta diversidad de interneuronas es un tema de actualidad y de gran interés para la comunidad científica (DeFelipe et al., 2013; Jiang et al., 2013) [13].

En el hipocampo se ha dado con éxito la implementación de una clasificación de interneuronas, de esta manera la diversidad molecular se puede mapear sobre la base de estos criterios morfológicos y funcionales, se han descrito hasta la fecha más de 15 subtipos celulares (Somogyi and Klausberger, 2005). Sin embargo, debido a que la neocorteza muestra un complejo entramado celular y diferencias citoarquitectónicas entre áreas, la clasificación de los tipos de interneuronas presenta importantes limitaciones (Tremblay et al., 2016). De forma simplificada encontramos encontramos en hipocampo y neocorteza agrupados los diversos subtipos de interneuronas en tres grandes familias genéticamente definidas (Rudy et al., 2011; Harris and Shepherd, 2015; Tremblay et al., 2016): células inmunoreactivas para parvalbúmina (PV), somatostatina (Sst), y para el receptor de serotonina 3a (5-HT3a, que incluye las células que expresan el péptido intestinal vasoactivo, VIP) (Rudy et al., 2011), cada una de las cuales presenta diferentes propiedades biofísicas, dianas post-sinápticas y propiedades sinápticas (Figura 1.6). Además, la clasificación puede abordarse en base a los patrones electrofisiológicos de disparo, que es la consecuencia de las propiedades de la membrana junto con la composición de canales iónicos, y que van a definir las propiedades biofísicas de los subtipos de interneuronas (Kawaguchi, 1997; Markram et al., 2004). Esta clasificación, pese al amplio repertorio de patrones encontrados (más de 6 diferentes (Ascoli et al., 2008)) se suele mostrar de forma simplificada como: (i) *fast-spiking* presentan un intervalo entre PAs <10ms ; (ii) *non-fastspiking* (Ascoli et al., 2008).

[13]Durante la realización de esta tesis se asistió al congreso 'The Necessity of Cell Types for Brain Function'-FENS, en el que se puso de manifiesto lo imprescindible de avanzar en pos de un consenso colectivo en cuanto a esta clasificación para poder comprender la estructura y función de los circuitos corticales, y al mismo tiempo se destacó lo difícil que está resultando debido a la ausencia de marcadores que puedan correctamente definir estos subtipos y su inter-conectividad, ya que como apuntaba Ramón y Cajal 'hemos aprendido muchísimo sobre los niveles moleculares y celulares del cerebro, pero desconocemos todavía mucho sobre la estructura y función de los circuitos cerebrales, que son las selvas impenetrables donde muchos investigadores se han perdido' (DeFelipe).

Las neuronas PV+ representan el grupo más numeroso de las interneuronas GABAérgicas de la corteza cerebral (40 %, (Rudy et al., 2011)). Dentro de esta familia encontramos 3 grandes tipos celulares con propiedades particulares y se subclasifican en base a los dominios celulares que inervan en las células excitadoras: (i) las células axo-axónicas o células candelabro (AAX, (Szentágothai, 1975)) que establecen sinapsis exclusivamente con el segmento inicial del axón de las células piramidales o principales (PCs) ; (ii) las células en cesto PV+ (basket cells (Kosaka et al., 1987)) sobre el soma celular y las dendritas proximales; (iii) las células biestratificadas (BS, (Buhl et al., 1994)), que co-expresan Sst (Sst+). Las PV+ basket cells son las más numerosas del grupo y se caracterizan por presentar un patrón de disparo de tipo *fast-spiking* (Tremblay et al., 2016), mientras que los otros tipos celulares dentro de las PV+ no presentan un patrón de disparo asociado de forma estricta con su inervación (Tremblay et al., 2016).

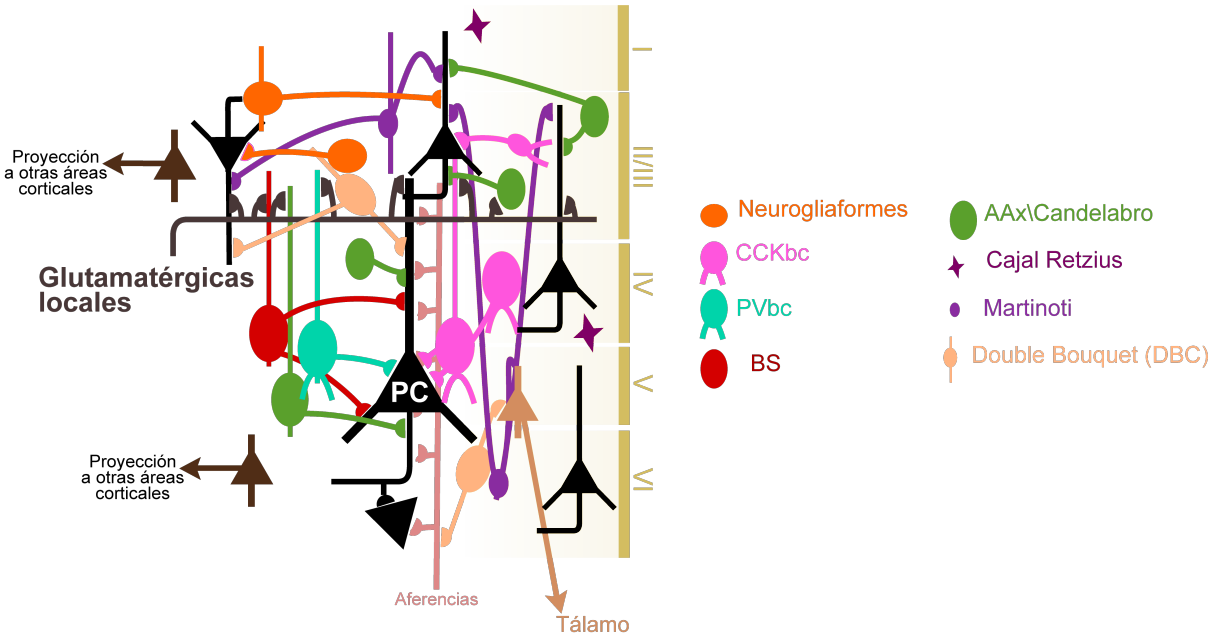


Figura 1.6 / ***Diversidad de interneuronas y conectividad en capas corticales.*** Esquema simplificado de la diversidad de interneuronas en la corteza y su localización simplificada por capas. La mayoría de las interneuronas de la neocorteza expresan uno de los tres marcadores principales. Otras subdivisiones dentro de cada grupo molecular se revelan mediante características morfológicas, sesgos de direccionamiento celular y subcelular, la expresión de otros marcadores, así como algunas propiedades electrofisiológicas y sinápticas conocidas. Figura adaptada de (Lunden et al., 2019; Rudy et al., 2011).

La conectividad y propiedades morfológicas básicas de las neuronas de corteza han sido esquematizadas en la Figura 1.6. Dada la diversidad funcional dentro del conjunto que en-

globa a las PV+, no es de extrañar que se hayan relacionado con una variedad amplia de enfermedades neurológicas y psiquiátricas (Marín, 2012). Por tanto, un mayor conocimiento acerca de su regulación y el control que ejercen sobre los circuitos corticales resulta crucial para la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas dirigidas a estas patologías.

1.3.2. Balance excitación/ inhibición

El reclutamiento de interneuronas a través de proyecciones excitadoras da lugar a mecanismos de tipo *feedforward y/o feedback*[14] inhibidores, que regulan el grado de inhibición de forma que se vuelva proporcional a la excitación de entrada local, balanceando así el circuito. Esta proporcionalidad se ha observado en diferentes áreas corticales, donde cambios en la intensidad o la fuerza de un input suponen modificaciones concomitantes de excitación e inhibición en todo el circuito (Anderson et al., 2000; Poo and Isaacson, 2009; Wehr and Zador, 2003; Wilent and Contreras, 2004; Zhang et al., 2003b).

Este balance[15] se torna fundamental para mantener los niveles de excitabilidad del sistema dentro de rangos fisiológicos; resaltando de este modo, la importancia de una relación adecuada entre excitación e inhibición, que se traduce en que variaciones en la magnitud de una u otra, suponen efectos compensatorios que mantienen el sistema en un equilibrio dinámico (Turrigiano, 2011).

El mantenimiento del balance entre excitación e inhibición es fundamental para sostener la ganancia en el sistema [16], lo que significa que cuando una de estas conductancias está subrogada a la otra, la situación se invertirá dándole al sistema la capacidad de una respuesta altamente selectiva y precisa. De esta forma algunas informaciones pueden prevalecer a nivel de célula individual independientemente de los cambios en el circuito (Isaacson and Scanziani,

[14]Se mantienen estos términos en inglés que hacen referencia a: Feedforward, los mecanismos en los cuales aferentes excitadoras de larga proyección convergen en células excitadoras e inhibidoras simultáneamente; Feedback, la llegada de conexiones excitadoras a interneuronas locales que a su vez establecen conexiones inhibitorias sobre las células glutamatérgicas. Ver Figura 1.7.

[15]El concepto "Balance" es útil en tanto que reúne a nivel cualitativo algunas propiedades importantes de la excitación y la inhibición, como el hecho de que alterando una de las dos conductancias sin que lo haga de manera proporcional la otra se puede llevar la actividad cerebral a extremos no fisiológicos. Sin embargo, es importante no entender el concepto de forma en exceso literal, puesto que no implica que excitación e inhibición sean iguales, ni tampoco que la función principal de la inhibición sea la de evitar estados epilépticos, una visión quizás demasiado simplista.

[16]Definiendo ganancia como la propiedad que presenta una neurona de integrar las señales que recibe. A modo de ejemplo, la pendiente de la relación *input-output* cuando aumentan los disparos de PA de una neurona en respuesta al aumento del input excitador.

2011; Turrigiano, 2011). Esto implica que la monitorización de una sola neurona no tiene, por definición, un efecto en la representación que un estímulo determinado vaya a tener en la corteza (Figura 1.7).

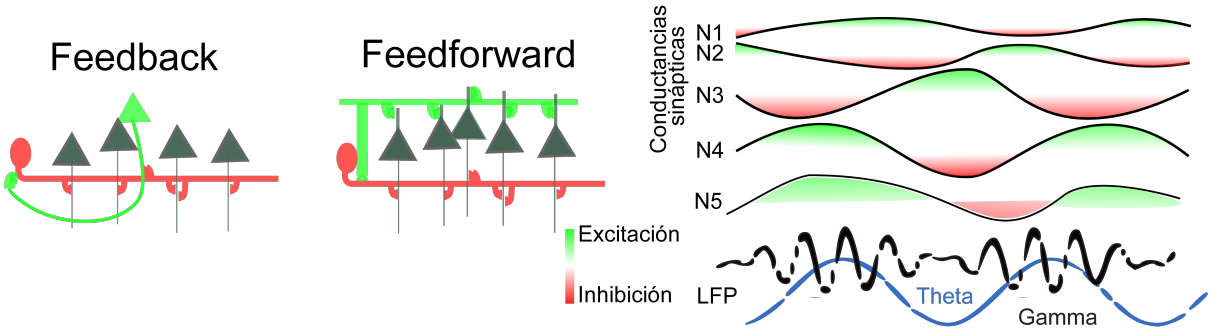


Figura 1.7 / *Excitación/Inhibición: un balance necesario para la correcta función cerebral.* Esquema de los circuitos de *feedforward* y *feedback*. Dcha, se muestran las conductancias sinápticas de diferentes neuronas (N1-N5), con la proporción de excitación e inhibición sináptica que reciben. La señal global, registro electrofisiológico de campo (LFP), muestra oscilaciones espontáneas que revelan diferentes patrones de activación. Como se observa el patrón de oscilación poblacional no tiene por qué coincidir con la actividad neuronal unitaria. Adaptada de (Isaacson and Scanziani, 2011).

1.3.3. Oscilaciones de los circuitos neuronales

Las oscilaciones son cambios sincronizados y recurrentes de los movimientos iónicos a través de las membranas, que conducen a fluctuaciones periódicas de la actividad eléctrica, las cuales reflejan la sincronización entre grupos de neuronas, una característica común de muchas redes neuronales (Contreras and Steriade, 1995; Buzsáki, 2009) (Figura 1.7); formando así parte del lenguaje que el cerebro ha adquirido para representar la información. La codificación de la información constituye, por tanto, un proceso dinámico en el que neuronas individuales de distintas áreas se comunican dentro de una red (Buzsaki and Draguhn, 2004). Las frecuencias y dinámicas temporales de las oscilaciones se han asociado con distintos estados conductuales (Contreras and Steriade, 1995; Pevzner et al., 2016; Salinas and Sejnowski, 2000). Pese a que los mecanismos precisos que generan las oscilaciones varían de un circuito a otro dependiendo de las propiedad de cada uno de los componentes neuronales, los ritmos cerebrales están basados en dos mecanismos fundamentales que permiten su generación (Buzsáki and Wang, 2012). El primero se basa en la presencia de poblaciones celulares excitadoras e inhibidoras, que permiten una competencia entre la inhibición y la excitación

durante la que se producen fenómenos de feedback (Buzsáki and Wang, 2012). El segundo se sustenta en la existencia de un fenómeno conocido como resonancia [17], que describe la capacidad de las neuronas para responder selectivamente a las entradas de una determinada frecuencia (Buzsáki and Wang, 2012; Hutcheon and Yarom, 2000; Pevzner et al., 2016).

Las oscilaciones que presenta el cerebro van desde los 0.05 Hz a los 500 Hz (Buzsáki and Wang, 2012; Shein-Idelson et al., 2016). Las más estudiadas, fundamentalmente en humanos y roedores, se clasifican en las siguientes bandas de frecuencia: delta (0.5-4 Hz), theta (5-10 Hz), gamma (30-120 Hz) [18] y *ripples* (>140 Hz) (Buzsaki and Draguhn, 2004). Los patrones de oscilación están bien conservados en mamíferos donde se han correlacionado con estados comportamentales (Destexhe and Sejnowski, 2003; Kahana et al., 2001; Laurent, 2002). Dentro de estas oscilaciones las más ubicuas son las de tipo gamma. En concreto, se ha establecido que las oscilaciones gamma están basadas en el disparo rítmico de las interneuronas, con un destacado papel de las interneuronas PV+ (Cardin et al., 2009; Buzsáki and Wang, 2012; Sohal et al., 2009; Sohal, 2016). Las células PV+ son potentes reguladoras de la actividad local de la red (Hu et al., 2014), y su activación sincronizada se ha demostrado suficiente para la inducción de oscilaciones gamma (Buzsáki and Wang, 2012; Cardin et al., 2009; Sohal et al., 2009). De manera que su actividad no es solo imprescindible a nivel del circuito local, si no que está directamente relacionada con la modulación de la conducta (Isomura et al., 2009; Kvitsiani et al., 2013). Así, estudios recientes han mostrado que las interneuronas PV+ actúan como unidades funcionales en la corteza prefrontal medial (CPFm) para orquestar el flujo de información entre distintas áreas del cerebro que, en último término, determina la flexibilidad cognitiva y el comportamiento animal (Courtin et al., 2014; Kepecs and Fishell, 2014; Sohal, 2016).

Los eventos rítmicos de gamma se pueden observar en diferentes áreas del cerebro bajo un amplio rango de condiciones fisiológicas (Colgin et al., 2009; Buzsáki and Wang, 2012; Sohal, 2016), normalmente relacionadas con 'estados de actividad', siendo uno de los eventos

[17] Se refiere al conjunto de fenómenos relacionados con los movimientos periódicos en que se produce el reforzamiento de una oscilación al someter el sistema a oscilaciones de una frecuencia determinada. Quizás a modo de ejemplo ilustrativo nos podemos referir el caso de una formación de soldados que rompe el paso cuando cruza un puente, así se evita que la frecuencia de la marcha sea próxima a la frecuencia natural de la estructura, y el puente se pueda romper.

[18] Cabe destacar que la banda de frecuencia que se corresponde con las oscilaciones gamma sigue siendo un tema en discusión por parte de la comunidad científica, por lo que el límite superior puede encontrarse definido hasta 140 Hz. Además, dentro de gamma se puede realizar subclasificaciones como bajo gamma (30 a 60 Hz) y alto (60 a 80 Hz)

más prominentes del electro-encefalograma (EEG) durante los estados de vigilia (Brown et al., 2012; Sohal, 2016). Las oscilaciones gamma se pueden observar a múltiples escalas en los registros, desde fluctuaciones en el potencial de membrana en registros intracelulares y los patrones de disparo de las neuronas (un patrón que se repite cada 10-30ms)[19], hasta fluctuaciones periódicas de la actividad extracelular que se detectan en el potencial de campo local (LFP) [20] (Ver Figura 1.7). Desde una perspectiva funcional, la sincronización en bandas de frecuencia gamma implica un mecanismo de comunicación neuronal altamente eficaz, ya que la actividad sincronizada de un grupo de neuronas supone que sus PAs sean coincidentes, lo que permite que los potenciales sinápticos se integren en la neurona que los recibe de forma que se incremente su impacto final (Gray and Singer, 1989; Fries et al., 2007; Jensen et al., 2007; Buzsáki and Wang, 2012; Sohal, 2016; Lisman and Jensen, 2013).

Dado que las oscilaciones gamma implican fluctuaciones periódicas en los niveles de inhibición, dan lugar a cambios en la excitabilidad celular y circuital que también lo son. Estas fluctuaciones han sido objeto de debate y se postulan como el principio organizativo más importante en la dinámica del cerebro (Buzsáki and Moser, 2013; Buzsáki and Wang, 2012). Así se han propuesto diversas perspectivas que sugieren la existencia de un código que permitiría representar diferentes elementos y/o eventos relevantes comportamentales por medio de la interacción entre distintas oscilaciones (tetha y gamma) (Lisman and Jensen, 2013).

En este contexto, diferentes hipótesis han surgido en cuanto a la funcionalidad de las oscilaciones gamma para la red, esto es ¿son causa o consecuencia de la actividad global del sistema? Una de ellas se basa en la comunicación entre los circuitos cerebrales a través de la coherencia (CTC, del inglés, *Communication Through Coherence* (Fries, 2015)), que propone que las fases de gamma dominadas por una fuerte inhibición amortiguan significativamente las respuestas a los inputs recibidos durante esta fase, mientras que inputs recibidos fuera de estos periodos se maximizan. Así, la comunicación y el flujo de información de un circuito neuronal a otro se incrementaría cuando las oscilaciones gamma entre ellos se sincronicen (Sohal, 2016; Bosman et al., 2012; Womelsdorf et al., 2007) (Figura 1.8).

[19]Estos disparos pueden ser fácilmente estudiados empleando auto- y cross- correlogramas que dan información acerca del tipo neuronal(Jensen et al., 2007; Sohal, 2016).

[20]Se refiere a cómo la actividad celular se refleja en el medio extracelular a modo de variaciones locales de voltaje.

Además, se ha propuesto que la potencia espectral [21] de gamma podría estar modulada por la fase de ritmos más lentos, como theta (Buzsáki and Wang, 2012; Sohal, 2016; Tort et al., 2009, 2008; Varela et al., 2001). De forma que pese a su carácter generalmente local, estas sincronizaciones entre distintas áreas cerebrales se han relacionado con el comportamiento animal, y parecen necesarias para la codificación de la información (Buzsáki and Wang, 2012; Sohal, 2016). La participación de las oscilaciones gamma en el procesamiento cognitivo se ha afianzado con estudios que demuestran cómo la potencia de gamma aumenta en regiones corticales específicas durante los test de memoria (Yamamoto et al., 2014), procesos de atención (Kim et al., 2016), y áreas relacionadas con la flexibilidad cognitiva (Cho et al., 2015). Sin embargo, es importante tener en cuenta que la hipótesis CTC no establece cómo la información está codificada si no únicamente cómo se transmite entre las distintas regiones cerebrales.

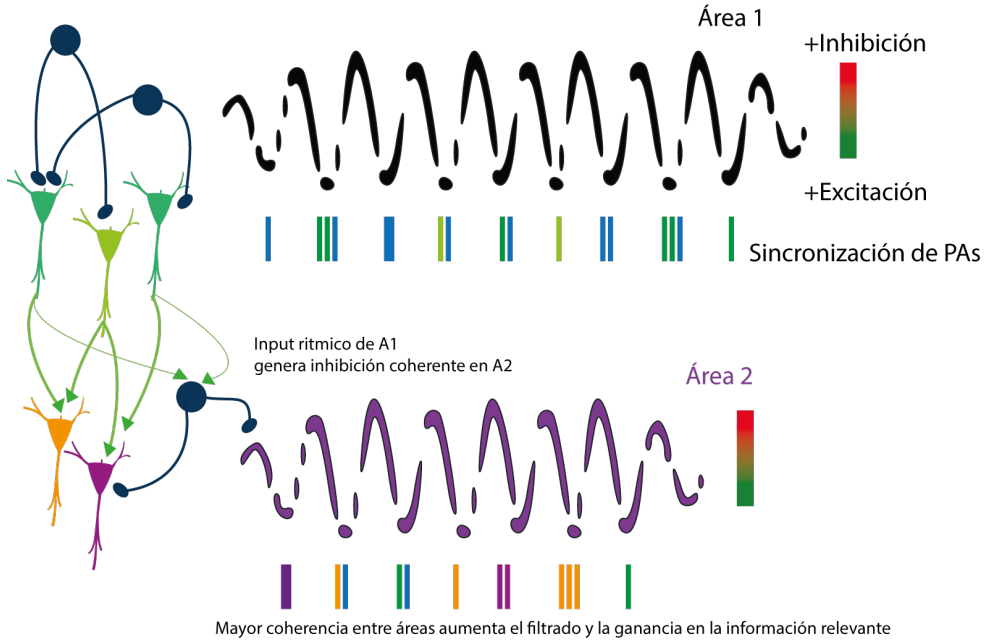


Figura 1.8 / ***Coherencia y sincronización en áreas corticales.*** Visión esquemática de los mecanismos a través de los cuales las oscilaciones pueden modular el procesamiento de información cortical. Arriba, las interneuronas inhibidoras (círculos) proporcionan inhibición rítmica sincronizada a las neuronas piramidales (triángulos). Las neuronas piramidales locales pueden aumentar su frecuencia de disparo en fase con las oscilaciones. Adaptada de (Sohal, 2016).

Otra de las hipótesis establece que las oscilaciones gamma podrían actuar como el marcapasos de los disparos de PAs, de forma que controlarían el tiempo exacto en el que éstos

[21] Densidad espectral (a partir de ahora la denominaremos como potencia) hace referencia a la distribución de la potencia de una señal para cada una de las distintas frecuencias de las que está formada.

transmiten la información (Fries et al., 2007). Otra posibilidad es que la aparición de estas oscilaciones sea solo una consecuencia de la actividad de la red, de forma que serían la lectura de la actividad subyacente sin mayor relevancia biológica. Si fuese el caso, seguirían sirviendo como indicadores del estado de los circuitos cerebrales (Ray et al., 2013; Sohal, 2016).

1.3.4. Astrocitos y el sistema GABAérgico

El ácido γ-aminobutírico (GABA) juega un papel fundamental en la función cerebral, siendo el NT inhibidor más abundante del SNC. El GABA es sintetizado a partir de glutamato por la enzima glutamato descarboxilasa (GAD, del inglés glutamic acid decarboxylase) (Roberts and Frankel, 1950) y almacenado dentro de vesículas en los terminales presinápticos. Una vez liberado, el Nt GABA es recaptado por el terminal presináptico o por los astrocitos, donde se metabolizará a glutamato por medio de la enzima GABA-transaminasa (Bessman et al., 1953; Hertz, 2013).

Se conocen tres tipos de receptores para GABA: $GABA_A$, $GABA_B$ y $GABA_C$. Los receptores $GABA_A$ y $GABA_C$ son canales ionotrópicos que se activan por ligando y presentan preferencia por el ion Cl-, induciendo una hiperpolarización del potencial de membrana en el terminal postsináptico (Sivilotti and Nistri, 1991). Su activación da lugar a respuestas inhibitorias rápidas y, por tanto, son los responsables del componente rápido del IPSC (del inglés, inhibitory postsynaptic current). Los receptores $GABA_B$ son receptores metabotrópicos ligados a proteínas Gi/o (Ulrich and Bettler, 2007; Chalifoux and Carter, 2011), de respuesta más lenta y su expresión en neuronas media el componente lento del IPSC.

El recorrido bibliográfico inicial acerca de la Sinapsis Tripartita 1.1 y la gliotransmisión se ha focalizado en la comunicación bidireccional astrocito-neurona basada en la señalización glutamatérgica, esto es, excitadora. Sin embargo, el estudio de la señalización entre interneuronas y astrocitos carece aún de estudios detallados que nos permitan conocer sus propiedades.

Los astrocitos presentan dos mecanismos fundamentales para detectar la actividad inhibitoria, la expresión de receptores GABA y de transportadores para GABA (GATs). El transportador GAT-3 es el más abundante en los procesos de los astrocitos que se encuentran próximos a las sinapsis y los somas neuronales (Boddum et al., 2016), aunque también se ha descrito la presencia de GAT-1 (Pirttimaki et al., 2013). La recaptura de GABA influencia

la actividad inhibitoria mediada por receptores $GABA_A$ (Moldavan et al., 2017; Song et al., 2013). Además, se ha descrito que GAT-3 induce la liberación de ATP/adenosina por parte de los astrocitos, disminuyendo la transmisión excitadora cuando estas moléculas alcanzan receptores presinápticos para adenosina (A1Rs) (Boddum et al., 2016), y aumentando la transmisión inhibitoria mediante la activación de A1Rs postsinápticos (Matos et al., 2018). Los astrocitos expresan receptores $GABA_A$ ($GABA_ARs$) (Macvicar et al., 1989; Müller et al., 1994) y $GABA_B$ ($GABA_BRs$) (Blomqvist and Broman, 1988; Lee et al., 2010; Martínez-Rodríguez et al., 1993). La activación de $GABA_ARs$ supone corrientes despolarizantes en astrocitos (Egawa and Fukuda, 2013; Meier et al., 2008; Müller et al., 1994), que estimulan vías de Ca^{2+} astrocitario a través de canales de Ca^{2+} dependiente de voltaje (Letellier et al., 2016; Meier et al., 2008; Tippens et al., 2008). Una elevada actividad GABAérgica induce la salida de Cl^- de los astrocitos, lo cual supone que regulando los niveles de Cl^- extracelular modulan la *driving force* [22] para la transmisión GABAérgica (Egawa and Fukuda, 2013), manteniéndolos los niveles de Cl^- en un rango óptimo durante periodos de actividad elevada de las interneuronas.

La activación de receptores $GABA_B$ implica mecanismos de señalización por proteínas Gi/o y activación de vías de Ca^{2+} intracelular en astrocitos (Mariotti et al., 2016a; Perea et al., 2016). Esta activación puede afectar a la actividad neuronal mediante la liberación de Gts (como glutamato, ATP o adenosina). En 1998, un estudio pionero mostraba el aumento de la transmisión sináptica inhibitoria en las células piramidales de CA1 mediante la liberación de glutamato por parte de los astrocitos que actuaba sobre las células excitadoras activando sus receptores de tipo AMPA/NMDA (Kang et al., 1998). Posteriormente, se describió que el glutamato liberado por los astrocitos también podía activar receptores de kainato (Liu et al., 2004), y receptores presinápticos mGluRs de tipo II/III en las terminales inhibitorios (Liu et al., 2004), lo que inhibía la liberación de Nt por parte de las interneuronas del hipocampo. Además, la activación de astrocitos hipocampales a través de $GABA_BR$ supone la liberación de ATP/Adenosina (Ado) (Zhang et al., 2003a; Pascual et al., 2005), que se traduce en una reducción del glutamato liberado en otras sinapsis debido a la activación de A1Rs en terminales presinápticas glutamatérgicas (Andersson et al., 2007; Chen et al., 2013; Serrano et al., 2006).

[22] Término del inglés que se refiere a la diferencia entre el potencial de membrana y el potencial de equilibrio de un ion (es decir, la suma total del potencial eléctrico y el gradiente químico). Cuando un ion no se encuentra en su equilibrio tiene determinado potencial para moverse, esto es la driving force.

Estos resultados convergen, por tanto, en la idea de que mediante la activación GABAérgica los astrocitos pueden aumentar las acciones de la población de células inhibitorias tanto espacial como temporalmente. Además, los astrocitos parecen responder de forma diferencial al tipo de interneurona que está liberando GABA (Mariotti et al., 2018), si esta selectividad se debe a la disposición espacial de las sinapsis que conectan unos tipos de interneuronas a otras células, o a otros mecanismos que permiten a los astrocitos discriminar el tipo celular son aún preguntas abiertas (Mederos and Perea, 2019). La complejidad parece aún mayor si se consideran estudios recientes mostrando que los astrocitos son capaces de transformar la actividad inhibidora en excitadora, mediante el cambio de la señalización GABAérgica de las interneuronas sobre algunas sinapsis excitadoras (Covelo and Araque, 2018; Perea et al., 2016).

1.4. Memoria y cognición

1.4.1. El hipocampo: estructura y función

La formación del hipocampo agrupa un conjunto de áreas cerebrales situadas en el lóbulo temporal que comprenden el giro dentado (DG, del inglés, *dentate gyrus*), el hipocampo propiamente dicho (que comprende las áreas designadas de CA1-CA3, de *Cornu Ammonis* por el dios Ammón), el complejo subicular y la corteza entorrinal (Figura 1.9).

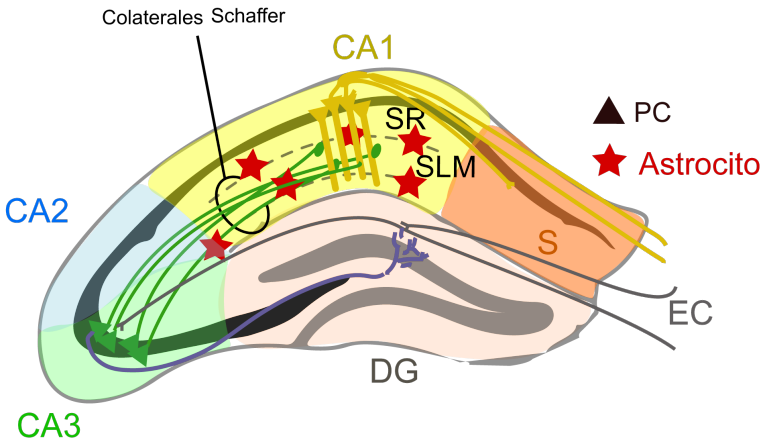


Figura 1.9 / *Esquema de la estructura del hipocampo.* PC: célula piramidal; EC: corteza entorrinal; DG: giro dentado; SR: stratum radiatum; SLM: stratum lacunosum-moleculare; S: subiculum.

Del estudio de la formación hipocampal se han extraído un gran número de fundamentos de la neurociencia moderna, debido principalmente a que los circuitos hipocampales presentan una estructura compacta y monolaminar de sus células principales, que suponen una organización celular óptima para el análisis de las conexiones neuronales. Ramón y Cajal

ya formulaba la noción de estratificación de los *inputs* sobre las dendritas apicales de las células principales de CA1 (Ramón y Cajal, 1909). Posteriormente, la formación hipocampal se constituyó como el estándar de las preparaciones *in vitro*, en virtud de su estabilidad y la preservación de sus conexiones en las secciones de tejido (Schwartzkroin, 1975). De este modo, es en el hipocampo donde Kandel y colaboradores (1961) detallan la identidad de las sinapsis excitadoras e inhibitorias (Kandel et al., 1960; Kandel and Spencer, 1961), y donde Bliss y Lomo describen la potenciación a largo plazo (LTP, del inglés, *long term potentiation*), que indica cómo tras la activación repetida de las sinapsis excitadoras del hipocampo, se producía una potenciación que podía durar horas, e incluso días (Bliss and Lømo, 1973).

1.4.2. Plasticidad sináptica y memoria

La plasticidad es una de las características más destacadas del cerebro, se trata de la capacidad de generar cambios en su estructura y/o funciones dependientes de la experiencia o de estímulos externos. A nivel celular, se habla de plasticidad sináptica como una característica de las neuronas de cambiar la eficacia de sus sinapsis ya formadas y/o de formar nuevas conexiones (Bliss, 1979; Neves et al., 2008). La plasticidad se ha clasificado en base a su duración en plasticidad a corto plazo (de milisegundos a minutos) y plasticidad a largo plazo (de horas a días), pero también en función del aumento o disminución de la eficacia sináptica en potenciación (STP, del inglés, *Short-Term Potentiatio*n o LTP, del inglés, *Long-Term Potentiation*), y depresión (STD, del inglés, *Short-Term Depression* o LTD, del inglés, *Long-Term Depression*) (Citri and Malenka, 2008). Las formas de plasticidad sináptica a largo plazo más estudiadas son LTP y LTD dependientes de la activación de los receptores glutamatérgicos de N-metil-D-aspartato (NMDARs). Además, existen otros tipos de LTP independientes de los NMDARs (Granger and Nicoll, 2013; Thiagarajan et al., 2007; Johnston et al., 1992), en las que están implicados directamente los astrocitos (Perea and Araque, 2007), aumentando la gama de mecanismos que pueden ser responsables de esta plasticidad.

Es importante destacar que pese a que en ocasiones los métodos de aproximación al estudio del cerebro nos dejan una descripción de combinaciones independientes y estáticas de sus elementos constituyentes (Craik, 1947), aunar el conjunto de estos estudios supone generar combinaciones no lineales de la actividad celular, de forma que es conveniente aspirar a una visión global de los mecanismos interconectados para que reflejen con mayor precisión cómo el cerebro produce una correcta representación de la información.

La memoria es una función cognitiva elemental que permite el mantenimiento de la información durante diversos periodos de tiempo. La información almacenada en la memoria de trabajo se puede mantener activamente durante cortos períodos de tiempo, o se puede almacenar como memoria a largo plazo. De esta manera, la memoria importantes implicaciones en funciones cognitivas tales como el aprendizaje y la planificación (Fellows, 2004; D'Esposito and Postle, 2015).

La plasticidad sináptica cobra gran relevancia puesto que numerosos estudios han relacionado esta plasticidad con la memoria, siendo la memoria el resultado de los procesos derivados de la plasticidad sináptica (Kandel, 2001). La denominada hipótesis de la plasticidad y la memoria (SPM, del inglés *synaptic plasticity and memory*) (Martin et al., 2000) afirma que la plasticidad sináptica dependiente de actividad se induce en aquellas sinapsis apropiadas durante la formación de la memoria, y es necesaria y suficiente para la codificación y el almacenamiento de memorias en un área cerebral determinada (Hebb, 1950; Takeuchi et al., 2014; Kandel, 2001). Esta hipótesis afirma que la memoria de la experiencia previa está mediada por la reactivación de engramas [23], cuya base son las modificaciones en la eficacia sináptica (Tonegawa et al., 2015; Liu et al., 2012). La memoria es fundamental para la correcta realización de tareas en el reino animal, por ejemplo, una correcta navegación espacial durante la realización de una tarea requiere del procesamiento constante de las nuevas señales contextuales disponibles y el acceso a la información previamente almacenada (Buzsáki and Moser, 2013). En este contexto, se han descrito grupos celulares en el hipocampo que codifican información contextual específica sobre el entorno, denominadas *Place Cells* (Tsien et al., 1996; Hyman et al., 2012; Lasztóczi and Klausberger, 2016), que crean una representación neuronal única de cada entorno espacial mediante la generación de PAs. Por lo tanto, las neuronas del hipocampo se encuentran codificando y procesando activamente información sobre el entorno, incluso cuando en éste se producen cambios de forma rápida e inesperada (memoria de trabajo).

Recientemente, se ha sugerido que las oscilaciones gamma podrían actuar como elementos que contribuyen a la codificación, almacenamiento y recuperación de la memoria de trabajo (Roux et al., 2012; Senkowski and Gallinat, 2015; Yamamoto et al., 2014). Los patrones oscilatorios que aparecen durante la memoria de trabajo son predictivos del rendimiento de su posterior consolidación (Dupret et al., 2010), y existe un aumento de la actividad

[23] Los engramas son conjuntos de patrones de activación de neuronas que se establecen durante la formación de la memoria y que codifican contextos específicos.

oscilatoria gamma durante la recuperación de la memoria (Chen et al., 2018; Kim et al., 2016; Liu et al., 2018; Roux et al., 2012; Palva et al., 2011). Por lo tanto, las oscilaciones gamma pueden participar en el establecimiento de los patrones necesarios para la recuperación de la memoria de trabajo (Carr et al., 2012). Aunque el concepto de memoria de trabajo fue originalmente relacionado con funciones exclusivamente hipocampales (O'Keefe and Nadel, 1978; Nadel and MacDonald, 1980; Jarrard, 1993), se ha extendido a la CPF, que parece ser clave para la realización de diversas tareas de planificación y toma de decisiones (Kim et al., 2016; Liu et al., 2018).

1.4.3. Corteza Prefrontal Medial: estructura y función

En la naturaleza la mayoría de los comportamientos animales son dirigidos a un fin (en inglés, *goal-directed*, término que utilizaremos de aquí en adelante). Este tipo de comportamientos son complejos, ya que requieren que el sujeto perciba su entorno, aprenda acerca del significado de éste y finalmente tome una decisión sobre cómo actuar (Penner and Mizumori, 2012). En oposición a los comportamientos basados en mecanismos estímulo-respuesta, los comportamientos *goal-directed* suponen una selección anticipada a la acción (Pezzulo et al., 2014a), por tanto, constituyen el fundamento de la toma de decisiones que tienen lugar en el reino animal (Pezzulo et al., 2014a).

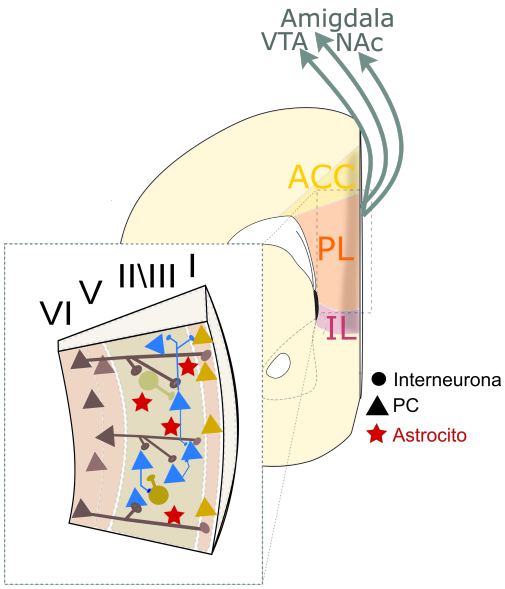


Figura 1.10 / *Corteza prefrontal medial (CPFm).* Visión esquemática de la corteza prefrontal, y una sección mostrando las distintas capas, nótese que se trata de una corteza agranular.ACC: corteza cingulada anterior; PL: corteza prelímbica; IL: corteza infralímbica; VTA: área tegmental ventral; NAc: núcleo acumbens.

Durante las últimas décadas el estudio de estos comportamientos se ha relacionado con diversas áreas cerebrales: hipocampo, corteza prefrontal (CPF), amígdala, y regiones ven-

tromediales del estriado (Pezzulo et al., 2014b). De entre todas ellas, la corteza prefrontal medial (CPFm) juega un papel central en la toma de decisiones, siendo considerada como la estructura por excelencia que organiza acciones de tipo *goal-directed* (Churchwell et al., 2010). La CPFm se encuentra en el lóbulo frontal, y en roedores está definida como una corteza agranular, es decir, no posee capa IV, en homología con los primates y los humanos. La CPFm está formada desde un eje dorso-ventral, por la corteza cingular anterior (ACC), la corteza prelímbica (PL) y la corteza infralímbica (IL) (Figura 1.10).

Para su participación en funciones cognitivas y procesos ejecutivos la CPFm envía proyecciones sumamente organizadas a áreas subcorticales, que se encuentran a su vez implicadas en estados de ánimo, motivación e impulsividad (Ko, 2017). Entre estos podemos destacar: el procesamiento emocional mediado por la amígdala, los fenómenos de estrés regulados por el hipotálamo, la memoria codificada por el hipocampo, los incentivos sociales regulados por el núcleo accumbens y otras regiones involucradas en el procesamiento de *inputs* / *outputs* tanto motores como sensoriales. En 2009 Ernst y Fudge propusieron un modelo en el que se atribuían los comportamientos *motivacionales* considerados *goal-directed* a la CPFm, el estriado y la amígdala (Ernst and Fudge, 2009).

Se ha mostrado relevante el balance E/I para los procesos cognitivos implicados en estos comportamientos, así como un papel fundamental de las oscilaciones gamma (Kim et al., 2016). La relación entre la CPFm y el balance E/I se ha manifestado en la existencia de desórdenes neuropsiquíatricos en la CPFm en humanos (Yizhar, 2012; Bicks et al., 2015), consistentes con estudios en roedores, como el hecho de que la actividad neuronal de la CPFm correlacione con los comportamientos de interacción social (Lee et al., 2016). Alteraciones relacionadas con este comportamiento son especialmente relevantes en patologías como la esquizofrenia (Lustig et al., 2013; Gold and Shadlen, 2007), déficits cognitivos (Carlén et al., 2012; Korotkova et al., 2010), o enfermedades de tipo depresivo (Xiong et al., 2019). Las deficiencias cognitivas comunes en estas patologías parecen tener relación con la disfunción de la interneuronas PV+ (Cardin et al., 2009), y en la potencia de las oscilaciones gamma en la CPFm (Lewis et al., 2012). De manera que dilucidar los componentes de los circuitos que regulan el control de estos comportamientos implicaría respuestas clave no solo de cómo la CPFm y sus componentes celulares contribuyen a comportamientos de tipo *goal-directed*(Fitoussi et al., 2018), sino además, una visión de cómo las alteraciones del circuito se traducen en sintomatología relacionada con desórdenes mentales caracterizados por

alteraciones cognitivas.

1.4.4. Circuitos cerebrales y toma de decisiones

El inicio, consecución y la adaptación en la toma de decisiones son el pilar crítico de los comportamientos *goal-directed* (Griffiths et al., 2014; Ernst and Paulus, 2005; Ernst et al., 2004; Fellows, 2004; Lee et al., 2012), y requieren la integración de la información relevante procedente de las diferentes fuentes del entorno (siendo necesario discriminar la información eliminando el ruido inherente a los inputs), así como combinar la información aportada por cada uno desde cada uno de los circuitos (Figura 1.11). La experiencia por repetición se ha posicionado como un mecanismo primordial en la optimización de la toma de decisiones (Fine and Jacobs, 2002; Gilbert et al., 2001), puesto que mejora el filtrado del ruido de las entradas de información y destaca la información relevante para la ejecución de tareas (Dosher et al., 2013; Li et al., 2004; Dosher et al., 2013).

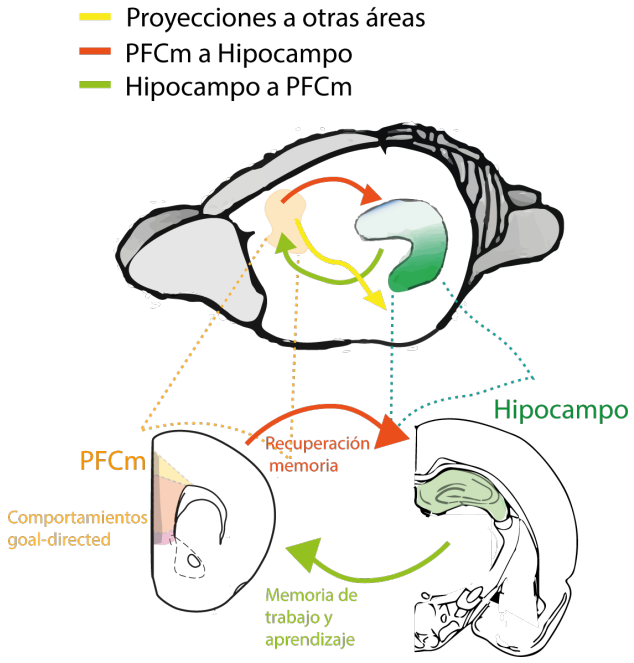


Figura 1.11 / ***Conexiones entre la corteza prefrontal (CPF) y el hipocampo.*** Las flechas indican la dirección de las proyecciones y sus funciones.

El empleo de técnicas de resonancia magnética funcional ha permitido esclarecer procesos que subyacen al aprendizaje y que están implicados en la discriminación de ruido y las diferencias en estímulos (para revisiones(Welchman and Kourtzi, 2013)). Sin embargo, los mecanismos de plasticidad inhibitorios relacionados con a la habilidad para mejorar la toma de decisiones por medio del aprendizaje son poco conocidos. La caracterización de estos mecanismos inhibitorios parece de fundamental teniendo en cuenta su contribución al balance

E/I y las oscilaciones gamma, muy relacionadas en los comportamientos de tipo *goal-directed*.

Dada la participación de los astrocitos en la modulación de la transmisión sináptica, tanto excitadora como inhibidora, es pertinente preguntarse si los astrocitos están participando en los comportamientos de tipo *goal-directed*. La bibliografía disponible hasta la fecha directamente relacionada con la participación astrocitaria es limitada. Los estudios que han abordado este asunto han mostrado que el bloqueo de la liberación de Gts puede desencadenar una desincronización crítica de las oscilaciones theta entre el hipocampo y la CPFm, lo que implica una deterioro cognitivo (Sardinha et al., 2017). Por tanto, continuar profundizando en el estudio de estos fenómenos podría ser clave para responder a preguntas relacionadas con los mecanismos que subyacen la toma de decisiones.

Además, mientras que la actividad de los $GABA_BRs$ parece haber sido ampliamente caracterizada en rodajas de cerebro (Isaacson et al., 1993; Scanziani, 2000; Pérez-Garci et al., 2006; Bowery, 1993), son pocos los estudios que han mostrado el papel funcional de los receptores $GABA_B$ *in vivo*, de manera que su contribución a la actividad espontánea y inducida por estímulos externos es poco conocida (Perea et al., 2016; Isaacson and Scanziani, 2011).

Por todo ello, esta tesis doctoral se ha centrado en investigar el papel de los astrocitos y la señalización por $GABA_BRs$ en los procesos corticales que derivan en la recuperación de la memoria de trabajo y la toma de decisiones.

Capítulo 2

Objetivos

2 | Objetivos

El objetivo de la presente tesis doctoral ha sido el estudio de los procesos que gobiernan la existencia y las características de la comunicación bidireccional entre las interneuronas parvoalbúmina-positivas (PV+) y los astrocitos en la corteza prefrontal medial (CPFm), un área fuertemente ligada al aprendizaje y ejecución de tareas cognitivas.

Para ello ha sido necesario el desarrollo de nuevas herramientas moleculares que permitan el control temporal de la actividad astrocitaria de manera específica, con el fin de evaluar su impacto en la actividad de los circuitos neuronales.

Para lograr este objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Desarrollar nuevas herramientas moleculares para el control temporal de la actividad astrocitaria: melanopsin como opsina para la activación de astrocitos.
- Evaluar las propiedades de la comunicación establecida entre las neuronas PV+ y los astrocitos en capa 2/3 de CPFm *in situ*

⇒ Activación GABAérgica de las respuestas de Ca^{2+} en astrocitos.

⇒ Consecuencias de la activación GABAérgica de astrocitos sobre la plasticidad sináptica de neuronas piramidales de la capa 2/3 de CPFm.

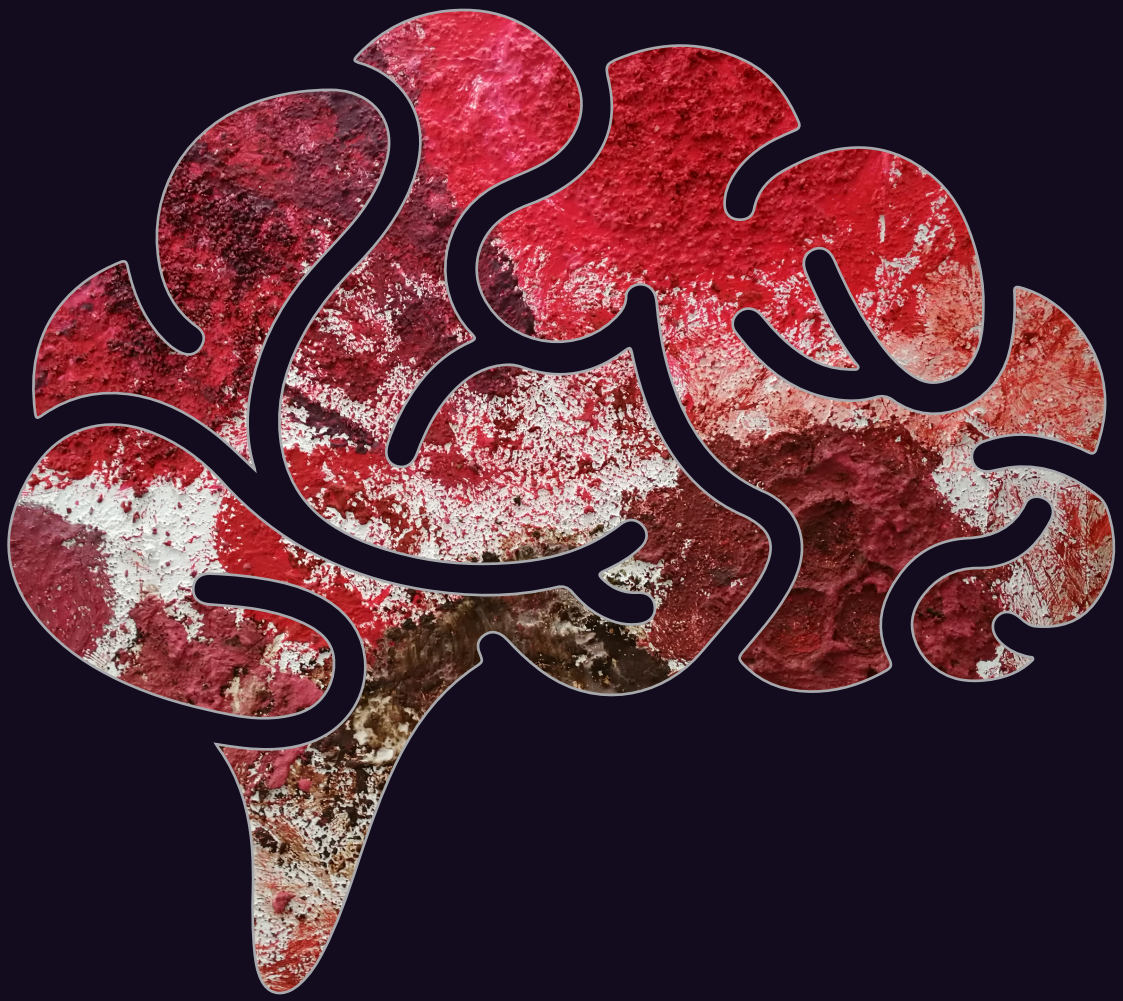
- Caracterizar *in vivo* el impacto de la señalización GABAérgica de astrocitos en la actividad de los circuitos corticales y en procesos cognitivos.

⇒ Consecuencias de la activación GABAérgica de astrocitos en el comportamiento animal: pruebas de memoria y toma de decisiones.

⇒ Registro de la actividad cortical local, LFP, durante la toma de decisiones.

⇒ Rescate funcional de los déficits cognitivos mediante la estimulación selectiva de astrocitos con melanopsin.

Capítulo 3



Materiales y Métodos

3 | Materiales y Métodos

Todos los protocolos y procedimientos experimentales descritos se realizaron de acuerdo con la legislación española vigente (RD 1201/2005 y L.32/2007), las Directivas del Consejo de Europa de 1986 (86/609/EEC) y 2003 (2003/65/CE) para la investigación animal, y fueron aprobados por el Comité de Ética del Instituto Cajal (CSIC). Los registros electrofisiológicos *in vivo* de ratones con libertad de movimiento fueron obtenidos en la Universidad Heinrich-Heine de Düsseldorf. Estos experimentos fueron aprobados por el Comité Ético de Investigación Animal de dicha Universidad.

3.1. Animales de experimentación

En la presente tesis doctoral se utilizaron ratones C57BL/6, PV-Cre, TDxTom, Ip3r2$^{-/-}$ (cedido amablemente por Dr.J. Chen), $GABA_BWT$ y $GABA_Bflox$ (cedidos en colaboración por Dr. B. Bettler) de entre 2 a 25 semanas. Los animales se mantuvieron estabulados en condiciones estándar en el animalario bajo un ciclo de 12 horas día/noche. Los registros *in vitro* de la primera parte de resultados (apartado 4.1) se realizaron en animales de 2-3 semanas. Los registros *in vitro* de la segunda parte de resultados (apartado 4.2) se realizaron en animales de 4-5 semanas. Los experimentos de comportamiento y los registros *in vivo* se realizaron en animales de más de 6 semanas.

Se tomaron todas las medidas necesarias y se realizaron los máximos esfuerzos posibles en pos de tanto minimizar el número de animales utilizados como de evitar y reducir el dolor y el estrés de los animales de experimentación.

3.2. Cirugías

3.2.1. Infecciones virales

Los ratones se anestesiaron con isofluorano mediante un vaporizador de gas (1.5 – 3 % isofluorano en oxígeno), tras lo que fueron colocados en un aparato esterotáxico. Los ojos de los animales anestesiados se protegieron con gel. Se afeitó la cabeza y se desinfecto mediante etanol. Se realizó una incisión sobre la línea media de tal forma que bregma y lambda quedasen expuestas (ver Figura 3.1). El cráneo se limpió con suero fisiológico (NaCl). Se alinearon bregma y lambda en el eje dorso-ventral tras lo que se tomaron coordenadas estereotáxicas acordes a bregma en base al atlas de George Paxinos y Keith Frankling (Paxinos and Franklin, 2012). Un capilar de vidrio pulido fue utilizado para inyectar los virus en la región específica del cerebro, mediante el uso de un nanoinjector, acorde a descrito en (Perea et al., 2014; Mederos et al., 2019). El virus se recogió en el capilar de vidrio a través de succión con el nanoinyector tras lo que se posicionó sobre la craneotomía y a continuación se introdujo despacio en el tejido hasta alcanzar la coordenada deseada. El volumen de virus (0.3-0.6 μl) se perfundió a una velocidad de 40nl/min, tras la inyección se esperaron 5-10 min antes de retirar el capilar y se suturó la piel de los animales.

Se ayudó al animal a su recuperación de la anestesia mediante el uso de una manta térmica, que se mantuvo hasta que este despertó, y se devolvió a la caja una vez su respiración y su movimiento eran los habituales. A continuación se detallan las coordenadas e inyecciones utilizadas en los diferentes experimentos (Figura 3.1).
(i)C57/BL6J e Ip3r2$^{-/-}$ para experimentos *in vitro* de Ca^{2+} y registros electrofisiológicos en rodajas (sección 4.1) se utilizaron crías posnatales (P5-8) con coordenadas de infección AP -2 mm; ML 1.4 mm; DV 1.4-1.2 mm los virus usados fueron ChR2 (AAV2/5-GFAP104-ChR2-mCherry; UNC Vector Core; viral titer 3.9x1012), vector (AAV2/5-Gfap-mCherry; UNC Vector Core; viral titer 3.9x1012), melanopsin (AAV2/5-GFAP104-melanopsin-mCherry; viral titer 2.8x1012). En el caso de los experimentos de Ca^{2+} se co-infecto con cytoGCaMP6f (AAV2/5-Gfap-cyto- GCaMP6f; PENN Vector Core; viral titer 6.13x1013) o lckGcamp6f (AAV2/5-Gfap-lck- GCaMP6f; PENN Vector Core; viral titer 6.13x1013)
(ii)PVCrexTDTom para experimentos *in vitro* de Ca^{2+} y registros electrofisiológicos en rodajas de la segunda parte de resultados (ver sección 4.2) se infectaron animales de 2 semanas para su utilización a edades 4-5 semanas tras la expresión de virus en coordenadas AP 1.78, ML±0.5, DV 2-0.8 mm los virus usados fueron CamKII (AAV5-CamKII- YFP; PENN Vector

Core; viral titer 6.13x1013) o cytoGCaMP6f (AAV2/5-Gfap-cyto- GCaMP6f; PENN Vector Core; viral titer 6.13x1013), melanopsin (AAV2/5-GFAP104-melanopsin-mCherry; viral titer 2.8x1012).
(iii)PVCre y GABAWT/flox para experimentos *in vitro o in vivo* de optogenética y registros electrofisiológicos en rodajas o experimentos de comportamiento de la segunda parte de resultados (ver sección 4.2) se usaron ratones de 2 a 12 semanas para expresion ChR2 (AAV2/5-dio-ChR2-mCherry; UNC Vector Core; viral titer 3.9x1012) o GFAPCre (AAV2/5-GFAP104-cre-mCherry; viral titer 2.8x1012)

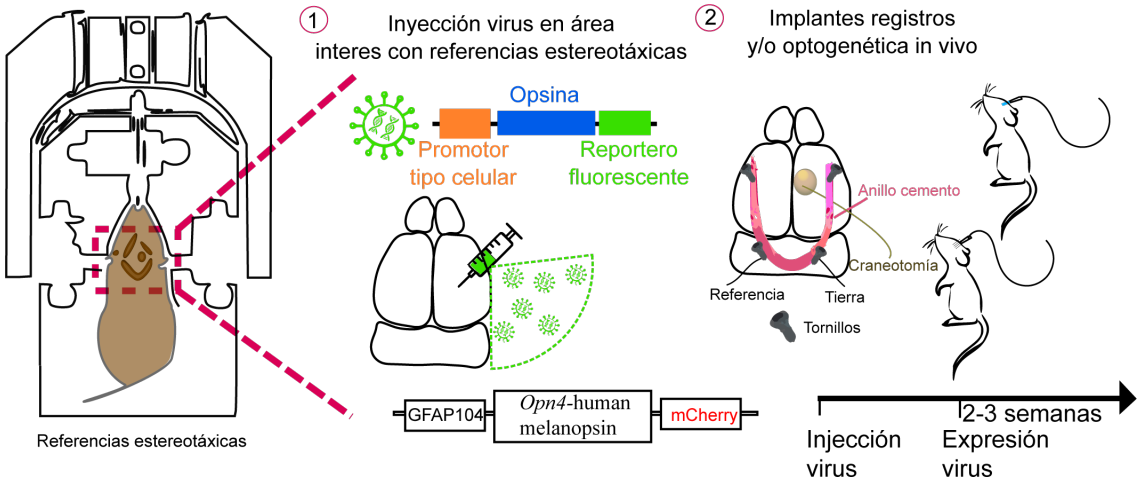


Figura 3.1 / *Esquema de los pasos llevados a cabo en las cirugías.* Se muestra un esquema de la colocación del animal bajo el aparato estereotáxico. En el punto 1 se esquematiza una infección con virus. En el punto 2 la estructura de anillo de cemento y tornillos que forman parte de la sujección de los implantes.

En el caso del virus de melanopsin la estrategia a seguir para su generación fue la siguiente: Melanopsin (Opn4-human melanopsin, AAI13559.1) se fusionó al reportero fluorescente mCherry y a continuación se clonó en partículas AAV (serotype 5; UNC Vector Core) mediante el uso del promotor de GFAP en su versión corta (GFAP104), ver Figura 3.1 en Paso 2.

3.2.2. Implantación de fibras ópticas

Previamente a la implantación se prepararon las fibras, adaptando el protocolo de (Zhang et al., 2010; Ung and Arenkiel, 2012).
Se utilizaron fibras ópticas multimodales de 100 μm diámetro (Thorlabs, Dachau, Germany). Se quitó la cubierta protectora, tras lo que se cortó la fibra utilizando un lápiz de diamante.

Esta fibra preparada se introdujo en una férula de cerámica (Thorlabs, Dachau, Germany), de forma que el extremo de la fibra sobresaliese sobre el borde convexo de la férula. Se utilizó resina de tipo epoxi sobre ambos extremos de la férula, se esperó a que endureciese (1 día). A continuación el extremo convexo de la férula se pulió mediante el uso de láminas para este fin *Aluminum Oxide Lapping (Polishing)* (Thorlabs). Para conseguir que las fibras fuesen más resistentes para la implantación, la base de las férulas se protegió con el material plástico que se usa para recubrir pines (Bürklin), sobre el que se aplicó pegamento y una vez seco cemento dental. La longitud final de la fibra se ajustó al área que se fuese a estimular.

Para la implantación de las fibras se procedió de forma que tras la inyección de virus y previamente a la sutura se introdujo la fibra óptica preparada. Posteriormente una mezcla de cera/parafina (50/50) se aplicó sobre la craneotomía, para proteger el tejido. Previamente a la infección del virus, estando prevista la implantación de la fibra, dos tornillos de acero inoxidable de cabeza milimétrica se habían introducido en el cráneo (sin llegar a tocar el cerebro) sobre el área posterior a lambda. Estos dos tornillos sirven a modo de plataforma de sujeción para la fibra de forma que sobre la férula y los tornillos se aplicará cemento dental, que se deja secar firmemente (Figura 3.1).

3.2.3. Implantación de electrodos para registro, *silicon probes*

Para el registro de potenciales de campo (LFP, del inglés *local field potential* y simultáneamente registro de *units*, es decir, registro de neuronas unitarias se utilizaron *silicon probes* móviles (B32, NeuroNexus Technologies). Para el conjunto de experimentos *in vivo* de 4.2, se prepararon *micro-drives* manualmente siguiendo el protocolo Knoche et al. (2003) [1]. La preparación del implante y del procedimiento quirúrgico es una adaptación de (Vandecasteele et al., 2012). Las *probes* se montaron sobre *microdrives* auto-fabricados, que permite mover la silicon probe implantada en los registros crónicos. Los microdrives se prepararon a partir de impresiones de placas de circuito (Sigmann Electronik) y una tira de tres pines con el del medio reemplazado con un tornillo de 10 mm de largo (DigiKey). Una vuelta completa (60') del tornillo mueve la probe aproximadamente 300 μm. Mediante el uso de un micromanipulador (Narishige), la probe se alineó con el microdive, de tal forma que los *shanks* quedasen perfectamente paralelos con el tornillo (ver Figura 3.2). Tras lo cual la probe está lista para

[1] Se trata de una estructura con tornillo móvil central, para permitir el ajuste de la posición de la *silicon probe* en el cerebro. Para poder recuperar las sondas de silicio al final de los experimentos, tanto el microdrive como el conector deben ser fácilmente desmontables. Para lograr esto, se utiliza un enfoque basado en que las piezas recuperables se fijan con tornillos a las piezas desechables cementadas en el cráneo animal.

ser fijada con pegamento y cemento dental al microdrive (ver panel central en Figura 3.2).

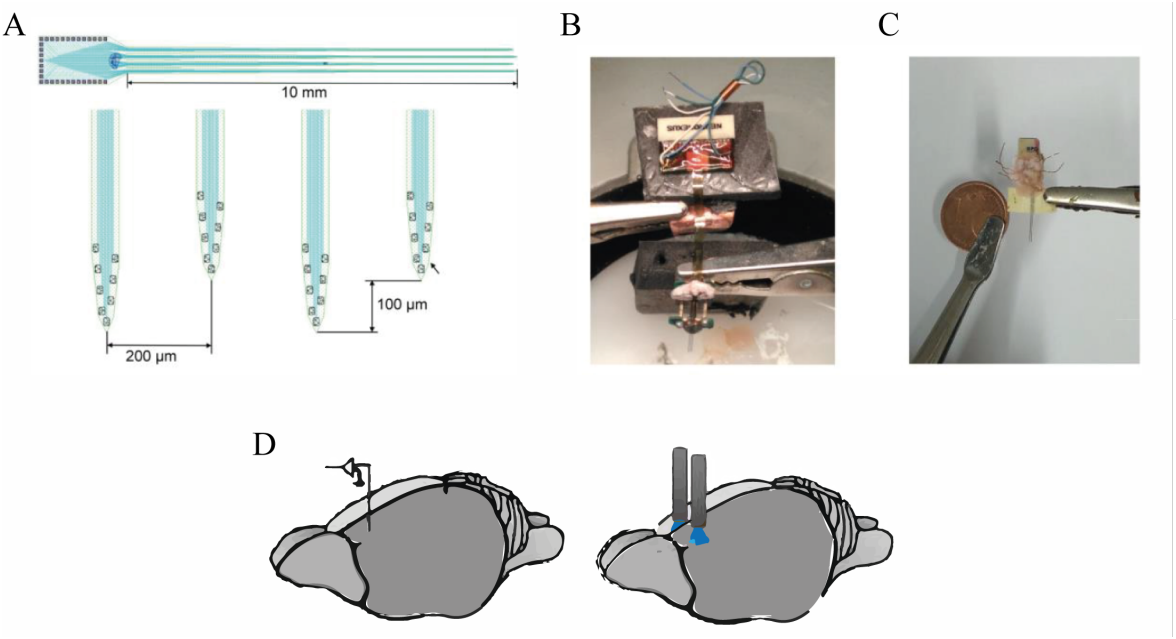


Figura 3.2 / ***Imágenes del diseño de electrodos para registros in vivo.*** **A.**Esquema de una silicon probe B32, modelo utilizado en este estudio, el panel inferior muestra las puntas de los 4 *shanks*, con la distribución de los canales (modificada de Neuronexus). **B.** Probe montada en un microdrive. **C.** Imagen de un wire array ensamblado (B y C son fotos del laboratorio de Dr. A. Ponomarenko) **D.** Esquema de implantes para registro y para estimulación optogenética sobre CPFm

.

Para la implantación de *silicon probes* solo se utilizaron aquellos animales con un peso superior a 26gr, para asegurar una rápida recuperación y no alterar el comportamiento. Mediante este procedimiento se implantaron 4 C57/BL6J con previa infección de melanopsin; 4C57/BL6J con previa infección de vector; 4 $GABA_B$flox y 4 $GABA_B$wt con GFAPCre bilateral. Todas las probes fueron implantadas en el hemisferio izquierdo en las coordenadas AP: 1.78; ML: 0.5; DV:1.3; de tal manera que se registro CPFm.

Se realizaron cuatro incisiones en el cráneo para 4 tornillos. Los cables de cobre se habían soldado previamente a los dos tornillos que irían sobre el cerebelo, de tal manera que se puedan usar respectivamente como tierra y referencia (Figura 3.1). Los músculos próximos a la zona del cráneo del cerebelo fueron cuidadosamente desplazados hacia los lados, para evitar artefactos musculares que podrían ser introducidos debido al movimiento en los registros. Cada uno de los tornillos se cubrió por completo con cemento dental generando un anillo (como el ya mencionado en la sección anterior) (Bender et al., 2018). Cuatro láminas de malla de cobre se fijaron al anillo de cemento por medio de pegamento y se añadió más

cemento dental. Esta malla protege el implante al mismo tiempo que sirve de aislamiento eléctrico. En el caso de los animales en los que se iba a realizar estimulación optogenética (4 melanopsin y 4 vectores) las 2 fibras implantadas quedaron incrustadas y cementadas en la malla dejando la parte del conector de la férula accesible [2]. Pasados de 5 a 7 días y asegurando que los animales estaban recuperados de esta primera parte de la operación y se mantenían en su peso, se colocaron de nuevo sobre el aparato estereotáxico. Una craneotomía algo más grande que la anchura de la silicon probe se realizó en las coordenadas AP: 1.78; ML: 0.5; DV:1.3; y la duramadre se quitó con cuidado, aplicado salino de manera continuada para evitar que el tejido se secase. La probe se colocó sobre las coordenadas por medio de referencias estereotáxicas y se introdujo en el tejido muy lentamente. Todo el tiempo bajo inspección visual mediante un microscopio binocular (Zeiss), para evitar que los *shanks* pudiesen doblarse y para evitar sangrados. De nuevo la mezcla de cera/parafina se aplicó en forma líquida sobre la craneotomía. Posteriormente los bordes del microdrive se cementaron al anillo y a la malla, teniendo precaución de dejar libre el tornillo central. Las láminas de malla se elevaron y soldaron entre sí, y al tornillo de tierra. El conector de la *silicon probe* se cementó a la malla, para dar así más estabilidad al implante. La tierra y la referencia de la probe fueron soldadas a sus respectivos tornillos.

3.3. Obtención de rodajas de cerebro

Los registros de imagen de Ca^{2+} y de electrofisiología *in vitro* se realizaron en rodajas de hipocampo o de CPFm. Para ello los ratones fueron decapitados y el cerebro se extrajo rápidamente y se colocó en líquido cefalorraquídeo artificial (LCA) previamente enfriado en hielo y burbujeado con carbógeno (95 % O2/5 % CO2). Se hicieron rodajas transversales de 350 μm con la ayuda de un vibrátomo Leica VT1200S (Leica, Alemania) y se incubaron a temperatura ambiente (22-24°C) en una cámara de registro de inmersión burbujeando permanentemente con carbógeno durante al menos 60 minutos en LCA antes de ser utilizadas (se muestran los pasos detallados en Figura 3.3). LCA (en mM): NaCl 124, KCl 2.69, KH2PO4 1.25, MgSO4 2, NaHCO3 26, CaCl2 2,y glucosa 10, (pH = 7.3).

Las células se visualizaron con los microscopios Olympus BX50WI o Nikon Eclipse FN1, ambos de epifluorescencia, con objetivos de inmersión en agua 10x y 40x y con con contraste

[2]La segunda fibra es un resguardo para el caso de que hubiese problemas con la primera, de este modo siempre esta asegurado un posible rescate experimental, dada la inversión que supone cada una de estas operaciones.

de interferencia diferencial (DIC).

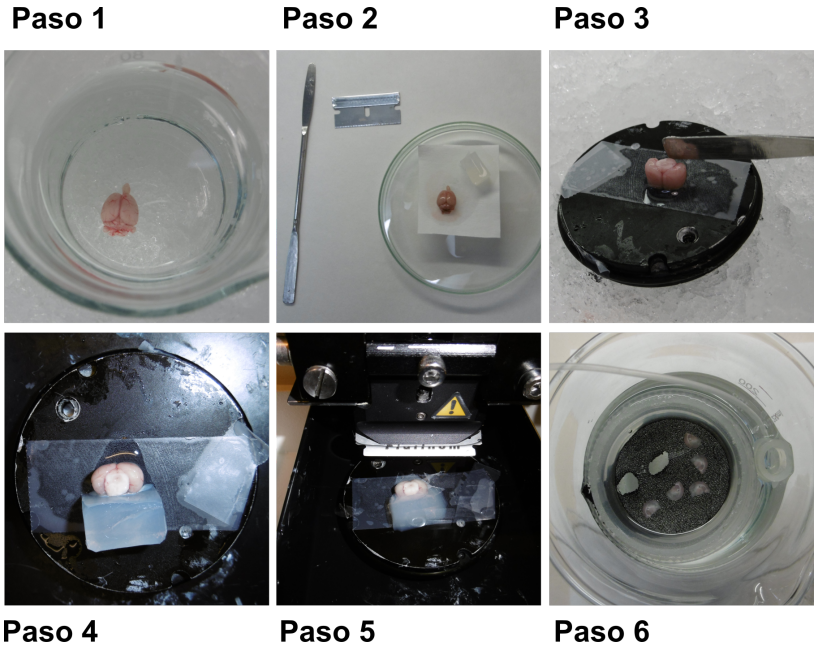


Figura 3.3 / ***Preparación de rodajas de cerebro.*** Imágenes de los diferentes pasos seguidos para obtener cortes de cerebro para registros electrofisiológicos. Paso 1: extracción del cerebro. Paso 2: corte la parte caudal / rostral del cerebro y fijación del cerebro a la placa base Paso 4, tope con bloque de gel de agarosa. Paso 5: se obtienen rodajas de 350 μm con el vibrátomo. Paso 6: incubar rodajas durante 1 hora a temperatura ambiente.

Para las rodajas de hipocampo de la primera parte de resultados (4.1) se añadió al LCA Picrotoxina (50 μM), un antagonista para los receptores GABAA y CGP55845 5μM, antagonista de los receptores $GABA_B$. De esta manera se aislaron y registraron las corrientes postsinápticas excitadoras (EPSCs, del inglés *Excitatory Postsinaptic Currents*).
Para los experimentos en rodajas de CPFm *in vitro* (4.2) se aislaron las corrientes postsinápticas inhibidoras (IPSCs, del inglés *Inhibitory Postsinaptic Currents*) se añadió al LCA, CNQX (20 μM) + AP5 (50 μM), antagonistas de receptores ionotrópicos de glutamato de tipo AMPA y NMDA respectivamente.

3.4. Imagen de calcio

Las variaciones de Ca^{2+} astrocitario se monitorizaron mediante la expresión en astrocitos de AAV2/5 Lck-GCaMP6f (Sección inyecciones virus 3.2.1) (Shigetomi et al., 2013). Lck-GCaMP6f mostró la naturaleza altamente ramificada de los astrocitos, marcando procesos finos, denominados microdominios, pero con menos eficacia para los procesos proximales y el

soma celular (Haustein et al., 2014; Poskanzer and Yuste, 2016). Lck-GCamP6f actúa como un sensor de calcio dirigido genéticamente de forma específica a los procesos, permitiendo registrar eventos de calcio en partes previamente inaccesibles de los astrocitos, incluyendo los procesos mas finos (Shigetomi et al., 2012). Para ello el sensor de calcio genéticamente codificado se encuentra modificado uniendo un dominio de anclaje a membrana, de este modo aumentando su expresión en la membrana plasmática diez veces en comparación a la expresión convencional (Shigetomi et al., 2010).

De esta forma el análisis de los eventos de Ca_{2+} se centró principalmente en los microdominios (Agarwal et al., 2017; Mariotti et al., 2018; Srinivasan et al., 2015). Las imágenes fueron adquiridas con un láser de dos fotones (AxioImager M, LSM510, Zeiss Oberkochen, Germany), equipado con láser pulsado rojo de 900nm (1.80W, 1 % of power) (Spectra Physics Mai-Tai, Prairie Technologies, USA), que se utilizó para la excitación del Lck-GCaMP6f. La señal de mCherry (reportero de la coexpresión de melanopsin o ChR2) se adquirió con un láser en modo confocal a 543 nm por medio de HeNe láser. La toma de imágenes se realizó a través de un objetivo de inmersión en agua con una lente 40x/1.0 W Plan-Apochromat (Zeiss), con un campo de 354 x 354 μm (en el caso de imágenes en las que se detectó la colocalización), y 295 x 295 μm para la adquisición de imágenes a 1Hz. Las sesiones fueron de 250-420 imágenes. Para la estimulación de las opsinas se utilizó un láser externo con el que se aplicaron pulsos de luz de 1, 5, 10, 20s o un protocolo de baja estimulación (LFS; 5 s @ 0.06 Hz, 1 min) (= 473 nm) (para más detalles ver protocolos de estimulación optogenética Sección Métodos 3.6). El LCA se perfundió de manera continuada con tetrodotoxina (TTX;1 μM), utilizada para bloquear los canales de Na^+ y de este modo posibles efectos de activación de células vecinas.

En un conjunto de experimentos de la primera parte de resultados (4.1) como los experimentos de Ca^{2+} relativos a rodajas de CPFm (4.2), se utilizó cyto-GCaMP6f para visualizar las señales de Ca^{2+} en los procesos proximales y el soma de los astrocitos utilizando los parámetros de adquisición indicados anteriormente.

Se testó mediante experimentos de imagen de Ca^{2+} en astrocitos la eficacia del GDPβS (ver Figura 3.4). Se aplicaron pulsos locales del agonista de los mGluR1, DHPG (1 mM, 5s), previamente y después del llenado de los astrocitos con GDPβS (20 mM). Los experimentos se realizaron en presencia de TTX (1μM) y PPADS (30μM), un antagonista no selectivo de

receptores purinérgicos P2 (ver Figura 3.4). La adquisición de estos últimos y de los vídeos de Ca $^{2+}$ de CPFm se realizaron con objetivo 40X y con una cámara Nikon Eclipse.

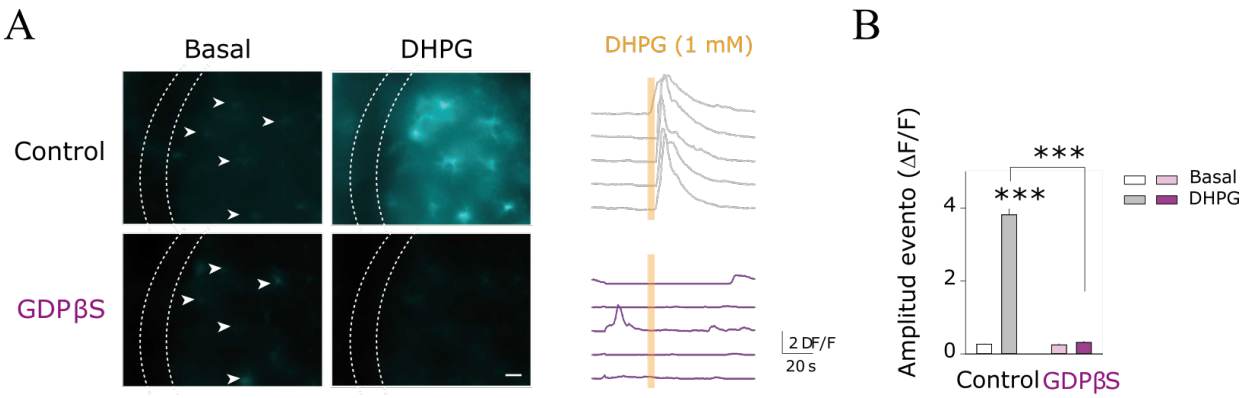


Figura 3.4 / ***GDPβS bloquea de manera eficaz la red astrocitaria.*** **A.** Izq, imagen de epifluorescencia de astrocitos que expresan cyto-GCaMP6 en el área CA1 antes y después de la aplicación local DHPG (1 mM), en control y después de la carga de GDPβS intracelular (20 mM) a través de la pipeta de registro. Derecha: trazos representativas de Ca2 + a la estimulación DHPG antes y después de la carga de la red astrocitaria con GDPβS. **B.** Promedio de la amplitud del evento de Ca2 + evocado por DHPG en el control (n = 148 somas, dos ratones) y después del llenado astrocitario cargado con GDPβS (n = 166 somas, 2 ratones). *** p <0,001; one-way ANOVA , comparación post hoc Dunn's. Los datos se muestran como media ± SEM.

3.5. Electrofisiología

3.5.1. Electrofisiología *in vitro*

Se realizaron registros electrofisiológicos de neuronas piramidales de CA1 en hipocampo para los experimentos relativos a la primera parte de resultados[3]). Se realizaron registros de neuronas principales glutamatérgicas (identificadas por medio de la expresión de CamKII) y de interneuronas PV+ (identificadas en el ratón PVCre/TDxTom) en capas 2/3 de CPFm (relativos a la segunda parte de resultados 4.2). En todos estos casos mediante la técnica de patch-clamp en la configuración de célula entera (traducción del inglés *whole cell*), en la mayoría de los casos en la modalidad de fijación de voltaje. Las pipetas de registro se fabricaron a partir de capilares de borosilicato con filamento interno (OD-ID: 1.5-0.86 mm; Sutter Instrument Co., EE.UU.), con una resistencia de 3-5 MΩ y se llenaron con una solución intracelular que contenía (en mM):KGluconate 135, KCl 10, HEPES 10, MgCl2 1, ATP-Na2 2, ajustado con KOH a pH 7.3 para el caso de los registros de EPSCs; (en mM): 140 mM

[3]Los registros de whole-cell de la primera parte de resultados fueron realizados junto con Alicia Hernández-Vivanco.

K-MeSO4, 10 mM Hepes-K, and 10 mM KCl para el caso de los registros de IPSCs; (en mM): metasulfonato de potasio 100, KCl 50, HEPES-K 10, ATP-Na2 2 empleando capilares de 4-9 MΩ de resistencia para los registros de astrocitos.

Para los experimentos en los que se estudiaban las corrientes lentas de entrada (definidas como SICs, del inglés *Slow Inward Currents* [4]), en neuronas próximas a astrocitos estimulados se trató de optimizar la activación de NMDARs mediante la utilización de LCA libre de Mg2+ junto con TTX (1 μm). En cada caso concreto los fármacos fueron aplicados en el baño mediante perfusión continuada durante al menos 15 minutos previos a los registros. Tanto para las SICs como para los eventos espontáneos en miniatura se realizó una discriminación en función de sus constantes de aumento y caída (Perea and Araque, 2005b; Shigetomi et al., 2008).

Para los experimentos en los que se llenó la red astrocitaria la solución intracelular contenía GDPβS (20 mM) o Evans Blue(5 μm) o BAPTA (40 mM) y biocitina (0,1 %) se registraron los astrocitos dando pulsos de corriente a intervalos de 30 segundos durante al menos 20-30 min. Posteriormente las rodajas se fijaron y la biocitina se reveló mediante Alexa488-estreptavidina, mostrando la extensa área cubierta por la carga de biocitina intracelular y confirmando el llenado de la red astrocitaria (Navarrete et al., 2012; Serrano et al., 2006).

Los registros se obtuvieron con amplificadores PC-ONE (Dagan Instruments, EE.UU.). Las capacitancias rápida y lenta de la membrana celular fueron neutralizadas y la resistencia en serie fue compensada (alrededor de 50 %). El potencial de membrana de las células se mantuvo a -70 mV. Las resistencias en serie y de acceso fueron monitorizadas a lo largo de los experimentos aplicando un pulso de voltaje de -5 mV durante 5 ms (aquellos registros en los que varió la resistencia de acceso por encima de un 20 % fueron descartados).

Las señales fueron filtradas a 1 KHz y transferidas con una frecuencia de muestreo de 10 KHz a un ordenador a través de una tarjeta de conversión analógico-digital (DigiData 1440, Axon Instruments, EE.UU.). Las señales obtenidas fueron filtradas con un HumBug (Quest Scientific Instruments Inc., Canadá) para eliminar el ruido eléctrico proveniente de

[4]Estas corrientes son debidas a la activación de receptores ionotrópicos de glutamato e indicaban que los astrocitos pueden modular la excitabilidad eléctrica neuronal (Perea and Araque, 2005b; Shigetomi et al., 2008; D'Ascenzo et al., 2007; Fellin et al., 2004; Gómez-Gonzalo et al., 2018; Kovács and Pál, 2017).

la corriente alterna (50-60Hz). El sofware pCALMP 10.2 (Molecular Devices) se utilizó para la visualización, adquisición y almacenaje de los datos.

Se utilizaron diversos protocolos de estimulación, en ocasiones combinados entre si:
(i) Estimulación masiva o (*bulk*): Las respuestas sinápticas fueron evocadas mediante capilares septados (2–5 μm de diametro en el extremo) rellenados con LCA, y posicionados en el stratum radiatum para estimular las fibras colaterales (CA3 que establecen sinapsis con CA1); o en capa 2/3 de CPFm para estimular las terminales inhibitorias locales. Se utilizaron pulsos pareados (250 ms duración, con un intervalo de 75 ms) con una frecuencia de 0.33Hz mediante el uso de un estimulador S-900 (Dagan Corporation).
Previamente a la ejecución de cualquier otro protocolo de estimulación se registro la actividad sináptica basal durante 5-10 minutos hasta asegurar que esta era estable.
(ii) Estimulación optogenética de astrocitos: la estimulación completa del campo se consiguió por medio de un láser azul con control de intensidad (473 nm, MBL-III-473, OptoEngine, LLC) acoplado por medio de un terminal SMA a una fibra de 200 μm (ThorLabs). En algunos experimentos la estimulación se realizó por medio de la salida de luz azul a través del objetivo del microscopio de epifluorescencia. No se encontraron diferencias en la estimulación continua o por trenes de luz (7 mW/mm2) a 10 Hz (pulsos de 50 ms) de forma que los datos se incluyeron juntos para análisis posteriores. Se comprobó como variaciones en la intensidad de la luz afectaban a los astrocitos (ver Figura 3.5). Durante el resto de los experimentos en rodajas, se utilizó como intensidad de láser 7 mW/mm2 indistintamente para Melanopsin, ChR2 o vector.

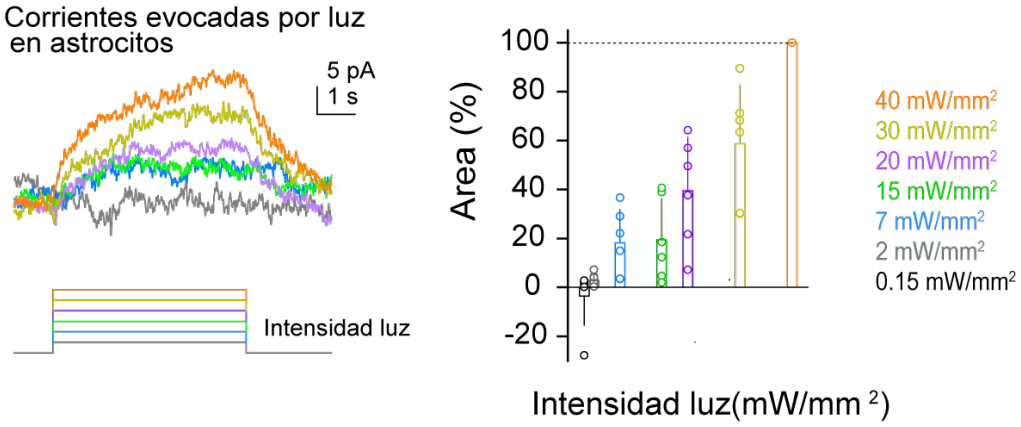


Figura 3.5 / ***Intensidades de estimulación con luz en astrocitos.*** Izq, trazos representativos de la corriente evocada por la luz con pulsos de 5s a intensidades crecientes. Drech, cambios relativos del área de la corriente evocada por la luz a la estimulación con respecto a la intensidad máxima (40 mW/mm2) (n = 6 astrocitos). Los datos se muestran como media ± SEM.

(iii) Estimulación de interneuronas PV+: se registraron interneuronas de capa 2/3 de CPFm marcadas en rojo (PVCreXTDTom) visualizadas a través de la cámara CDC. Durante el tren de despolarizaciones las interneuronas se registraron en el modo de fijación de corriente y se generaron disparos de PAs mediante pulsos despolarizantes aplicados a 50 Hz a 6 Hz. Estos protocolos que denominamos theta-gamma, se aplicaron debido a las interneuronas durante un rango de 5s a 30s para estudiar como patrones temporales de la actividad de las células PV+ controlan dinámicamente el tono sináptico inhibitorio en las PC.
Previa- y posteriormente a estas despolarizaciones en la interneurona, la transmisión sináptica fue monitorizada en la neurona piramidal a 0.33 Hz. Para determinar los cambios sinápticos cuando se aplicó el tren de despolarizaciones sobre la interneurona se compararon las respuestas sinápticas registradas previas al estímulo, con las registradas durante los minutos siguientes a la finalización del estímulo.

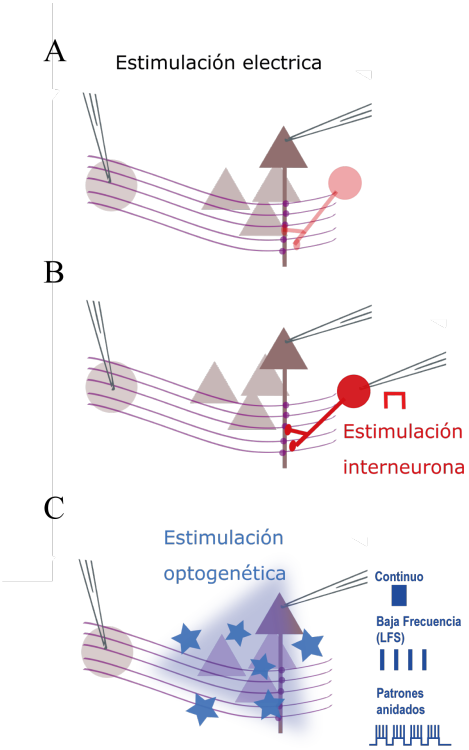


Figura 3.6 / *Protocolos de estimulación.* Esquema de posibilidades de estimulación mediante. **A.** Estimulación eléctrica de tipo Bulk. **B.** Despolarización de interneuronas y estudio de la transmisión sináptica basal en una célula vecina que se este registrando simultáneamente. **C.** Aplicación de luz de diferentes posibilidades de protocolo a los astrocitos.

Además, para comprobar que los efectos observados eran mantenidos cuando la despolarización se realizaba sobre más de una interneurona del campo se expresó en ratones PVCre la opsina ChR2-dio (ver sección 3.2.1 de Métodos) de tal modo que ChR2 se expresaba sobre neuronas PV+ que pudieron ser conjuntamente despolarizadas siguiendo el mismo protocolo mediante el uso de un láser (473 nm, MBL-III-473, OptoEngine, LLC) (Figura 3.6).

3.5.2. Electrofisiología *in vivo*

El desarrollo de diversas tecnologías en las ultimas décadas ha dado lugar a múltiples métodos de registro que permiten la obtención de señales eléctricas del cerebro *in vivo* con una alta resolución temporal.

Los electrodos se conectaron a un sistema de adquisición de 128 canales (Digital Lynx, Neuralynx, USA) previo paso por amplificador (HS-8, Neuralynx, Bozeman, Montana USA). Las señales se adquirieron de manera continua a 32kHz (Digital Lynx, Neuralynx) y fueron amplificadas, y filtradas (1 Hz-10 kHz). Los tiempos de la señal y los pulsos de láser (cuando los registros presentaban estimulación optogenética) se registraron simultáneamente, para evitar el desfase temporal. Un diodo con emisión de luz se encontraba fijado al sistema de adquisición en la cabeza del animal registrado, para tener monitorizada la actividad del ratón durante los registros (25 Hz).

LFP se obtuvo por medio de filtrado pasa-bajos y un reducción en la frecuencia de muestreo de la señal a 1250 HZ (Wulff et al., 2009), y se analizó por medio de Matlab Sofware (ver sección análisis 3.8.1). Las neuronas unitarias o *spikes* se detectaron en la señal filtrada (0.8 Hz-5 kHz) y se extrajeron por medio de uso de un umbral (Sección Análisis 3.8.1).

Los registros se realizaron diariamente entre las 7am y las 4pm durante 2-4 semanas mientras los animales realizaban el test comportamental T-maze o Open Field (métodos sección 3.7).

Para la estimulación optogenética se utilizaron cables de fibra óptica de 1.5 a 3 m de longitud (Thorlabs), que permitiesen la libre movilidad de los animales en la arena comportamental. Los cables se conectaron a las fibras ópticas previamente implantadas (ver sección 3.2.2), por medio de un conector de circonio (Precision Fiber Products/ Thorlabs). Para la estimulación optogenética el cable óptico se conectaba en el extremo opuesto con un láser 473 nm (F471005FX, Laserglow Technologies) por medio de un adaptador FC/PC. La salida del láser para los protocolos de estimulación se controlo por medio de un generador de pulsos (Multichannel systems, STG 4004). En todos los casos la intensidad de salida del láser se midió previamente a ser conectado a los animales implantados por medio de un luminometro (PM100D, Thorlabs), asegurando una media de 10-25 mW. Este procedimiento de estimulación fue el mismo para los animales que realizaron paradigmas comportamenta-

les en ausencia de registros electrofisiológicos. Para la estimulación optogenética bilateral, en animales GbWT/GbKO con GFAPCre y Melanopsin bilaterales en CPFm, se utilizó un cable de fibra multimodal (FCMM50-50A-FC, Thorlabs).

3.6. Técnicas inmunohistológicas

Posteriormente a la realización de los experimentos se realizaron análisis histológicos para verificar la expresión de los vectores virales y/o confirmar la posición de los electrodos de registro. Se eutanasió a los animales con pentobarbital y posteriormente fueron perfundidos con PBS frío, seguido de paraformaldehido 4 % (PFA) (Santa Cruz Biotechnology), y decapitados. Se extrajo el cerebro y se dejó en PFA durante la noche para su completa fijación a 4ºC. Se realizaron secciones coronales de 50 μm con un vibratomo VT1000S (Leica). Se montaron Vectashield antifading mounting medium (Vector laboratories); o alternativamente se siguieron pasos para su marcaje histológico.

Las muestras en las que se realizaron marcajes histológicos posteriores se bloquearon a temperatura ambiente durante 1.5 horas en una solución de 0.3 % Triton X-100 y 5 % NGS en PBS. Después del bloqueo se incubaron durante la noche a 4ºC con los anticuerpos correspondientes (ver Tabla 3.1).

Anticuerpo	Dilución	Proteína marcada	Referencia
mouse anti-GFAP	1:500	astrocitos	Sigma,RRID:AB477010
rabbit anti-NeuN	1:500	neuronas	Millipore,RRID:AB2571567
rabbit anti-S100	1:100	astrocitos	Abcam,RRID:AB306716
rabbit anti-Iba1	1:500	microglia	Wako,RRID:AB839504
mouse anti-Cre	1:500	Cre-recombinase	Millipore, RRID: AB3120
mouse anti-GABAB	1:500	GABABR	Abcam, RRID: AB2256

Tabla 3.1: Anticuerpo primarios.

Posteriormente a 3 lavados de 15 minutos con PBS, las secciones fueron incubadas con anticuerpos conjugados a Alexa: Alexa Fluor 488 Goat anti-mouse (1:200, Bioss Inc, RRID:AB10892893) Pacific Blue Goat anti-rabbit (1:200, Thermo Fisher Scientific, RRID: AB2539814) Alexa Fluor 647 Goat anti-rabbit (1:200, Thermo Fisher Scientific, RRID: AB2535813) Alexa Fluor 488 Goat anti-rabbit (1:200, Thermo Fisher Scientific, RRID:

AB143165) and Alexa Fluor 405 Goat anti-rabbit (1:200, Thermo Fisher Scientific RRID: AB10680407), en una solución 0.3 % Triton X-100 y 1 % NGS durante 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente se lavaron y montaron con Vectashield antifading mounting medium (Vector laboratories).

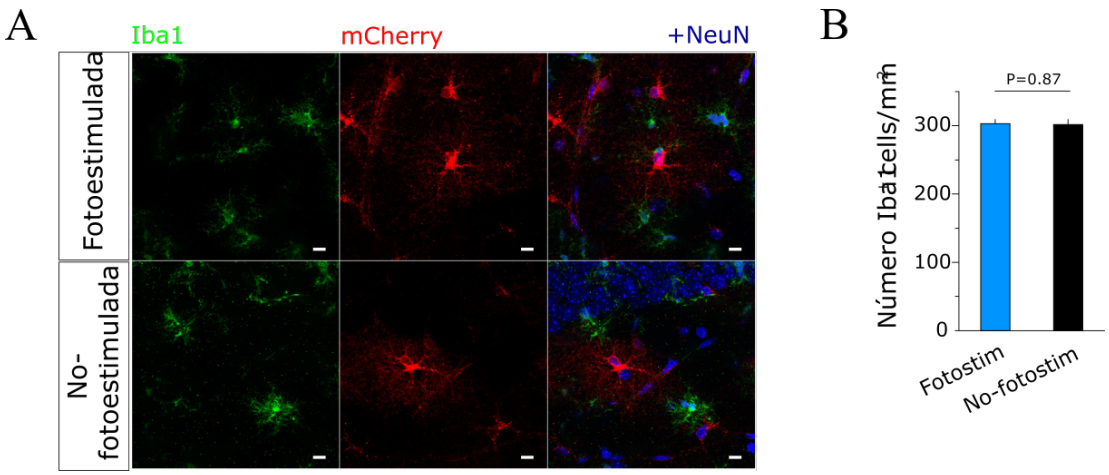


Figura 3.7 / ***La estimulación con láser no generan reactividad y daño tisular.*** **A.**Imágenes ampliadas de rodajas fotoestimulados (sup) y no fotoestimulados (inf) que no muestran cambios significativos en la morfología de las células Iba1 + ubicadas en el área transfectada. Barra de escala, 10 μm. **B.** Número promedio Iba1+/ área después del estímulo de luz para secciones fotoestimulados (barra azul, 303.33 ± 5.98 células / mm2, n=10 campos, 2 rodajas, 2 ratones) y no fotoestimulados (barra negra, 301.82 ± 7.82 células / mm2, n = 11 campos, 2 rodajas, 2 ratones). T-test no pareado; P= 0,87. Datos se muestran como media ± SEM.

Para estudiar la potencial microgliosis que podría tener lugar en las rodajas agudas debido a la estimulación, secciones de 350μm se iluminaron durante 20s con el láser (473 nm) o se mantuvieron en la oscuridad durante el mismo tiempo. Se fijaron mediante 4 % paraformaldehido (15 min) tras lo que se bloquearon e incubaron (24h; 4°C) con rabbit anti-Iba1 (1:500, Wako, RRID:AB839504) (Figura 3.7).

3.7. Paradigmas comportamentales

En los 4 a 6 días previos a cualquiera de los test realizados los animales fueron manipulados durante unos 10-20 minutos, de forma que se habituaran a los diferentes procedimientos entre los que se engloban: ser cogidos de la caja, ensamblaje de fibras ópticas o del equipo de registro, vuelta a la caja. Favoreciendo así que los animales no se encontrasen estresados cuando iban a realizar los test comportamentales.

3.7.1. Laberinto en T

En la tarea del laberinto en T (en inglés *T-maze*) se evalúa un paradigma cognitivo de alternancia, en el que con el paso de los días mejora la realización de la tarea en base al aprendizaje que supone estabilidad en la toma elección correcta que implica recompensa. Los animales se situaron al comienzo del brazo de la T (brazo de inicio, 46x11x10 cm). Cada ensayo consiste en el recorrido del brazo de inicio hasta la llegada a los brazos de elección (80x11x10 cm), ver Figura 3.8. Cada sesión consiste en 10 repeticiones de: un ensayo muestra (durante la cual uno de los brazos de la T se encuentra cerrado), de forma que los ratones solo pueden explorar el brazo seleccionado donde se coloca la recompensa. Seguidamente el animal se coloca de nuevo al inicio del brazo de la T (20s después de haber recibido la recompensa), para realizar un ensayo de test durante la cual ambos brazos estarán abiertos y el animal deberá elegir entre visitar el brazo previamente explorado (error, no recompensa) o el brazo no visitado con anterioridad (acierto, recompensa). La recompensa consistió en una gota de agua o de leche condensada, respectivamente en animales con deprivación (en las 6 horas previas al test) de agua o comida. Los 10 ensayos se realizaron seguidos para cada animal, con un intervalo entre cada uno de 5 minutos. En total los animales realizaron 60 ensayos (10 pruebas al día).

En aquellos casos en los que los animales estaban implantados con silicon probes se continuaron sesiones durante 1-3 semanas adicionales que se denominaron de rellamada (o sesiones post aprendizaje), con el fin de conseguir registrar mas *spikes* para cada uno de los animales implantados.

3.7.2. Tareas de reconocimiento de objetos

(i)Localización de objetos nuevos (NOL, del inglés *Novel object location*) se utilizó para evaluar el procesamiento cognitivo, se trata de un test habitual utilizado en tareas con implicación del hipocampo (Resultados 4.1). El test de memoria consistió en 3 fases: habituación, fase de muestra y fase de test. Los ratones (6-8 semanas) se habituaron primero a la arena vacía (L,A,A:50 x 40 x 40 cm) durante 30 minutos. Al día siguiente, se realizó una exposición a los objetos (muestra) mediante el posicionamiento del ratón en la caja con los objetos durante 10 min. Después de un periodo de retención de 30 min se volvió a poner al animal en la caja, listo para la fase de test. La fase de test consistió en el cambio en la localización de uno de los objetos (objeto considerado nuevo). Se calculó un índice de reconocimiento

en base a tiempo explorando el nuevo objeto dividido entre el total de tiempo explorando. El comportamiento de los animales se calificó de forma ciega a la condición experimental. Estos experimentos se realizaron aplicando un protocolo optogenético que consistía en LFS: 5 s luz encendida 10 s luz apagada durante 3 minutos en la fase de muestra, sobre animales con expresión de melanopsin o vector en astrocitos de hipocampo.

(ii)Identificación de objetos en espacio o localización de objetos, (OIP, del inglés *Object in place*) se utilizó para evaluar el rendimiento en relación con la memoria de trabajo para reconocimiento de objetos. Requiere de una asociación entre el objeto y su localización (Gaffan and Parker, 1996; Dix and Aggleton, 1999), de manera que subyacen mecanismos mediados por CPFm.

Durante la fase de muestra del procedimiento, los ratones se expusieron a 4 objetos diferentes de los que tienen que fijar su disposición espacial en el entorno, en la misma arena mencionada para NOL. Cada ensayo consiste en fase de muestra (5 min), a continuación, uno de los objetos se intercambia de lugar con otro, tras lo que pasado un descanso (5 min) los ratones son expuestos en la fase de test al nuevo contexto (3 min). Estos experimentos se realizaron sobre animales GABABflox con expresión bilateral en CPFm de GFAPCre (de ahora en adelante GbKO) como en animales que expresaban melanopsin o vector en CPFm. Para estos últimos se aplicó el protocolo de estimulación optogenética Theta-gamma (ver secciones 1.2.2 para optogenética y 3.8 en referencia a la arena utilizada).

3.7.3. Campo abierto

El Campo abierto (como se conoce del inglés *open field*) se trata de una arena cuadrada en color oscuro (30x22x22 cm) que replica la que se usa para la estabulación de los animales. Se utilizó para estudiar como los animales exploraban libremente.

3.7.4. Laberinto en cruz elevado

Test laberinto + elevado (del inglés *Elevated plus maze*) se trata de una arena con la forma de un signo '+' que está elevado 1 metro sobre el suelo. Presenta 2 brazos abiertos y 2 brazos cerrados, opuestos entre sí. Cada brazo tiene 30x10x5 cm de dimensión. Al comienzo del experimento el animal se coloca en el centro, punto de cruce entre los 4 brazos. Cada test dura 5 minutos y se evalúa el tiempo y las veces que el animal visita los brazos abiertos

(correlacionando con niveles de estrés/ansiedad no elevados) y las veces que visita y tiempo que se sitúa en los brazos cerrados. En esta situación se evalúa el estrés de los animales puesto que se encuentran expuestos a un conflicto relacionado con su búsqueda de novedad frente a la ansiedad de visitar un brazo abierto.

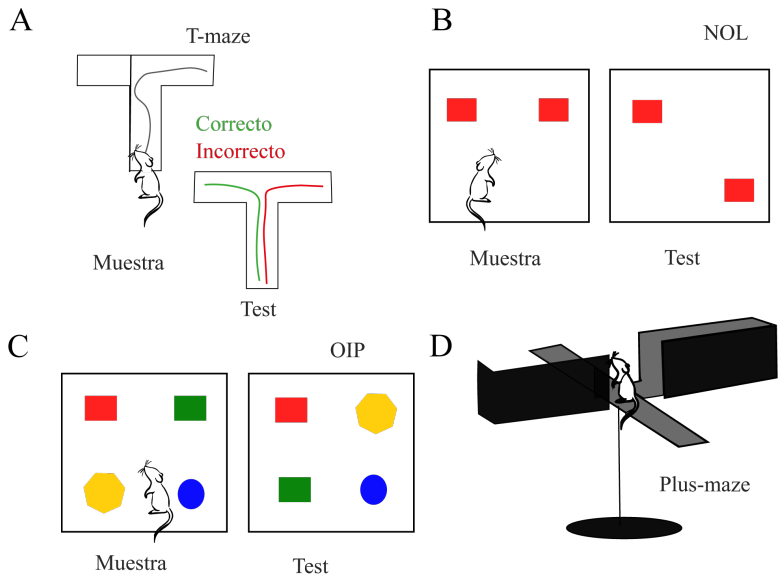


Figura 3.8 / *Esquema de pruebas comportamentales.* **A.** T-maze.**B.** NOL. **C.** OIP. **D.** Elevated Plus Maze

3.7.5. Seguimiento de la posición

Para seguir la posición de los ratones en las diferentes arenas de experimentación se utilizó el sofware Ethovision V11, en aquellos animales en los que exclusivamente el comportamiento con estimulación optogenética era evaluado. Para los animales en los que se evaluó el comportamiento al mismo tiempo que se realizaban registros electrofisiológicos se dispuso de un diodo colocado sobre la cabeza del animal fijado al sistema de registro, posteriormente se analizaron las posiciones de la luz emitida por el diodo con el uso de NDManager.

Las posiciones se adquirieron para X e Y y fueron y fueron suavizadas con un filtro Gaussian Kernel (SD6) en ventanas de 1 segundo para omitir el ruido generado por variaciones pequeñas en la posición de la cabeza, y que no implicaran movimientos del animal sobre el espacio.

3.8. Análisis de datos

En caso de que se especifique otro Sofware concreto los análisis se realizaron utilizando rutinas escritas ad hoc para MATLAB (MathWorks), o bien adaptando alguna de las descritas en (Carus-Cadavieco et al., 2017) o de Wiki- buzcode `https://github.com/buzsakilab/buzcode`.

3.8.1. Análisis de señales de calcio

Posteriormente a la adquisición de las imágenes de calcio se corrigieron los conjuntos adquiridos para evitar pequeñas variaciones que pudiesen surgir por movimientos en el plano XY utilizando TurboReg (plugin del programa ImageJ).

Para el análisis de los regiones de interés (ROIs) de Ca^{2+} correspondientes a la primera sección de resultados (4.1) con expresión de GCamp6f y mCherry se procedió como se detalla a continuación. La detección de ROIs se realizó mediante GECIquant de manera semi-automática (plugin de ImageJ, (Srinivasan et al., 2015)). El tamaño medio de los ROIs fue de 11.06 ± 0.024 μm2. Se identificaron y marcaron de manera separada aquellas regiones correspondientes al soma y a los microdominios. Sobre los ROIs seleccionados se calculó la fluorescencia (F). Todos los píxeles dentro de cada ROI se promediaron para dar un solo valor para cada tiempo F(t). Para comparar los cambios relativos en la fluorescencia entre diferentes ROI, la señal de Ca^{2+} se analizó como δF/F0 =(F(t)-F0)/(F0), a partir de ahora denominado δF/F0. F0 es el basal de fluorescencia de cada ROI y se definió como la fluorescencia mínima promedio en ventanas pre-estímulo. Los ROIs sin cambios en la señal de Ca^{2+} durante todo el registro (señales por encima de 2 SD de la línea base) se descartaron (supusieron del total: 14.67 % para melanopsin, 19.34 % para ChR2, y 21.15 % para astrocitos transfectados con vector; P = 0.701; One-Way ANOVA, post-hoc Dunn's test). En el caso de los ratones Ip3r2$^{-/-}$ infectados con melanopsin un 51.82 % de los astrocitos fueron descartados (astrocitos-wt vs astrocitos-Ip3r2$^{-/-}$, P=0.012; One-Way ANOVA, post-hoc Dunn's test), acorde a otros datos reportados (Agarwal et al., 2017; Srinivasan et al., 2015).

Un evento de Ca^{2+} se definió como una señal que mostrase valores máximos por encima de 2 veces la SD de los valores mínimos dentro del marco pre-estimulación, y para aquellos eventos que aparecían a su vez sobre otro evento, valores máximos de 1.5 veces la SD de la señal previa. Aquellos eventos con una duración <de 2 imágenes se excluyeron por ser dema-

siado cortos y poder tratarse de ruido, dado que la señal de Ca^{2+} es considerada más lenta. Para cada uno de los ROIs se analizaron los parámetros: frecuencia de eventos, amplitud, duración y momento de inicio de la respuesta. El punto de inicio se definió como: el último en el cual $\delta F/F$ se encontraba por debajo de 1 SD previamente a que un evento ocurriese. La duración de los eventos se definió como la mitad de la prominencia de cada pico sobre la linea basal, (consultar definición de ROIs en Figura 3.9).

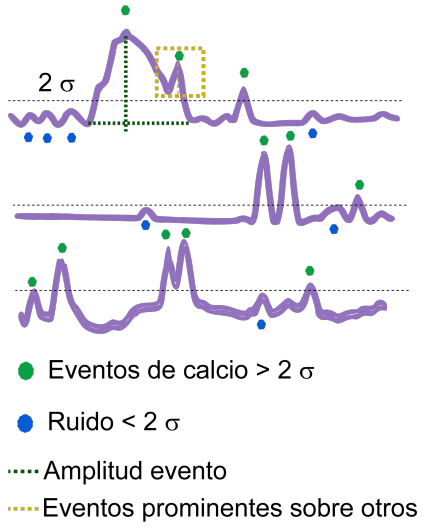


Figura 3.9 / *Definición de eventos de calcio en regiones de interés.* Ejemplos trazos de dF/F0 a lo largo del tiempo de un proceso con GCaMP6f. Los puntos verdes indican eventos de Ca^{2+} que se detectaron mediante un procedimiento que se ilustra en el panel de la línea de puntos y descritas en detalle en los Métodos. La línea de puntos verde representa el umbral de 2 SD de trazo de la línea de base. Se consideraron significativos sólo los máximos locales que cruzaron este umbral.

Se definieron aquellos ROIs que respondían a la estimulación optogenética selectiva como los que mostraron al menos 1 evento de Ca^{2+} en los primeros 20s tras el pulso de luz (se denominaron *'responding'*). Todos los eventos de calcio se sometieron a una inspección visual para evitar aquellos que pudiesen ser principalmente ruido o artefactos. Dada la heterogeneidad de las respuestas encontrada en la amplitud de los eventos, se realizó una segmentación en 3 grupos con el fin de poder estudiar en más detalle variaciones en la amplitud, esta segmentación se realizó mediante el código k-means de Matlab (de forma que los datos se subdividieron en 3 grupos mutuamente excluyentes) sobre aquellos ROIs que se habían denominado previamente 'activos' *'active'*, que implicaban un evento de calcio 60s tras el pulso de luz (72.96 % para melanopsin, y 58.22 % para ChR2). Las imágenes que durante la adquisición presentaron artefactos fueron retiradas del análisis.

3.8.2. Análisis de datos de electrofisiología *in vitro*

Los análisis de las células en configuración de célula entera (o *whole-cell*) se realizaron mediante el sofware pClamp10 (Molecular Devices).

En el caso de los datos relativos a la primera sección de resultados las respuestas electrofisiológicas de las neuronas fueron promediadas en puntos de 1 minuto. Las magnitudes de los cambios de los EPSCs fueron expresadas como la proporción (%) de la amplitud respecto a la línea base control. Aquellas neuronas que mostraron un z-score>2 veces la SD de la linea base en cuanto a la amplitud del EPSC (pA) se consideraron como células que respondían a la luz.

Sobre las células consideredas con respuesta se estudiaron además las modificaciones en el coeficiente de variación (CV) del EPSC, tanto para aquellas rodajas que presentaban astrocitos infectados con ChR2 o melanopsin. $CVNF = \sqrt{(SD\ EPSC2SD\ noise2}/m$; donde SD EPSC2 y SD noise2 son la variancia del pico del EPSC y del basal, respectivamente y m es la media de la amplitud del pico. El ratio del CV se obtuvo para cada neurona en control y después de la luz (CV post-protocolo de inducción/CV control (Clements, 1990; Fernández de Sevilla et al., 2002) se representaron gráficas en las que se compara la variación en la amplitud del EPSC normalizado frente al CV para cada célula. Este tipo de medida es comúnmente utilizada para detectar cambios presinápticos en la liberación de Nts (Faber and Kornt). En el caso de aquellas rodajas no infectadas, con vector o animales Ip3r2$^{-/-}$ transfectados con melanopsin el CV se analizó para todas las neuronas registradas [5].
Se monitorizaron los cambios en la corriente mediante el análisis del índice *holding*: donde i es el valor en un tiempo dado y b es el valor durante los minutos de registro basal.

$$HC_{index} = \frac{HC(i) - HC(b)}{|HC(i) + HC(b)|} \tag{3.1}$$

En el caso de los datos pertenecientes a la segunda sección de resultados (4.2) el análisis de los IPSCs se realizó acorde al mismo procedimiento explicado, agrupando los eventos en promedios de 30s.

3.8.3. Análisis de datos de electrofisiología *in vivo*

Los cambios en las corrientes transmembrana como resultado de la actividad celular suponen la generación de campos eléctricos. Estos cambios o eventos que tienen lugar en el cerebro pueden ser explorados mediante el uso de electrodos de metal o vidrio, o por medio de sondas (*probes*) multi-canal (las utilizadas en la realización de esta tesis doctoral (NeuroNexus)) para registrar el potencial de campo. El LFP tiene su origen en las corrientes de

[5] El CV es una medida de análisis de las respuestas sinápticas que permite la identificación de los eventos pre y postsinápticos subyacentes a la plasticidad sináptica (Martin, 1966; McLachlan, 1978; Faber and Kornt).

las membranas celulares fluyendo a través del tejido entre un electrodo de registro y un electrodo de referencia. En consecuencia, el LFP es la superposición lineal de todos los procesos iónicos de una región determinada: actividad sináptica, potenciales de acción (Schomburg et al., 2012), espigas de calcio, corrientes intrínsecas (Llinas, 1988). Las características del LFP dependen de la contribución temporal de dichos procesos iónicos, la localización de los electrodos de registro y la geometría del tejido cerebral (revisado en (Buzsáki et al., 2012)).

Uno de los mayores avances que aportan las técnicas de registro extracelular de campo es que a diferencia de otros métodos utilizados para investigar la actividad de las redes cerebrales, las propiedades biofísicas que subyacen esta técnica son bien conocidas (Buzsáki et al., 2012). Esto ha permitido hacer lecturas realistas de cómo las corrientes transmembrana dan lugar al potencial eléctrico registrado. El registro del LFP aporta información relevante para entender cómo los ritmos cerebrales coordinan los grupos neuronales en las estructuras del cerebro y pueden aportar información no solo de los mecanismos que subyacen el comportamiento fisiológico, sino de los que llevan a situaciones patológicas. La magnitud de las corrientes extracelulares depende críticamente de dos factores: la organización citoarquitectónica de la red y la sincronización temporal de los diversos sumideros y fuentes de corriente (Buzsáki et al., 2012). Por ello, los avances en los métodos computacionales de análisis han permitido rescatar información oscilatoria de los registros de LFP, siendo estas una propiedad emergente [6] consecuencia de la integración de los muchos y diversos procesos individuales (Liebe et al., 2012; Mehring et al., 2003; Womelsdorf et al., 2006) que tienen lugar durante el procesamiento de información, y por tanto su entendimiento podría ser fundamental para estudios de conectividad locales y entre áreas, aportando información sobre los mecanismos que pueden subyacer la correcta funcionalidad cerebral (Sohal, 2016).

Por lo tanto, el registro de la señales por medio de un microelectrodo produce la señal más informativa (por el momento) para estudiar las fluctuaciones corticales. Muchos puntos de registro, con distancias cortas entre si, son necesarios para lograr una alta resolución espacial. Así, el uso de silicon probes ha supuesto un gran avance, ya que suponen el registro de distintas poblaciones de neuronas en un pequeño volumen. El análisis de las dinámicas en cada uno de los puntos de registro aporta información espacial sobre la actividad de cada población neuronal con un correlato espacial. Además, los últimos avances son los electrodos basados en la tecnología complementaria de semiconductores de óxido metálico (CMOS),

[6] Una propiedad emergente es una característica que presenta un sistema complejo, pero que los miembros individuales no.

como las sondas *Neuropixels*, que prometen revolucionar el campo de la electrofisiología *in vivo*. Proporcionan alrededor de 1000 sitios de registro con amplificación, multiplexación y digitalización in situ, permitiendo disminuir los niveles de ruido (Jun et al., 2017; Steinmetz et al., 2018).

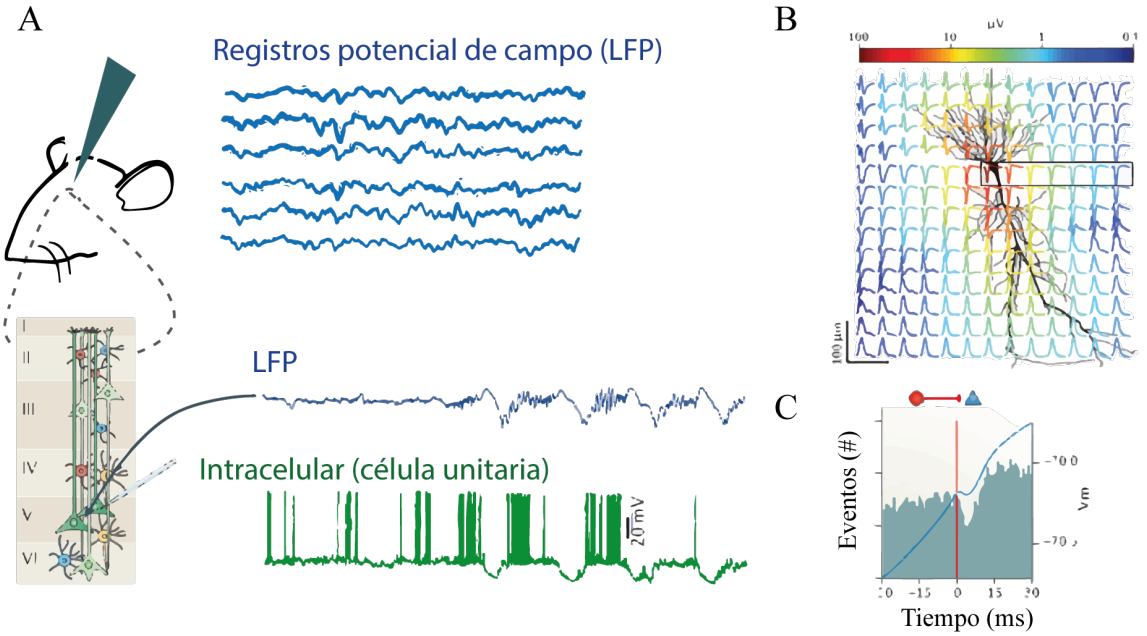


Figura 3.10 / *Potencial de Campo (Local Field Potential).* **A.** Registros de ejemplo de potencial de campo (LFP, azul). Registro de una célula unitaria (verde). **B.** Contribución extracelular de un potencial de acción al LFP en las proximidades de la célula piramidal. El rango de voltaje de pico a pico se indica por el color. Nótese que la amplitud del pico disminuye rápidamente con la distancia desde el soma. **C.** *Cross-correlograma* de representación de una conexión monosináptica entre una interneurona (rojo) y una célula piramidal (azul). Linea azul representa el potencial de membrana de la célula piramidal simultaneamente registrada extracelularmente. Adaptada de (Buzsáki et al., 2012)

Los potenciales de acción (PAs) que disparan las neuronas y que causan amplios potenciales transmembrana en la proximidad al cuerpo celular, pueden ser también medidos a nivel extracelular con este tipo de aproximaciones. El registro de este tipo de actividad recibe el nombre de actividad unitaria o registro de *spikes*, donde el tamaño de la actividad registrada dependerá de la proximidad al electrodo del soma de la neurona (Harris et al., 2000; Buzsáki and Wang, 2012). Las neuronas del mismo tipo generan PA esencialmente idénticos por lo que puede resultar una díficil tarea la de identificar una neurona en concreto entre el total de PAs registrados extracelularmente. En este aspecto, también ha sido fundamental el desarrollo de silicon-probes de alta densidad, que han permitido minimizar el daño el en tejido al mismo tiempo que estas probes multi-canal permiten una distribución geométrica de sus puntos de registro lo cual hace posible determinar la actividad de neuronas aisladas

(Csicsvari et al., 2003; Buzsáki, 2009).

Considerando estas propiedades, en esta tesis, se utilizaron los parámetros establecidos en (Fujisawa et al., 2008; Senzai et al., 2019; Buzsáki et al., 2012), y se aislaron neuronas individuales, denominadas unidades, distinguiendo células principales glutamatérgicas (PC) e interneuronas, que permitieron el posterior análisis detallado de la contribución al LFP y a los fenómenos observados, de poblaciones celulares concretas.

Posteriormente a la adquisición de los datos se realizó un preprocesamiento mediante el programa NDManager (Neurophysiological Data Manager (Hazan et al., 2006), `http://neurosuite.sourceforge.net`). Este proceso incluye para el LFP una disminución de la frecuencia de muestreo de la señal adquirida a 1250 Hz, con la que posteriormente se trabajó en MATLAB. Para el caso de la actividad unitaria (*spikes*) se realizó una agrupación por medio del sofware automatizado y validado KlustaKwik (Harris et al., 2000) `http://klusta-team.github.io/klustakwik/`. Esto tuvo como resultado la agrupación de las *spikes* en grupos (*clusters*) pertenecientes a la misma neurona, el análisis automático es realizado en base a los componentes principales (PCA) de la *waveform* de cada PA (Buzsáki, 2009)).

- Spike sorting Para el análisis de las unidades (*spikes*) se prosiguió con un ajuste manual de estos grupos mediante el uso de Klusters (Hazan et al., 2006), para tratar de mejorar la agrupación dada por el método automático, que tiende a sobreagrupar. A través de una inspección visual que permite descartar aquellas señales ruidosas y artefactos y agrupar los clusters pertenecientes a la misma neurona mediante la visualización de los auto-correlogramas (ACGs). Aquellas unidades con un periodo refractario limpio (2ms) y algunas multiunidades poco contaminadas con AAG claros se utilizaron para continuar con el análisis. Mediante la inspección visual de los AAG y la forma de la waveform, junto con una inspección de los cross-correlogramas con las neuronas que se encontraban en el mismo *shank*, se clasificaron las *spikes* previamente aisladas en excitadoras e inhibidoras siguiendo las características propuestas en (Barthó et al., 2004; Hazan et al., 2006; Fujisawa et al., 2008) (ver Figura 3.11). Las interneuronas putativas tienen waveforms más estrechas, lo que indica un retorno más rápido al basal (Rummell et al., 2016). Estas neuronas se utilizaron para analizar la frecuencia de disparo durante los diferentes eventos comportamentales en los distintos animales

estudiados mediante rutinas escritas en Matlab2018b.

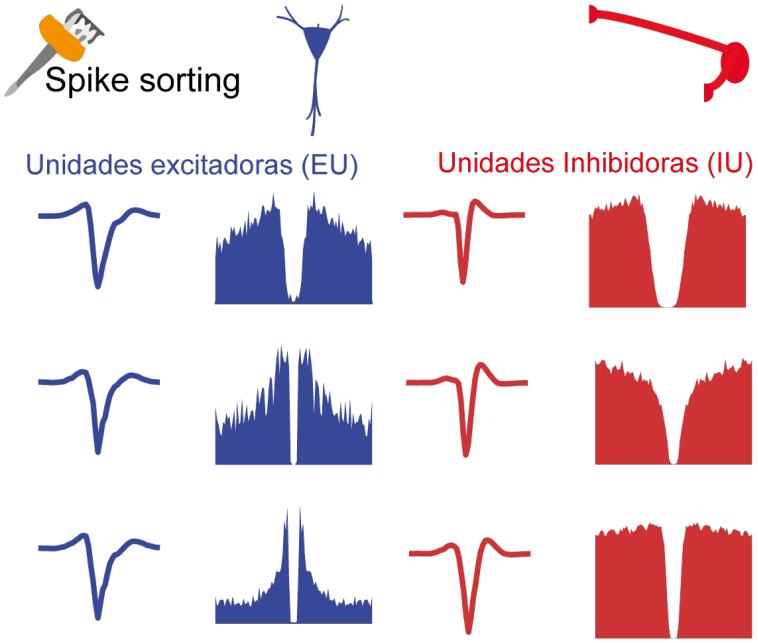


Figura 3.11 / ***Clasificación de las neuronas unitarias/(spikes) en excitadoras e inhibidoras.*** Se muestran ACGs para neuronas excitadoras (azul) e inhibidoras (rojo) junto con sus waveforms que han permitido su clasificación en estos dos grupos.

En el caso del LFP, posteriormente al preprocesamiento la señal de 1250 Hz se analizó por medio de Matlab [7].

- Filtrado Se aplicaron filtros para extraer las señales oscilatorias de interés. Los componentes de frecuencia no deseados para cada análisis se filtraron mediante un filtro digital, Chebyshev tipo II. El filtro Chebyshev de tipo II ha mostrado la ventaja de presentar frecuencias de ripples en la stopband en lugar de la passband (como ocurre en los de tipo I). En todos los pasos de filtrado, la atenuación de la stopband se definió como 20dB y el orden a 4.

- Filtros de velocidad Todos los datos de comportamiento se extrajeron filtrando a 3-20 cm/s para la exploración.

- Análisis de la potencia espectral
  -Fourier transform (FFT): se utilizó para calcular la distribución del espectro en los casos en los que no se requería de la información temporal (durante los periodos de descanso de la tarea). Se definió X como la señal de entrada, e Y como la obtenida tras

[7] Análisis de LFP se hicieron junto con Julio Esparza.

FFT. Y=fft(X). Después Y se dividió por la duración total de la señal,

$$P_1 = \left[abs\left(\frac{P_1(1)}{L}\right); 2 \cdot abs\left(\left(\frac{Y}{L}\right)\left(2 : \frac{L}{2} + 1\right)\right)\right] \tag{3.2}$$

Finalmente se tomaron algoritmos sobre la señal, para convertir los valores final a dB

$$P_1 = 10 \cdot \log P_1 \tag{3.3}$$

En el procesamiento de señales, el ruido blanco (del inglés *whitening*) significa que la señal tiene todas las frecuencias con la misma intensidad de tal manera que tiene una densidad espectral de potencia constante. Para calcular el peso espectral de cada frecuencia, cada una de ellas se dividió por la suma de los valores de la señal total.

$$P_{whitening}\theta = \frac{P_{1\theta}}{sum(P_1)} \tag{3.4}$$

-Multi-Taper Method: permite estimar el espectro de potencia S(X) de un proceso aleatorio de varianza finita estacionaria X. Se empleó para reducir el sesgo en la estimación mediante la obtención de múltiples estimaciones independientes de la misma muestra. Se calculó la potencia espectral mediante la función del toolbox Chronux mtspectrumc.m. Los parámetros utilizados fueron ventanas de 1s con un tapers de [3 5] y un rango de frecuencias de 1 a 120 Hz. El tiempo se asignó a posiciones en la arena del laberinto en T linearizado.
Sobre la señal estimada se realizaron rangos para el análisis estadístico del LFP, theta [4 10], gamma [30, 60] Hz y HFO [80, 120].

-Wavelet Transform: se empleó una Wavelet de tipo Morlet [8] para la localización de frecuencias en el tiempo, con 5 ciclos basado en código de BuzsákiLab `https://github.com/buzsakilab`. Para una visión más detallada se puede consultar (Cohen, 2014; Cohen et al., 2009; Polikar, 2006).
Las ventanas gausianas se crean para el seno de frecuencia específica mediante

$$window_{gauss} = a \cdot e^{\left(\frac{(t-m)^2}{2s^2}\right)} \tag{3.5}$$

Donde, a, amplitud de la Gaussiana, t es el tiempo, m es un desplazamiento del eje x,

[8] Es un seno en ventanas de Gaussianas.

y s es la desviación estándar. El número de ciclos se estableció en 5 y s se define como

$$s = \frac{n}{2\pi f} \tag{3.6}$$

donde n es el número de ciclos (Kumar and Foufoula-Georgiou, 1997)

- Análisis de acoplamiento fase-amplitud (del inglés, phase-amplitud coupling PAC): se utilizó para medir el conocido como cross-frequency coupling [9]. Se estudió la relación theta-gamma durante el t-maze específicamente en los test considerados como trials. Se seleccionó la frecuencia de fase como [4 10] Hz (theta) y la amplitud en las frecuencias de [30 60] Hz (gamma). El gráfico para la frecuencia se calcula de la siguiente manera: del LFP sólo aquellos segmentos cuya ratio theta/delta (theta [4 10] Hz, delta [1 4] Hz)(Figura 3.12) son mayores que 3 se seleccionan. Al hacerlo, nos aseguramos de que cualquier variación en las distribuciones de amplitud de fase de diferentes ratones se deba a cambios en el propio gamma.

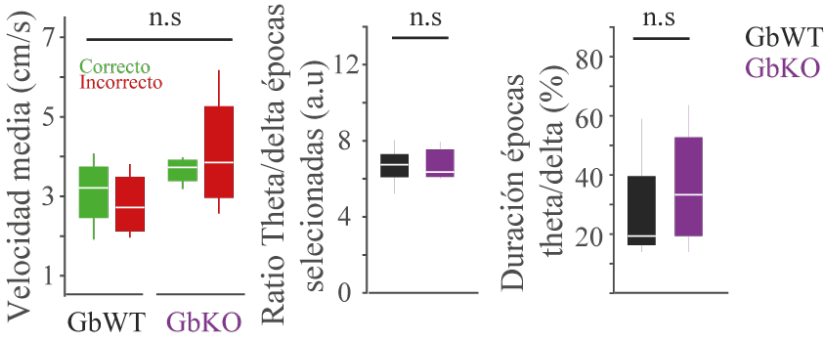


Figura 3.12 / *Épocas Theta/Delta.* Se muestran para los distintos grupos de animales (GbWT y GbKO) por separado en trials correctos e incorrectos los valores para la velocidad media, el ratio theta/delta y la duración de media de las épocas theta/delta. Nótese que no se aprecian diferencias entre trials correctos (verde) e incorrectos (rojo) ni entre grupos de animales.

El LFP se filtra con un filtro de paso de banda Chebyshev tipo II (paso de [4 10] Hz) para mantener sólo las frecuencias para los componentes de fase de la LFP y la transformada de Hilbert se calcula para extraer el vector de tiempo de fase de esa banda de frecuencias. Finalmente se calcula la Wavelet transform para el LFP original donde la amplitud en el rango [30, 60] Hz se selecciona, se realiza la media de bins de

[9] Se trata de la relación entre la fase de la frecuencia de una banda y la potencia de otra frecuencia, generalmente esta última una frecuencia más alta.

50, obteniendo una matriz que contiene la amplitud de gamma para cada fase de theta.
-Transformada de Hilbert: los resultados que los rendimientos de las transformaciones de Hilbert corresponden a los componentes de frecuencia filtrados con el filtro de paso de banda (en la banda de interés, previo al cálculo de la transformada). Transformada de Hilbert de una señal s(t) que se define como la transformación en la que el ángulo de fase de todos los componentes de la señal se desplaza por 90º. La transformación Hilbert de s(t) se representa como

$$\hat{s}(t) = s(t) + j\hat{s}(t) \tag{3.7}$$

La transformada de Hilbert con componentes reales devuelve una señal compleja de la que se puede extraer la amplitud y la fase.

$$\hat{s}(t) = \frac{1}{\pi}\int_{-\infty}^{\infty}\frac{s(k)}{t-k}dk \tag{3.8}$$

donde s(t) es la señal de valor real original y $\hat{s}$(t) es su transformada de Hilbert. La señal analítica que se obtiene, sA(t), puede expresarse en notación exponencial:

$$s_A(t) = A(t)e^{j\theta(t)} \tag{3.9}$$

(Buzsáki and Wang, 2012)

■ Actividad neuronal durante la tarea
Para estudiar la actividad de las neuronas durante la tarea se estudió la distribución de las spikes previamente clasificadas: el tiempo se dividió en bins de 1 segundo y todos los ensayos se alinearon de manera que coincidiesen los puntos de inflexión en el T-maze (giro izquierda o derecha en la arena). A continuación, se calculó el número de *spikes* que disparó la neurona en cada uno de los casos (para las pruebas correctas e incorrectas por separado).

La frecuencia de disparo de cada neurona en cada momento se dividió entre la máxima tasa de disparo. Las neuronas se clasificaron en dos poblaciones acorde al siguiente criterio:
-Población que aumentaba: se consideraron pertenecientes a esta población aquellas neuronas que disparaban al menos 1.5 veces en durante la zona de decisión sobre el disparo que tenia lugar durante el basal (considerando este desde el inicio hasta la

zona de toma de decisiones, DZ). Otro de los requerimientos fue que la tasa de disparo normalizada durante el basal tenía que ser al menos 0.6, después de la zona de decisión 0.2.

-Población que disminuía: una neurona era considerada de esta población si su media de disparo en la DZ era al menos 0.5 veces la media de disparo durante el basal. Además la media de disparo durante el basal tenía que ser al menos 0.2.

- Preferencia a la fase de gamma La preferencia de fase de disparo se calculó en las neuronas durante los ensayos de test del T-maze. En primer lugar, a partir de la señal del LFP, se escogieron los segmentos theta/delta de un cierto umbral (mayor a 3), para asegurarse de que las variaciones en gamma no son causadas por la modulación theta. En segundo lugar, se filtró la señal en la banda gamma. A continuación se calculó el umbral de potencia para la detección de gamma épocas definida como la potencia media del LFP de gamma más el doble de la desviación estándar. Se estableció una duración mínima de los ciclos de gamma definida como 2 ciclos de la frecuencia más rápida en la banda. Finalmente de estas épocas detectadas de gamma durante los ensayos de test del T-maze, se consideraron aquellas neuronas que disparaban al menos <30 PAs durante este trial y se observo su preferencia de fase durante estas épocas de gamma. La fase del LFP se calcula mediante la transformada de Hilbert.

  Las oscilaciones gamma se detectaron entre 30-60 Hz. Considerando aquellas amplitudes que superaban 2SD y de una duración de al menos 25ms como épocas en esta frecuencia (Csicsvari et al., 2003). El comienzo y el final de estas épocas de gamma se definieron como aquellos puntos en los que la amplitud disminuía por debajo de 1SD. La fase de gamma se calculó sobre las épocas detectadas como se ha descrito en (Wulff et al., 2009; Korotkova et al., 2010).

  Debido a que posibles asimetrías de los ciclos de oscilación pueden causar diferencias en el número de ciclos y por tanto generar bias en los histogramas de fase (Sirota et al., 2008), la uniformidad de estas fases de gamma y su distribución se estudio usando el test de Rayleigh. Sólo se consideraron las neuronas que habían disparado al menos 30 veces durante las épocas gamma detectadas (regiones de la LFP en las que la potencia gamma estaba por encima del umbral previamente definido) para realizar los cálculos adicionales y garantizar que el histograma resultante fuera representativo del

comportamiento de las neuronas. Por último, la fase se agrupó en 10 bins y se calculó el histograma (con el número de PAs disparados).

3.8.4. Análisis histológicos y de co-localización

Se estudió la co-localización del reportero de mCherry como marcador de las diferentes opsinas que se utilizaron para astrocitos, con marcadores astrocitarios y neuronales [10].

Se obtuvieron secciones ópticas individuales (0.8μm), por medio de un objetivo de inmersión en aceite 63x 1.40 NA. Se utilizó el plugin Intensity Correlation Analysis (ICA) de ImageJ para un análisis cuantitativo de colocalización. Además tras la aplicación de una sustracción de fondo previa a la aplicación del plugin se realizó la medida del coeficiente de correlación de Pearson, dato obtenido dentro del mismo análisis. Para un análisis cualitativo de colocalización de mCherry con astrocitos, se obtuvieron z-stacks de imagenes tomadas con un grosor de 10μm obtenidas a través de un objetivo de inmersión en aceite 40x 1.25NA. Se utilizaron S100 y NeuN como marcadores astrocitarios y neuronales, respectivamente, para cuantificar el número de células con doble marcaje (mCherry-S100 o mCherry-NeuN).

Además para investigar la posible microgliosis causada por la infección viral se tomaron las imágenes de Iba1 previamente preparadas. Proyecciones máximas en z de 10μm de grosor se obtuvieron por medio de objetivo de inmersión en aceite 40x 1.25NA. Para estudiar la posible astrogliosis inducida por inyecciones virales, se tomaron imágenes de las secciones marcadas con GFAP a través de un objetivo de inmersión en aceite 40x 1.25NA. Sobre las imágenes (10 μm de grosor) se aplicó una máscara para las cuantificaciones (Figura en apartado 4.1).

Para el análisis de los niveles de expresión de mCherry expresados por los diferentes virus se utilizaron proyecciones máximas de z-stacks [11] (8μm grosor) obtenidos con objetivo de inmersión 63x 1.40 NA (zoom digital= 2x). Después de establecer un umbral para las imágenes se realizó una mascara que se aplicó sobre las diferentes imágenes de las cuales se había previamente sustraído el fondo. Los valores de fluorescencia se expresaron como valores medios para los diferentes astrocitos infectados con cada uno de los virus.

[10] Análisis se la primera sección de resultados se realizaron junto con Jorge Ramirez-Franco.
[11] nombraremos así al conjunto de imágenes de un plano z apiladas.

Con respecto a la segunda parte de resultados se estudió la correlación entre la infección y el comportamiento de los animales infectados 4.2 [12]. Las imágenes se obtuvieron por microscopía confocal (LSM 710, Zeiss, Carl Zeiss AG, Jena) utilizando un objetivo 40x (Plan-Aprochomat 40x/1, 4 Oil DIC (UV) VIS-IR M 27). Las stacks-Z de imágenes se tomaron a intervalos de 0,5 mm y se procesaron con ImageJ. Estas imágenes fueron analizadas y segmentadas con MATLAB. Un algoritmo basado en cluster K-means, con el número de clústeres establecido en 5 (Dima et al., 2011; Jain and Dubes, 1988) fue desarrollado para separar el fondo de la fluorescencia de infección. Para cada rodaja, las máscaras manuales debían delinear el área para ser considerada como CPFm usando el atlas cerebral de ratón (Paxinos and Franklin, 2012). Después de haber detectado la infección contenida en cada rodaja (referida al punto de referencia de Bregma), la infección total en la CPFm (de Bregma 3.00 mm a Bregma 2.00 mm) se estimó a través de interpolación gaussiana múltiple (Reyes et al., 2018). La infección total se comparó con el número de ensayos erróneos de 10 durante el 4o día de la tarea (sesión 4).

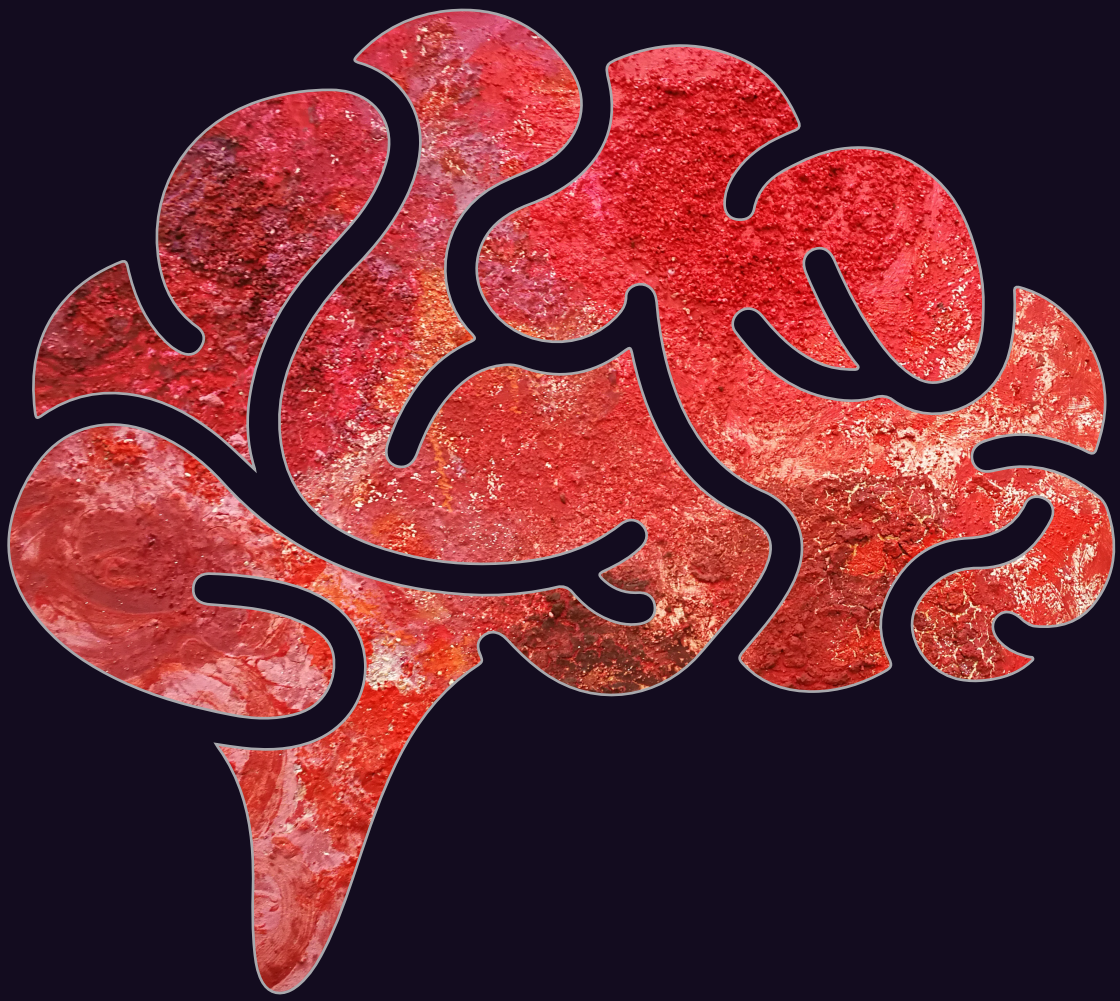
3.8.5. Procedimientos estadísticos

Los datos se expresaron como el promedio ± el error estándar de la media (SEM) indicándose en cada caso el número de datos (n) o bien en formato de cajas de barra y bigotes con la representación de la mediana. Los datos se analizaron utilizando test correspondientes al análisis de normalidad de los datos y acorde al diseño experimental y la estructura de los datos adquiridos, en cada caso se indican los estadísticos empleados. El tamaño de las muestras se determinó acorde a los valores aceptados en la literatura para cada caso. La normalidad de la muestra se testo mediante el uso de los tests Kolmogorov-Smirnov o D'Agostino-Pearson.

Las diferencias significativas se representaron de la siguiente manera: $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), y $p < 0.001$ (***).

[12] El análisis histológico de los datos de la sección de resultados de la segunda parte se realizó junto con Cristina Sánchez-Puelles.

Capítulo 4



Resultados

4 | Resultados

4.1. Melanopsin controla de forma precisa las redes neuro-gliales

Considerando la relación entre la actividad de los receptores metabotrópicos (GPCRs), la señalización de Ca^{2+} intracelular en astrocitos y la liberación de gliotransmisores, el desarrollo de nuevas herramientas ópticas basadas en la activación de GPCRs, que permitan recapitular las respuestas endógenas de los astrocitos con un alto grado de precisión temporal, suponen un reto en el estudio de la señalización astrocito-neurona y sus consecuencias en los distintos circuitos cerebrales.

Por tanto, uno de los objetivos de esta tesis ha sido ampliar las herramientas disponibles que permitan un control rápido de la señalización astrocitaria. Nos centramos en el uso y caracterización de melanopsin. Se trata de un fotopigmento acoplado a proteínas G expresado por un subconjunto de células de ganglionares de la retina de mamíferos, que presenta un pico de absorción de alrededor de 470 a 480 nm (Hatori and Panda, 2010; Hattar et al., 2002; Sexton et al., 2012). A diferencia de las opsinas derivadas de algas que forman canales iónicos (Zhang et al., 2011), melanopsin se acopla a proteínas Gq para activar la vía de PLC, lo que lleva a la señalización de IP3 y a la elevación de los niveles intracelulares de Ca^{2+} (Panda et al., 2005). Las similitudes de melanopsin con otras GPCRs acopladas con Gq para neurotransmisores, entre los que se incluyen beta1-adrenérgico, colinérgico-M1 y el grupo de receptores mGluR1, la convierten en una herramienta óptica adecuada para la estimulación selectiva de los astrocitos.

4.1.1. Melanopsin: nueva herramienta optogenética para el control de calcio astrocitario

Con el fin de investigar la capacidad de melanopsin para modular la señalización de Ca^{2+} en los astrocitos, el gen para la opsina (Opn4-Humana melanopsin) se fusionó con el promotor para la proteína GFAP, característica de astrocitos, y se expresó en astrocitos de la región de hipocampo mediante una estrategia basada en virus adeno-asociados (AAV)(AAV2/5-GFAP-Melanopsin-mCherry; Figura 4.1,4.4), (ver Capítulo Materiales y Métodos 3.2.1).

Para determinar las características de la transfección de melanopsin en astrocitos (Figuras 4.1, y Capítulo de Materiales y Métodos) se analizaron mediante estudios cuantitativos y cualitativos distintos parámetros que muestran la especificidad de las expresión en este tipo celular a través del reportero mCherry (Figura 4.1), y su colocalización con el marcador

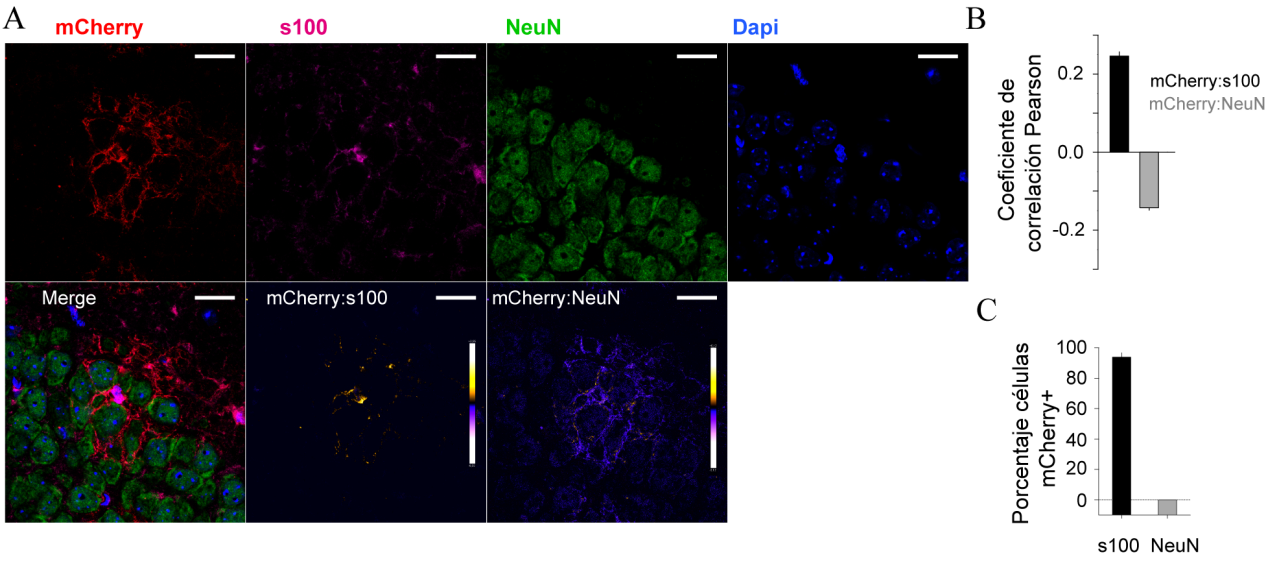


Figura 4.1 / ***Estrategia viral con melanopsin y expresión selectiva en astrocitos.*** **A.** Sup, Detalle de imágenes confocales de un astrocito expresando Melanopsin-mCherry (rojo) junto con neuronas piramidales de CA1. S100 marcador astrocitario (rosa), y marcador neuronal NeuN (verde), DAPI (azul). Inf, combinado de las distintas imágenes, correlación positiva para mCherry:S100 (amarillo) y una correlación negativa para mCherry: NeuN (azul), lo que indica la selectividad de la expresión de melanopsin en astrocitos. Escala 20 μm. **B.** Promedio del coeficiente de correlación de Pearson (33 campos; 6 rodajas 2 ratones; mCherry: S100 = 0,25 ± 0,01; mCherry: NeuN = -0,14± 0,01). El coeficiente de correlación negativo de Pearson para mCherry: NeuN indica la expresión restringida de melanopsin en los astrocitos.**C.** el 93,80 ± 2,91 % de las células positivas de mCherry también fueron positivas para S100 (75/79; 6 rodajas, 2 ratones), mientras que ninguna de las células positivas de mCherry fue positiva para NeuN (0/79; 6 rodajas 2 ratones).

astrocitario S100 y no con el marcador neuronal NeuN.

Se realizó un estudio de la distribución de la expresión de melanopsin-mCherry a lo largo de la superficie celular de los astrocitos (Figura 4.2, paneles A-F).

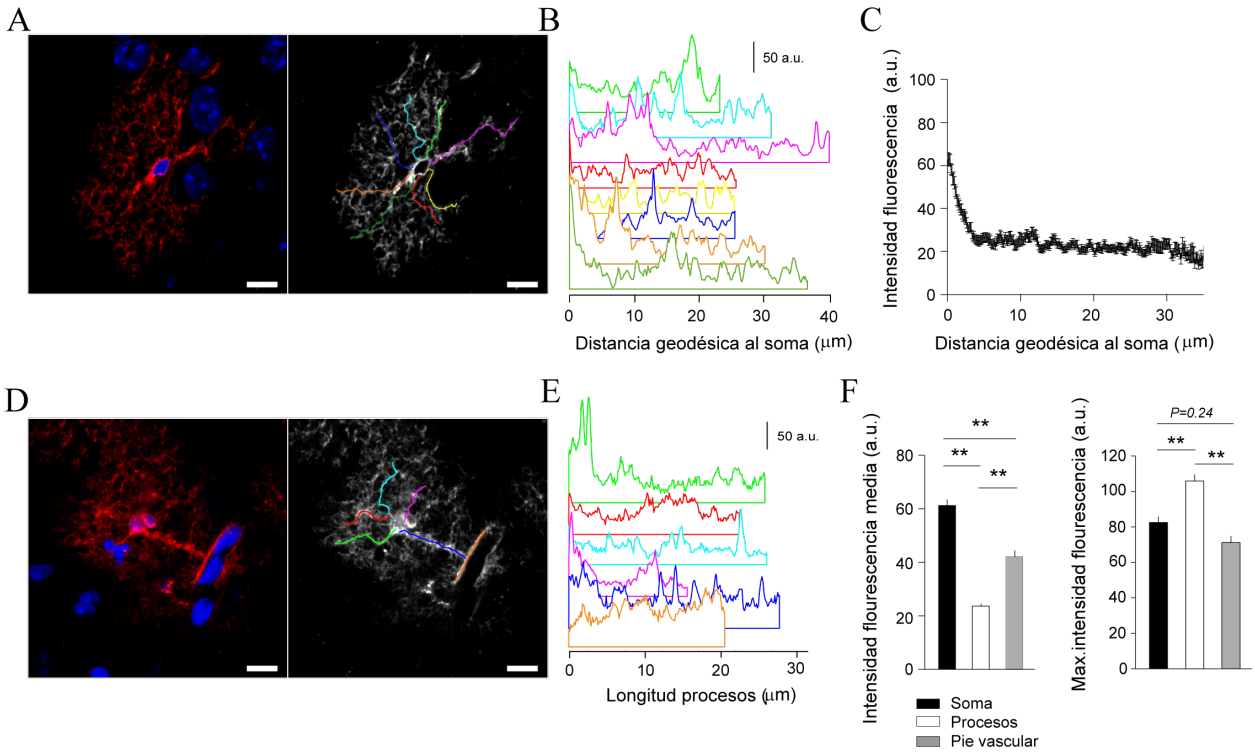
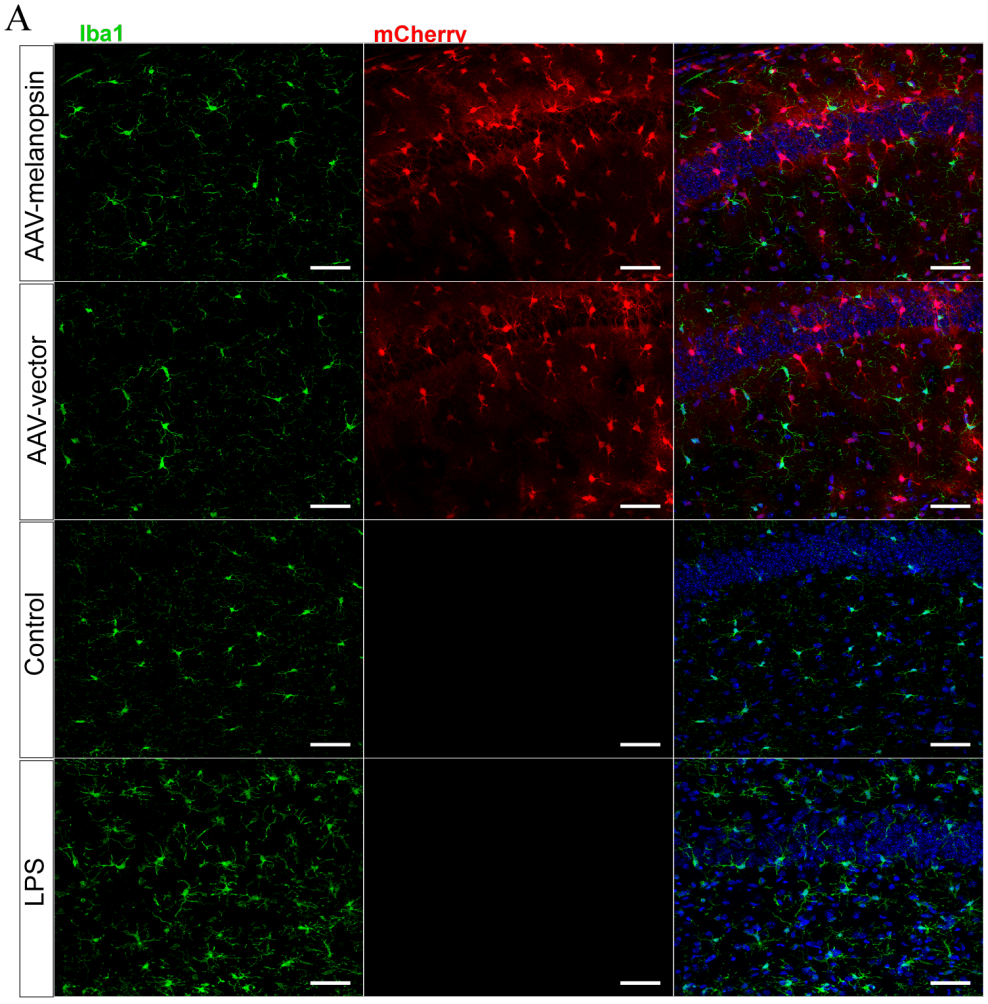


Figura 4.2 / *Distribución de la expresión de melanopsin en astrocitos.* **A.** Izda, colocalización mCherry (rojo) con DAPI (azul) en astrocito transfectado con melanopsin. Dcha, máscara utilizada para el análisis de trazado de líneas sobre procesos. Escala 10 μm. **B.** Análisis de procesos individuales representados en el panel A. **C.** Perfil medio de los niveles de fluorescencia en las regiones más cercanas al soma y la señal de fluorescencia a lo largo de los procesos. **D.** Izda, Imagen de un astrocito transfectado con melanopsin rodeado de núcleos (marcados con DAPI) y mostrando prolongaciones celulares en contacto con un vaso (pies vasculares). Dcha, máscara utilizada para el análisis de trazado de líneas de los procesos astrocitarios y de los pies vasculares. Escala 10 μm **E.** Análisis de de la fluorescencia en los segmentos celulares marcados en D. **F.** Izda, intensidad media de fluorescencia mostrada por regiones somáticas (proceso proximal medido a 0,5 μm del Soma), procesos (regiones situadas entre 10 y 20 μm al Soma) y pies vasculares como se muestra en el panel D (trazo naranja). Regiones somáticas: 61,21 $\pm$ 2,20; n=102 de 8 astrocitos. Procesos: 23, 63 $\pm$ 0,86; n= 102, 8 astrocitos. Pies vasculares: 42,01 $\pm$ 2,35 a.u.; n=31, 8 astrocitos. Dcha, valores máximos de intensidad de fluorescencia. Procesos: 105,89 $\pm$ 3,62 a.u; Regiones somáticas: 82,51 $\pm$ 3,14 a.u; Pies Vasculares: 71,10 $\pm$ 3,69 a.u (procesos frente a regiones somáticas: p <0,001; procesos frente a pies-vasculares: p <0,001; Regiones somáticas frente a pies-vasculares: p=0,27). One-way ANOVA, post hoc Tukey –Kramer. ** p <0,01, ***p <0,001. Datos se muestran como media $\pm$ SEM.

La expresión tenía lugar en todo el cuerpo celular, marcando el soma, procesos y pies

vasculares. Observamos que los niveles de mayor fluorescencia de mCherry se encontraban en los procesos en lugar del soma o los pies vasculares, indicando una posición adecuada de melanopsin para simular la expresión endógena de los GPCRs, próxima a las sinapsis.

Se analizó si la transfección viral o la propia expresión de melanopsin por parte de los astrocitos podía inducir procesos inflamatorios en la región de estudio (Shigetomi et al., 2013)(Figura 4.3). En análisis de los niveles de expresión de Iba1+ (marcador de activación microglial), un indicador de respuesta inflamatoria y reactividad glial en el tejido, eran similares en secciones de hipocampo de animales transfectados con el virus control (GFAP-mCherry; vector) y animales transfectados con melanopsin; mostrando además valores de expresión de Iba1 comparables a animales silvestres (sin transfectar) (Figura 4.3).



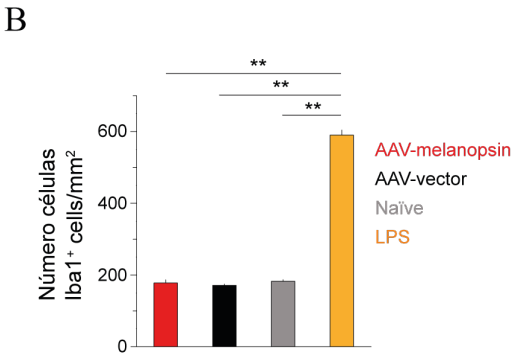


Figura 4.3 / *La expresión de AAVs no promueve la activación microglial.* A. Marcaje de Iba1 en ratones con melanopsin-mCherry, vector-mCherry, silvestres y tratados con LPS. Iba1 (verde), mCherry (rojo) y DAPI (azul). Escala, 50 μm. Iba1 se analizó 15 días tras la inyección viral. **B.** Número de células Iba1+ en función del área de estudio. No se observan cambios significativos en el uso de agentes virales respecto a la situación silvestre (sin transfectar). Sin embargo, LPS produce un marcado incremento acorde con la respuesta inflamatoria generada por este agente. AAV-Melanopsin: 177,58 ± 9,14 cel/mm2, 11 campos, 5 rodajas, 2 ratones; AAV-vector: 171,11 ± 3,85 cél/mm2, 9 campos, 4 rodajas, 2 ratones; Naïve: 182,50 ± 4,50 células/mm2, 8 campos, 4 rodajas, 1 ratón; LPS: 590,37 ± 14,19 cél/mm2, 9 campos, 5 rodajas, 2 ratones. ANOVA one-way, post hoc Tukey-Kramer. ** P<0,01. T-test; P= 0,87. Datos se muestran como media ± SEM.

Para testar una respuesta inflamatoria en nuestras condiciones, un grupo de animales fueron tratados con lipopolisacarido (LPS), descrito como agente proinflamatorio (da Cunha Franceschi et al., 2017). Así, se observó que 24h después de la inyección hipocampal de LPS aumentaron de forma significativa los niveles de expresión de Iba1 respecto a todas las condiciones (Figura 4.3); indicando que las transfecciones virales realizadas en este estudio no supusieron reactividad microglial ni procesos inflamatorios de relevancia.

Una vez establecida la selectividad de la expresión viral de melanopsin, procedimos a comprobar la funcionalidad de este fotopigmento para modular la señalización por Ca^{2+} astrocitaria.

Las señales de Ca^{2+} se monitorizaron mediante el indicador de Ca^{2+} (GECI) Lck-GCaMP6f, indicador codificado genéticamente, mediante la fusión al promotor GFAP. La co-expresión de partículas virales que contienen Lck-Gcamp6 y melanopsin (relación de partículas virales 1:1, en una misma inyección, ver 3.2.1 y Figura 4.4) fue dirigida a la región de CA1 de hipocampo. La expresión de Lck-GCaMP6f reveló la naturaleza altamente ramificada de los astrocitos, marcando los procesos finos (Shigetomi et al., 2013), donde se centró el análisis de los eventos Ca^{2+}. Para el análisis de las señales de Ca^{2+}, sólo se consideraron astrocitos

que mostraban tanto el marcaje para mCherry-Melanopsin como Lck-GCaMP6f.

Las señales de Ca^{2+} se monitorizaron mediante el indicador de Ca^{2+} (GECI) Lck-GCaMP6f, indicador codificado genéticamente, mediante la fusión al promotor GFAP. La co-expresión de partículas virales que contienen Lck-Gcamp6 y melanopsin (relación de partículas virales 1:1, en una misma inyección, ver 3.2.1 y Figura 4.4) fue dirigida a la región de CA1 de hipocampo. La expresión de Lck-GCaMP6f reveló la naturaleza altamente ramificada de los astrocitos, marcando los procesos finos (Shigetomi et al., 2013), donde se centró el análisis de los eventos Ca^{2+}. Para el análisis de las señales de Ca^{2+}, sólo se consideraron astrocitos que mostraban tanto el marcaje para mCherry-Melanopsin como Lck-GCaMP6f.

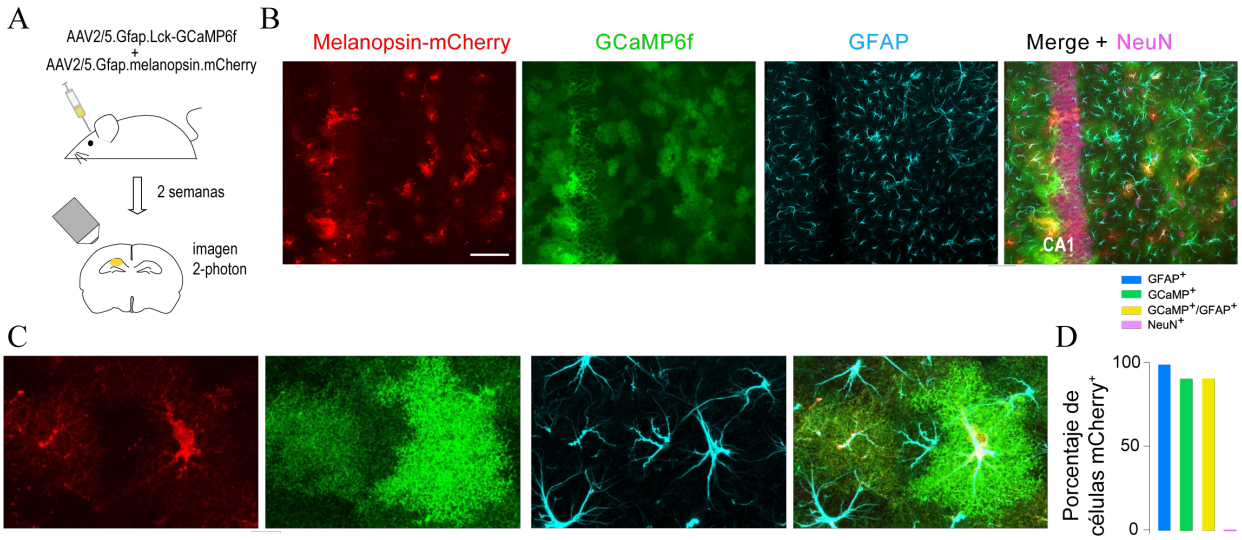


Figura 4.4 / *Co-expresión de melanopsin y GCaMP6 en astrocitos.* **A.** Esquema del enfoque experimental. Sup, transfección viral de AAV2/5-GFAP-LckGCaMP6f y AAV2/5-GFAP-Melanopsin-mCherry en hipocampo. Inf, rodaja hipocampal bajo microscopio 2 fotones. **B.** Inmunocitoquímica de Melanopsin-mCherry, GCaMP6f, y GFAP en rodajas de hipocampo;Escala, 50 μm. **C.**, una imagen ampliada del mismo campo. Merge, incluye NeuN (rosa). Escala 10 μm. **D** Porcentaje de células positivas para GFAP (98,72 $\pm$ 0,88 %), GCaMP6f (90,42$\pm$ 3,23 %) y células NeuN+ (0 %) colocalizando con mCherry (n=138; 12 campos; 2 ratones).

Tras la estimulación de melanopsin con luz azul (473 nm), los astrocitos mostraron aumentos robustos de Ca^{2+} en los procesos y en el cuerpo celular (soma), denominados regiones de interés (ROIs, del inglés *región of interests*) (Figura 4.5). Utilizando protocolos de luz de duración variable se caracterizó la capacidad de melanopsin para inducir respuestas de Ca^{2+}.

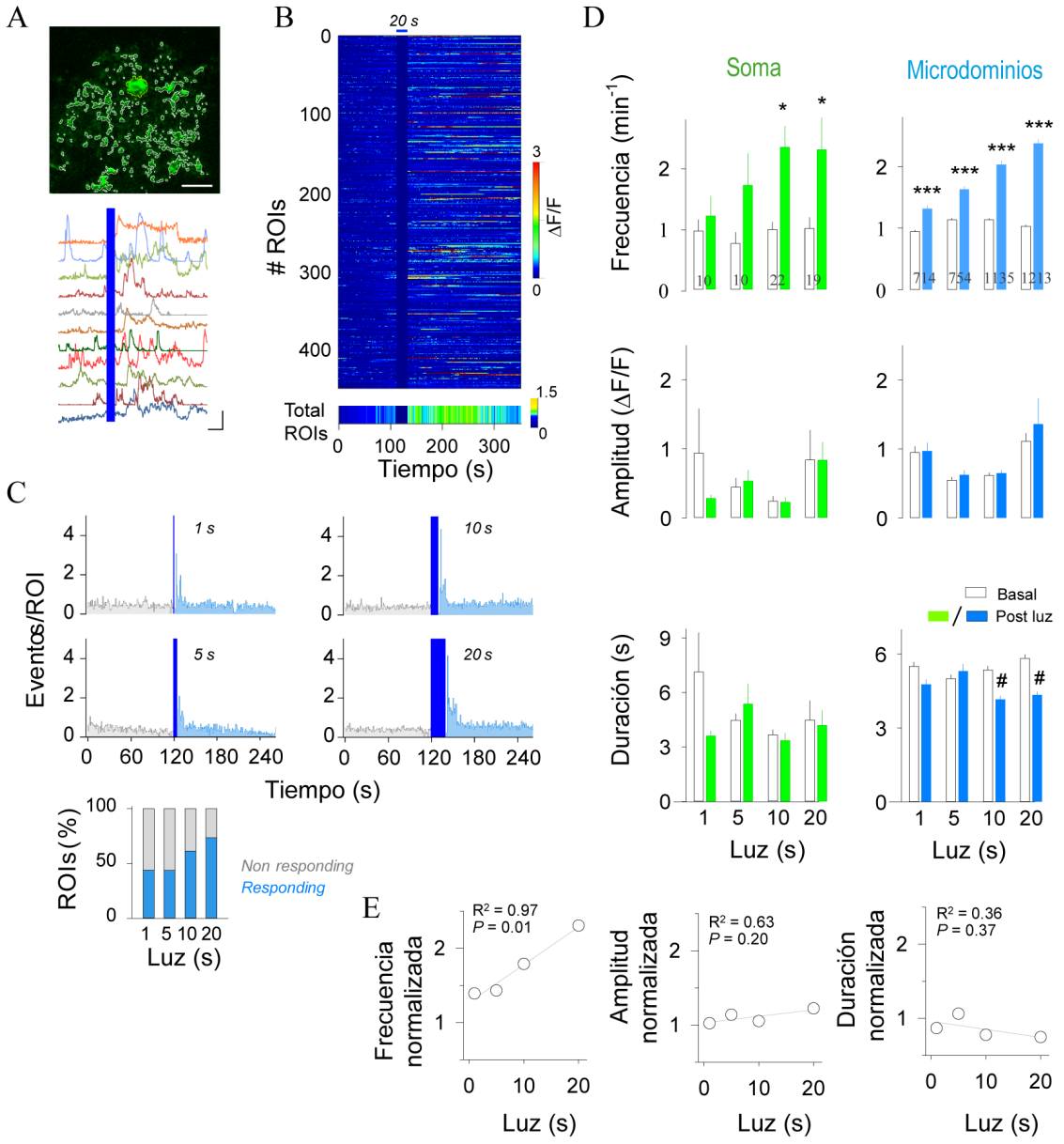


Figura 4.5 / ***La expresión de melanopsin en astrocitos estimula la señalización*** Ca^{2+}**. A.** Sup, astrocito GCaMP6f-Melanopsin y mostrando los microdominios identificados. Inf, trazos representativos Ca^{2+} (20s estimulación; barra). Escala, 15 μm; 3 deltaF/F, 50 s. **B.** Gráfico representativo de la actividad de ROIs (sup, n=450) y actividad poblacional promedio ante luz 20s (inf, n=1.213). **C.** Sup, Frecuencia de eventos (1s, n=714; 5s, n=757; 10s, n=1.135; 20s, n=1.213; 41 rodajas de nueve ratones). Inf, %ROIs que mostraron 1 evento durante los primeros 20s después de la luz (1s n=313; 5s n = 331; 10s n=697; 20s n = 891). **D.** Izda. Análisis respuestas somáticas con Lck-GCaMP6f,(1s: n=10; 5s: n=10; 10 s: n = 22; 20 s: n=19; 41 rodajas de nueve ratones). Basal vs poststim 10s, p=0,034; 20s, p=0,043; análisis ANOVA two-way, post hoc Tukey–Kramer. Dcha, Análisis en microdominios (1s, n=714 de 877 (81,42 %); 5s, n=757 939 (80,62 %); 10s, =1.135 de 1.326 (85,60 %); 20 s, n=1.213 de 1.333 (90,99 %); 41 rodajas 9 ratones). * p<0,05, ** p<0,01 ,***# p<0,001; ANOVA two-way, post hoc Tukey–Kramer. **E** Cambios normalizados en la frecuencia, amplitud y anchura de los eventos en microdominios frente al basal. Ajuste lineal entre diferentes condiciones de estímulos (R2). Datos se muestran como media ± SEM.

El análisis de estas respuestas indicó que pulsos de luz de duración 1, 5, 10, 20 s eran eficaces en aumentar la frecuencia de eventos Ca^{2+} en tanto en el soma como en los microdominios (regiones discretas de los procesos astrocitarios, ver Materiales y Métodos). Asimismo, la duración de los eventos de Ca^{2+} en los microdominios se vio disminuida en respuesta a la estimulación con pulsos de luz de larga duración (10, 20 s) (1s: 4,76 ± 0,2 s; 20 s: 4,34 ± 0,12; P<0,001; Panel D Figura 4.5). Sin embargo, las respuestas registradas en el soma no mostraron cambios significativos tras la estimulación con los diferentes protocolos (Fig. 1.5D). Por su parte, la amplitud de los eventos Ca^{2+} no estuvo afectada por el la estimulación con distintos pulsos de luz tanto en el soma como en los microdominios (Figura 4.5).

Dadas las características de la expresión de Lck-GCaMP6f nos centramos en el análisis de los eventos de Ca^{2+} en los microdominios. Se observó que los diferentes pulsos de luz inducen un pico de respuesta máxima similar, unos 3s después del final del estímulo (Figura 4.5C); sin embargo, estímulos de luz de mayor duración aumentaban el número de ROIs que mostraban un incremento en el número eventos de Ca^{2+}.

Se analizaron las características particulares de las respuestas de Ca^{2+} controladas por melanopsin, basándonos en los valores de amplitud previos al estímulo los eventos de Ca^{2+} se clasificaron en tres grupos (ROIs activos, ver Materiales y Métodos 3). Los ROIs con eventos de Ca^{2+} de pequeña amplitud (0<i<3 unidades arbitrarias de fluorescencia; i = F-F0/F0) mostraron un incremento en su frecuencia de oscilación tras la estimulación con los diferentes pulsos de luz (Figura 4.6B); sin embargo, la amplitud y la duración de los eventos se vio modificada solo tras la estimulación con pulsos de luz de larga duración (Figura 4.6B). Por el contrario, ROIs con señales de Ca^{2+} de mayor amplitud (i>3 unidades arbitrarias de fluorescencia) en condiciones de reposo no mostraron cambios en su amplitud, y sólo después de pulsos de luz >10 s presentaban un aumento en la frecuencia de eventos de Ca^{2+} relacionado con una menor duración de los mismos (Figura 4.6B). Asimismo, se detectaron ROIs que únicamente mostraron eventos de Ca^{2+} después de la estimulación de melanopsin en cada uno de los pulsos de luz testados (i=0 unidades arbitrarias de fluorescencia). En este caso, como cabía esperar, los ROIs presentaban un incremento en la frecuencia y duración de los eventos de Ca^{2+} (Figura 4.6B).

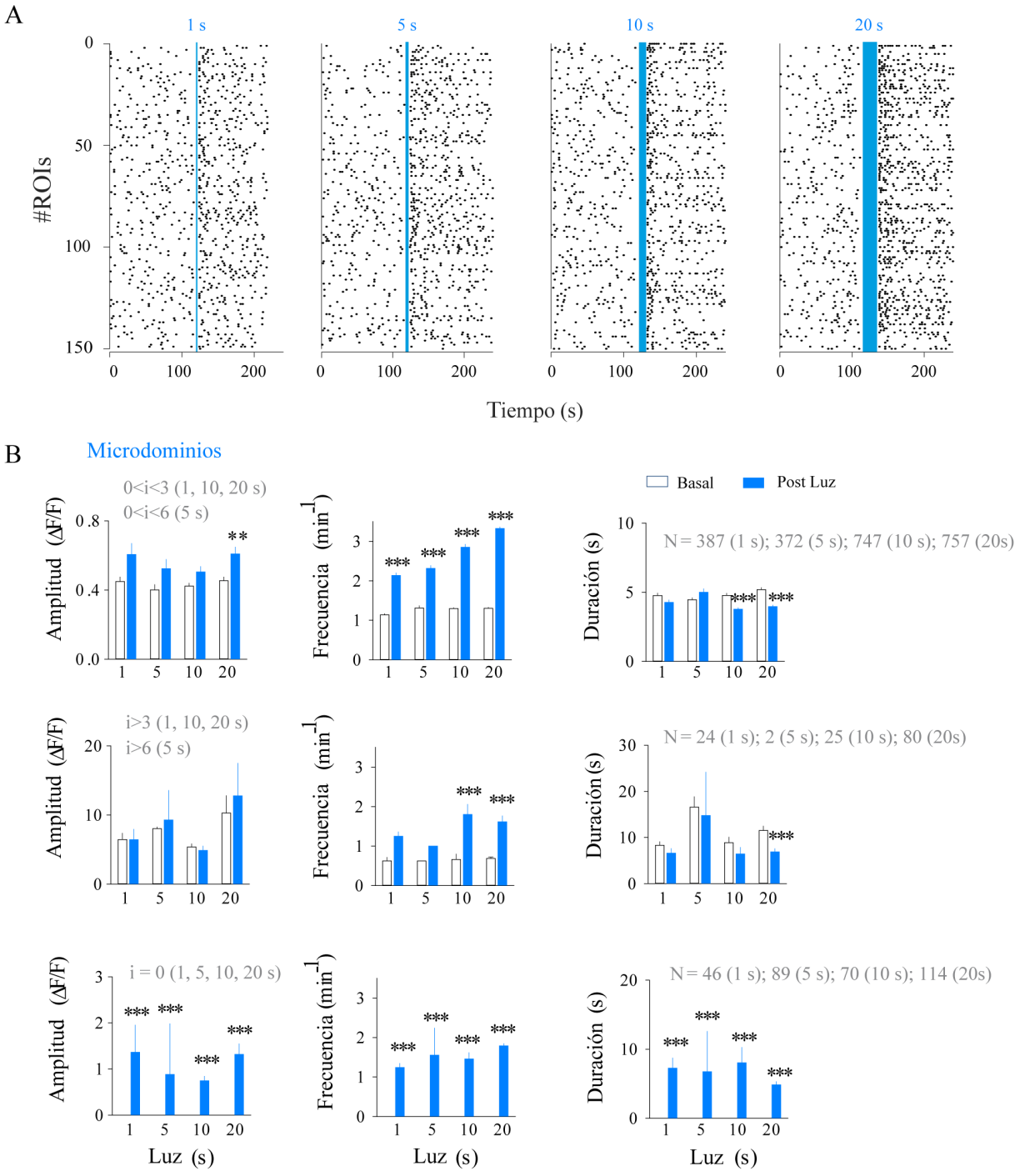


Figura 4.6 / ***La estimulación de melanopsin recluta la señalización Ca^{2+} en los microdominios.*** **A.** Gráficos representando el inicio de los eventos en diferentes condiciones de estimulación con luz 1s, 5s, 10s y 20s (n = 150). **B.** Análisis de las propiedades de los eventos de Ca^{2+}. Segmentación en grupos mediante k-means resultó en 3 clusters (ver métodos) en base a la amplitud de las señales de Ca^{2+} en reposo en reposo (i denota la amplitud del evento Ca^{2+}). Stim de la luz 20s, amplitud del evento 0<i<3, P=0,007. P<0,01; P <0,001, ANOVA two-way, comparación post-hoc con Tukey-Kramer. Datos se muestran como media ± SEM.

Teniendo en cuenta el número limitado de células que muestran expresión de Lck-GCaMP6f en el soma (Haustein et al., 2014; Poskanzer and Yuste, 2016; Shigetomi et al., 2013), se realizaron un grupo de experimentos en los que se transfectaron astrocitos con cyto-GCaMP6f (AAV2/5-GFAP-Cyto-GCaMP6f), que permite un marcaje prominente del soma y los procesos cercanos al cuerpo celular (Srinivasan et al., 2015).

En este caso, la estimulación con pulsos de luz de 20s provocó un aumento en la frecuencia de eventos somáticos de Ca^{2+}, sin desencadenar cambios significativos en la amplitud o la duración de los eventos de Ca^{2+}, confirmando los resultados encontrados con Lck-GCaMP6f (Figura 4.7).

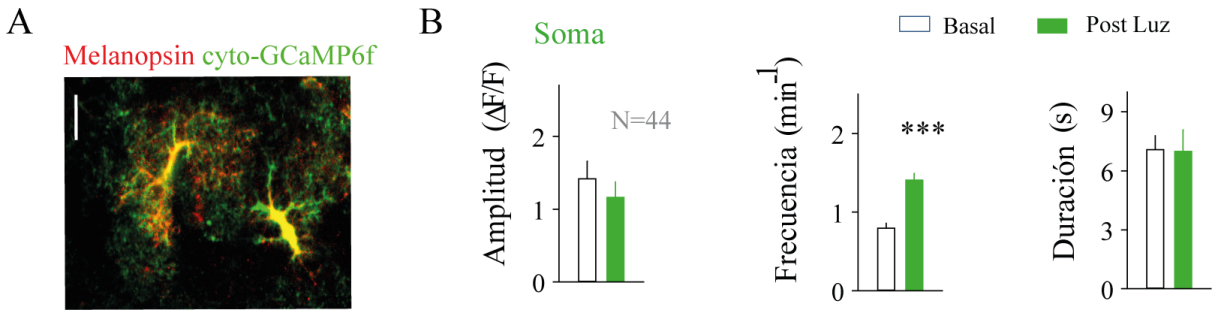


Figura 4.7 / *Confirmación de la estimulación de eventos de Ca^{2+} somáticos por melanopsin.* **A** Imagen de astrocitos cotransfectados de Melanopsin-mCherry y Cyto-GCaMP6f. Escala=20 μm. **B** Análisis de propiedades somáticas de los eventos de Ca^{2+}, amplitud, frecuencia y duración (n = 44, 14 rodajas de 3 ratones) inducidos por 20s de estimulación. Nótese que el soma muestra un aumento de la frecuencia de eventos después de la estimulación con luz (de 0,795 ± 0,061 en condiciones basales a 1,409 ± 0,081; P <0,001). P<0,001, ANOVA one-way, post-hoc Tukey-Kramer. Datos se muestran como media ± SEM.

Por tanto, estos resultados indican una correlación positiva entre los tiempos de estimulación de melanopsin y su capacidad para desencadenar la señalización de Ca^{2+} en los procesos celulares de los astrocitos; lo que permite disponer de un rango temporal para la estimulación de melanopsin, y así controlar la sensibilidad de Ca^{2+} de los microdominios (Figura 4.5E).

Se ha descrito que melanopsin puede activar los canales K^+ dependientes de Ca^{2+} en neuronas corticales (McGregor et al., 2016). Para comprobar si melanopsin inducía cambios a nivel de membrana, se registraron astrocitos positivos para melanopsin (identificados por la expresión mCherry) mediante la técnica de patch-clamp.

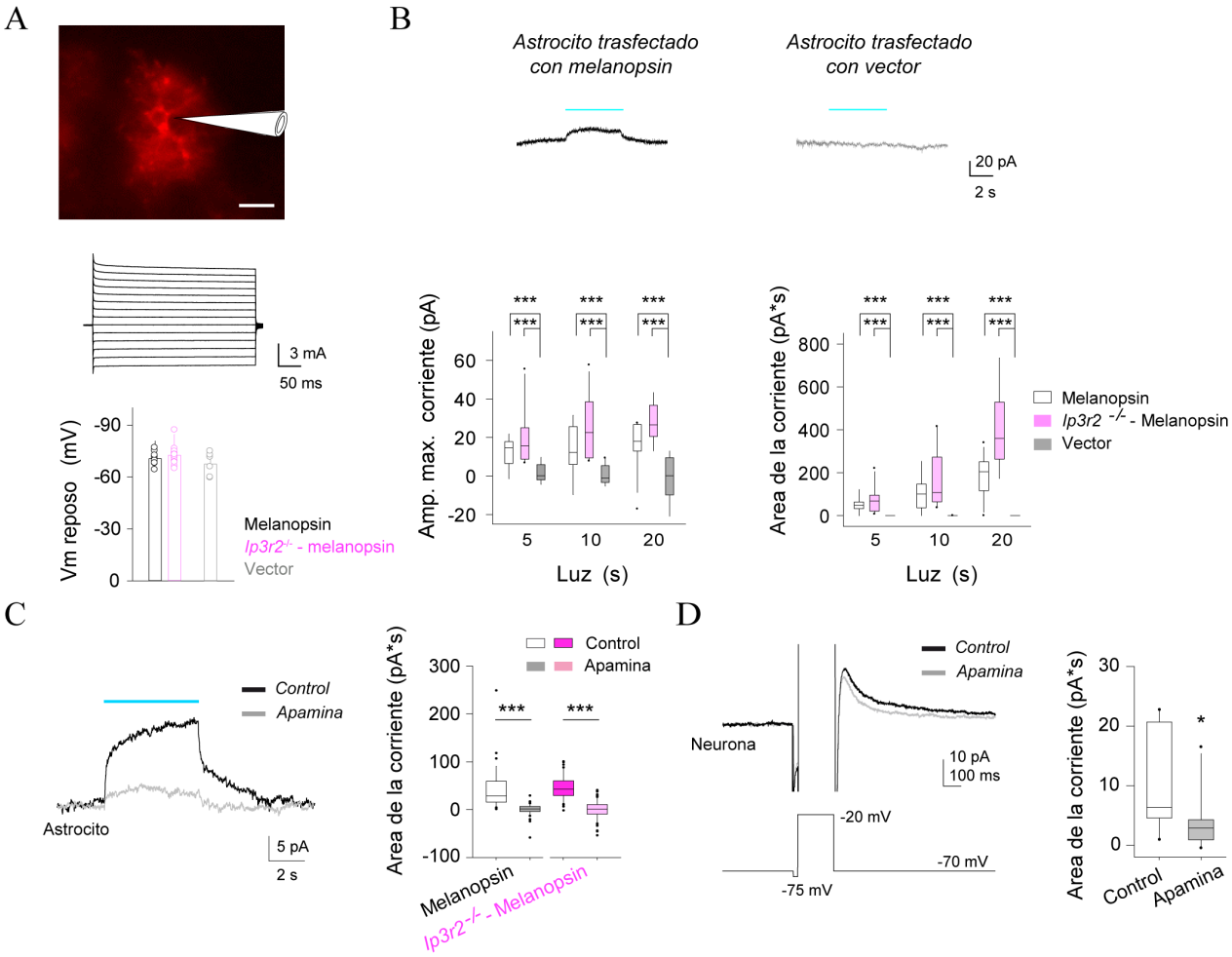


Figura 4.8 / ***La expresión ectópica de melanopsin induce corrientes de salida en la membrana de astrocitos.*** **A** Sup, Imagen de epifluorescencia de melanopsin-mcherry en astrocitos transfectados. Escala, 25 μm. Centro, Corrientes de membrana en respuesta a pulsos de voltaje. Inf, potencial de la membrana en reposo (VM) de los astrocitos registrados (melanopsin, n = 10; vectores, n = 6). No se encontraron diferencias entre los grupos; P>0,05, ANOVA one-way, post-hoc Dunn's. Datos se muestran como media ± SEM. **B** Sup, corriente inducida por estimulación de la luz (5s, barra azul) en astrocitos transfectados con melanopsin o vector. Inferior: valores de amplitud y área para las corrientes inducidas para melanopsin (blanco) en astrocitos positivos y astrocitos transfectados con vector (gris): 5s (n=8; n=9; respectivamente), 10s (n=7; n = 17; respectivamente) y 20s (n = 12; n = 8; respectivamente). P <0,001 para los astrocitos de melanopsin vs vector; ANOVA one-way, comparación post-hoc Dunn's. **C** Trazos representativos de las corrientes inducidas por la luz en astrocitos transfectados con melanopsin antes y después de aplicación de apamina (100 nM); Cuantificación del área media de las corrientes inducidas por la luz en astrocitos de animales Wt-Melanopsin antes y después de apamina (n = 39 de 6 astrocitos, P<0,001; ANOVA one-way, post hoc Dunn's). **D** Caracterización farmacológica de la corriente IAHP (corriente K+ dependiente de Ca^{2+}), en neuronas de CA1 en control y después de apamina. La cuantificación de los valores de área media del IAHP confirma la reducción de la corriente de potasio dependiente del calcio por apamina (n=10 de 4 neuronas; P = 0,019; ANOVA one-way, post hoc Dunn's.

En respuesta a los pulsos de luz se generaron corrientes de salida en los astrocitos (Figura 4.8B,C), específicas de la expresión de melanopsin, ya que no se observaron en astrocitos transfectados con vector (Figura 4.8B).

En línea con resultados previos (McGregor et al., 2016), la presencia de apamina (100 nM) en el medio extracelular, un antagonista selectivo de canales de K^+ dependientes de Ca^{2+}, redujo significativamente la área de la corriente inducida por la estimulación de melanopsin (Figura 4.8B). El efecto de apamina sobre las corrientes de K^+ dependientes de Ca^{2+} fue comprobado en neuronas piramidales de CA1, mostrando su capacidad para bloquear los canales de K^+ responsables de esta corriente (Figura 4.8D). En conjunto, estos datos demuestran que la expresión de melanopsin en astrocitos de hipocampo es efectiva en desencadenar respuestas tanto a nivel de membrana como a nivel intracelular con aumentos de Ca^{2+}.

4.1.2. La activación de melanopsin en astrocitos aumenta la eficacia de la transmisión sináptica

Se ha descrito que la actividad de astrocitos a través de la señalización por Ca^{2+} intracelular es capaz de modificar la fisiología sináptica, incluyendo la regulación de la transmisión sináptica y la plasticidad a largo plazo ((Araque et al., 2014), ver Introducción 1). Por tanto, investigamos si las señales de Ca^{2+} en astrocitos debidas a la activación por melanopsin, tenían un impacto en la actividad neuronal local mediante el registro de corrientes postsinápticas excitadoras (EPSC) inducidas en las neuronas piramidales de CA1 (Figura 4.9). Pese a que pulsos de luz de 1s producían aumentos de Ca^{2+} en los microdominios (Figura 4.7), no se encontraron cambios significativos en la transmisión sináptica tras pulsos cortos de luz, es decir, 1 y 3 s (Figura 4.9). Sin embargo, tras estímulos mayores de 5s se observó un aumento transitorio sobre la transmisión sináptica basal (Figura 4.9).

Encontramos que pulsos de luz largos (20s) inducían una potenciación transitoria de los EPSCs (118,52 $\pm$ 8,37; n = 15; P = 0,044; (Figura 4.9C), sin modificar la corriente de membrana necesaria para mantener fijo el potencial de membrana Figura (4.9C), descartando así una despolarización de la neurona postsináptica derivada de la estimulación con melanopsin. Para determinar si estos cambios sinápticos a corto plazo eran consecuencia de modificaciones presinápticas o postsinápticas se calculó el coeficiente de variación (CV) de los EPSCs en respuesta a diferentes pulsos de luz (ver Capítulo Materiales y Métodos).

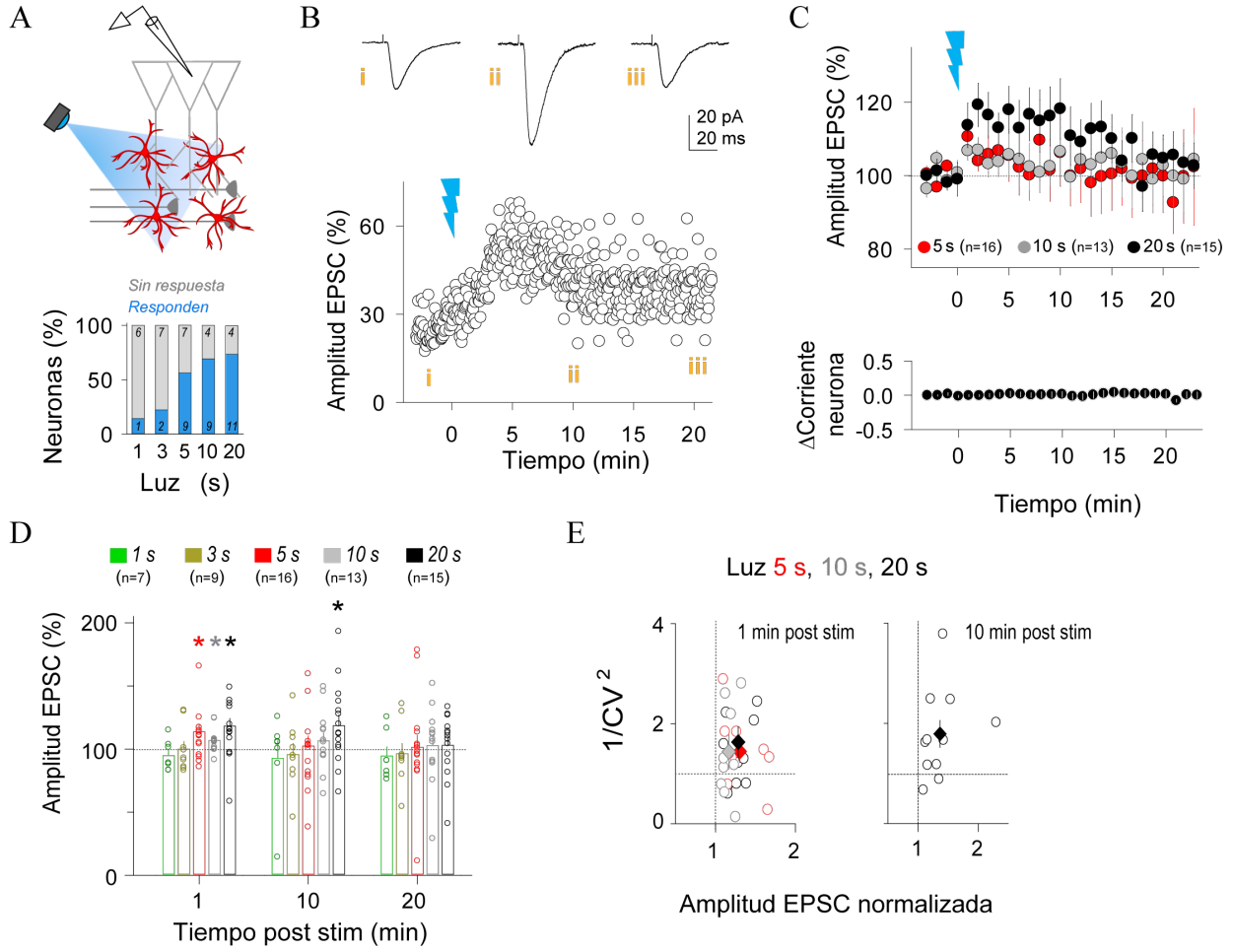


Figura 4.9 / ***La activación por luz de astrocitos que expresan melanopsin induce la potenciación de la transmisión sináptica excitadora en neuronas de CA1.*** **A.** Sup, esquema del diseño experimental de los registros de neuronas piramidales. Inf, porcentaje de neuronas que muestran cambios sinápticos después de la estimulación por luz azul de astrocitos. **B.** Corrientes sinápticas excitadoras (EPSCs) antes (i) y después de la estimulación (ii, ii), y un registro representativo de una neurona de CA1 mostrando la amplitud de sus EPSC a lo largo del tiempo ante un pulso 20s sobre los astrocitos (el rayo azul denota estimulación lumínica). **C.** Sup, promedio de la amplitud relativa de los EPSC con el tiempo antes y después de la estimulación de los astrocitos con diferentes pulsos luz (5s, n=16 neuronas; 10s, n=13 neuronas; 20s, n = 15 neuronas). Inf, índice para el valor de corriente de la membrana (corriente de holding) de las neuronas a estímulos de 20s de astrocitos (n=15 neuronas). **D.** Amplitud relativa de los EPSCs después de la estimulación de la luz (1 – 20s) en diferentes puntos de tiempo de todas las neuronas registradas. Valores registrados a 10 min después de 1s (media: 92,82 %; SD: 36,36 %; SEM: 13,74 %; n = 7), 3 s (media: 95,74 %; SD: 26,26 %; SEM: 8,75 %; n = 9), 5s (media: 102,45 %; SD: 31,83 %; SEM: 7,96 %; n = 16), 10s (media: 106,55 %; SD: 23,79 %; SEM: 6,59 %; n = 13) y 20s (media: 118,52 %; SD: 32,42 %; SEM: 8,37 %; n = 15); 5s: 1 min (p=0,013); 10s: 1 min (p=0,021); 20s: 1 min (p=0,020), 10 min (p = 0,044); t-test páreado. **E.** Izda, cambios relativos del coeficiente de variación en relación a la amplitud de la EPSC 1 min después de pulsos de luz. Dcha, cambios relativos del CV medidos 10 min después de la estimulación de los astrocitos. p>0,05, t-test pareado. Datos se muestran como media ± SEM.

Este análisis indicó que la potenciación transitoria se debía a a mecanismos presinápticos subyacentes (Figura 4.10).

Para confirmar el efecto presináptico de la acción de melanopsin sobre la transmisión sináptica se registraron las respuestas sinápticas excitadoras miniatura (mEPSCs) antes y después de la estimulación con luz (20s). Los mEPSCs mostraron un aumento transitorio de su frecuencia, pero sin cambios en su amplitud (Figura 4.10A, B). Además, mediante patch-clamp en la configuracion célula entera de astrocitos transfectados con melanopsin se analizaron las corrientes de membrana dependientes del transportador de glutamato (Devaraju St Jude et al., 2013). Después de la estimulación de 20s de luz se observó un aumento en la amplitud de la corriente (Figura 4.10C), derivada del aumento de glutamato en el espacio extracelular.

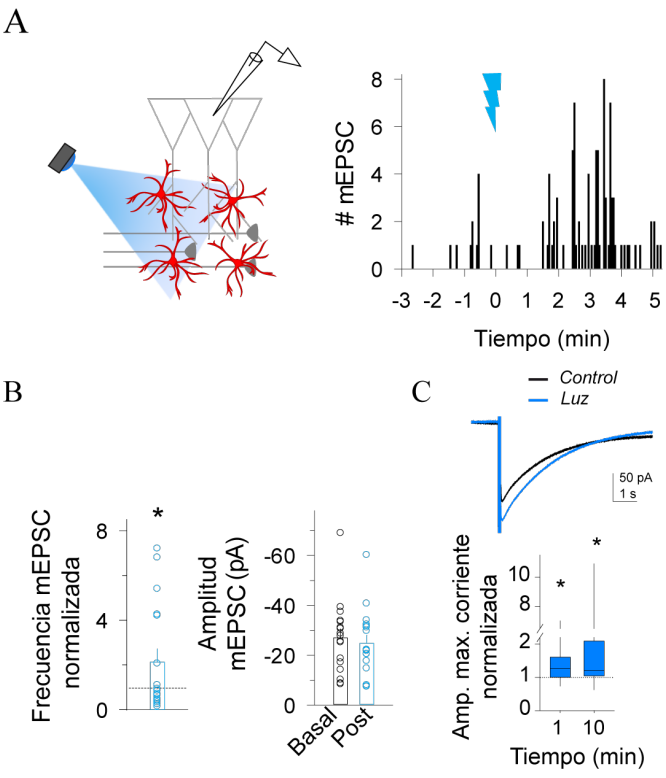


Figura 4.10 / ***La activación de melanopsin potencia la liberación de glutamato en los terminales sinápticos.*** **A.** Esquema aproximación experimental y registro representativo de frecuencia de mEPSC (TTX, 1 μM). Luz 20s. **B.** Izda, cambios relativos de la frecuencia de mEPSC después de 20s de luz (promedio 5 min post Stim; n=17; P=0,04; t-test). Dcha, cambios de amplitud del eventos . P >0,05, t-test. **C.** Sup, trazos representativos de las corrientes de GluT inducidas por la estimulación sináptica de las Colaterales de Schaffer(1 s @ 200 Hz) antes (control, en negro) y después de 20 s de estímulo de luz (en azul). Inf, valor del pico de corriente de GluT normalizado después de 20 s de estímulo de luz (1 min, P = 0,034; 10 min, P = 0,026; n = 9 astrocitos). * P <0,05, t-test pareado. Los datos se muestran como media ± SEM.

Todos estos datos permiten concluir que la estimulación de astrocitos con melanopsin aumenta significativamente la transmisión sináptica glutamatérgica en los circuitos hipocampales de CA1 (produciendo una STP en las sinapsis).

Para evaluar si estímulos de mayor duración (>20s) podían aumentar la eficacia de la

modulación sináptica, se aplicaron pulsos de luz de 60s continuos y estímulos a 10 Hz (pulsos de 50 ms de luz) durante 60s. Se observó que tras estos protocolos, tanto la amplitud como la duración de la modulación sináptica no incrementaban sus valores respecto a los observados con pulsos de 20s de luz (Figura 4.11A).

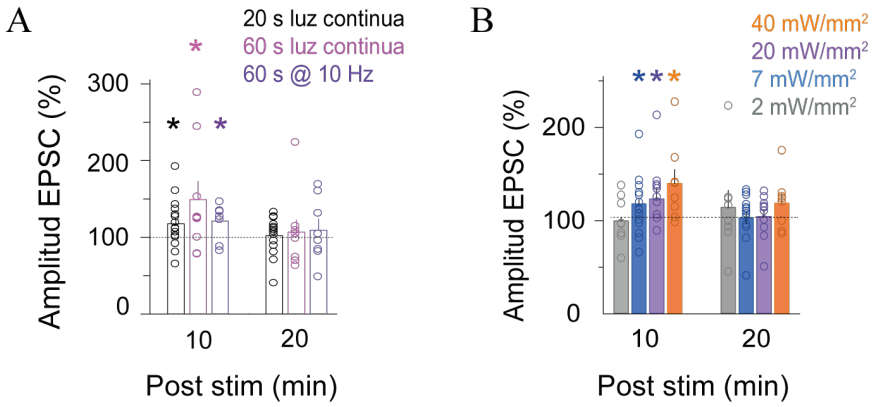


Figura 4.11 / ***Modificaciones de las condiciones estimulación con melanopsin.*** **A.** Cambios relativos de la amplitud de los EPSC inducidos por 20 s y pulsos más largos: estimulación continua de luz 60 s (n = 9; 10 min, p = 0,020), y 10 Hz durante 60 s (n = 8; 10 min, p = 0,039). Nótese que los pulsos más largos no inducen cambios sinápticos a largo plazo, y no se encontraron diferencias entre 20s vs pulsos de luz más largos. p = 0,515; ANOVA de una vía, comparación post hoc con la prueba de Dunn. p <0,05. **B.** Cuantificación de los cambios de amplitud de los EPSC inducidos por pulsos de luz de 20 s a diferentes intensidades a los 10 y los 20 min después de la estimulación (10 min: 2 mW/mm$_2$, n = 8, p = 0,912; 7 mW/mm$_2$, n=15, p=0,044; 20 mW/mm$_2$, n=8, p = 0,035; 40 mW , n = 9, p = 0,020; prueba t emparejada). Nótese que no se encontraron diferencias significativas para la potenciación sináptica inducida de 7 mW/mm$_2$ a 40 mW/mm$_2$ (p=0,354; ANOVA one-way, comparación post hoc Dunn's). p <0,05.

Asimismo, analizamos si la respuesta sináptica podía estar modulada por la intensidad del estímulo. Para ello, se utilizó un rango de luz de 2 a 40 mW/mm2 cuantificando el grado de modulación sináptica inducido por cada una de ellas. Se observó que la amplitud de la potenciación sináptica, inducida por melanopsin se produjo a partir de intensidades $\geq$ 7 mW/mm$_2$ (siendo la referencia intensidad utilizada en este estudio) (Figura 4.11B). Notablemente, no se observó ninguna mejora adicional de la duración de la modulación de los EPSCs a intensidades iguales o mayores a 7 mW/mm2 (7 mW/mm2 frente a 40 mW/mm2; P= 0,354) (Figura 4.11B).

De forma complementaria, se realizaron ensayos de transfecciones virales con el vector reportero (AAV2/5-GFAP-mCherry), para detectar posibles efectos colaterales de la propia infección en las respuestas de Ca^{2+} y transmisión sináptica en astrocitos y neuronas.

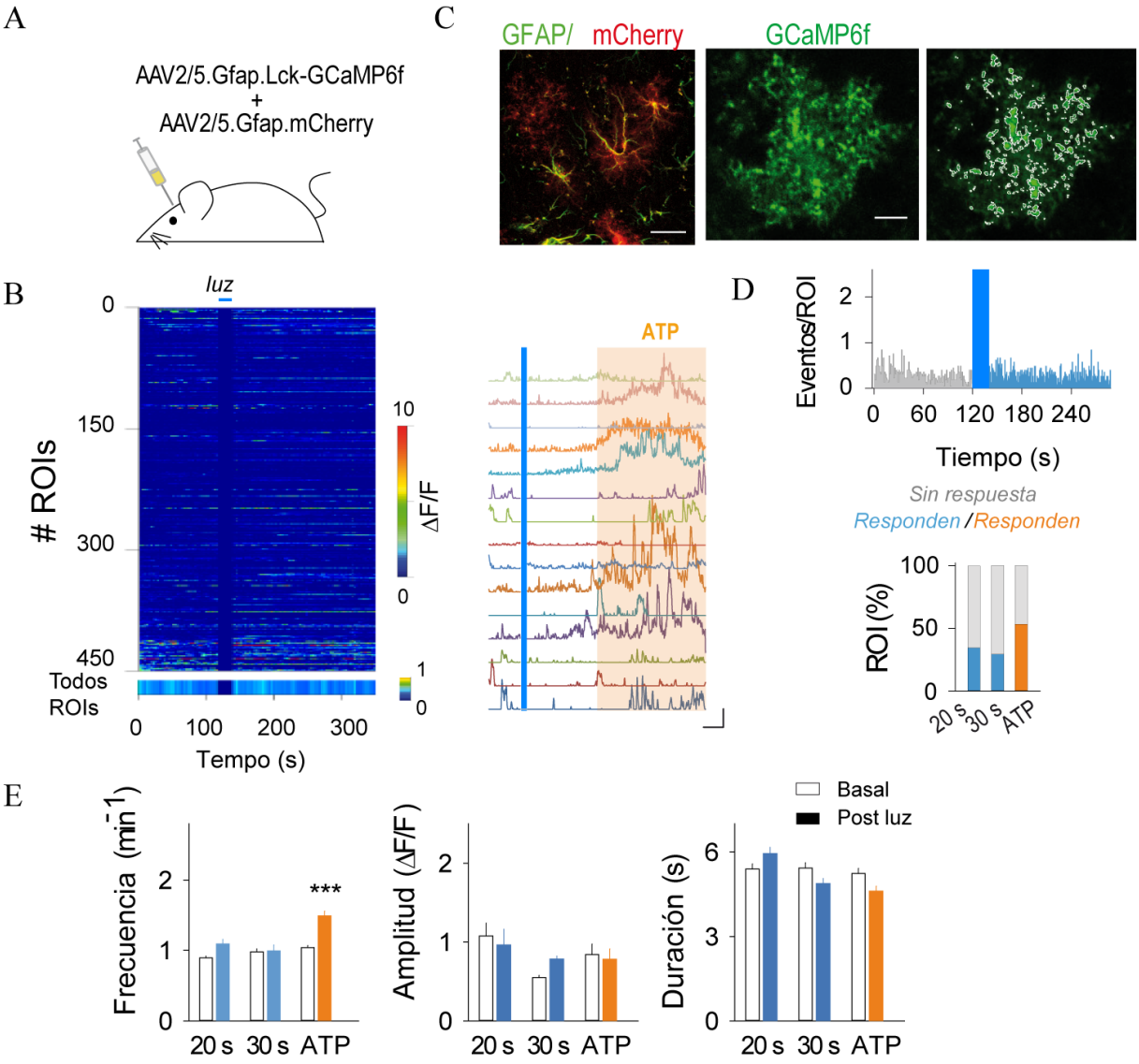


Figura 4.12 / ***Señales de Ca^{2+} en astrocitos transfectados con vector.*** **A** Estrategia viral para la expresión selectiva de AAV2/5-GFAP-mCherry (vector) y AAV2/5-GFAP-Lck-GCaMP6f en astrocitos.**B** Izda, Gráfico representativo de la actividad de los ROIs, código de intensidad de color para cambios de fluorescencia (sup, n = 450) y la actividad poblacional promedio de ROIs (inferior, n = 456). Dcha, trazos representativos de las señales Ca^{2+} por la estimulación de la luz (20 s; barra azul) y en presencia de ATP (5 μM), para estimular las señales Ca^{2+} en los astrocitos transfectados (sombreado naranja), confirmando la capacidad de estas células para aumentar sus niveles de Ca^{2+}. Escala, 8 δF/F, 80 s. **C** Izda, inmunocitoquímica de GFAP (verde) y mCherry (rojo) en los astrocitos hipocampales, e imagen representativa de Lck-GCaMP6f de un astrocito, y de los ROIs identificados. Escala, 25 y 10 μm; respectivamente. **D** Izda, histograma de la frecuencia de eventos en respuesta a luz 20s (n = 456). Dcha, %ROIs mostrando un evento durante los primeros 20s después de la estimulación (20s, n=157; 30 s, n=62; ATP, n=239; 10 rodajas de 2 ratones). **E** Análisis de las propiedades de los eventos de Ca^{2+}, frecuencia, amplitud y duración para 20s (n = 456), 30s (n=211) y la perfusión en el baño de ATP (n=448; P <0,001). P <0,001; ANOVA two-way, post-hoc Tukey-Kramer. Datos se muestran como media ± SEM.

La Figura 4.12 muestra cómo la estimulación de astrocitos transfectados con vector y Lck-GCaMP6f con pulsos de luz de 20 y 30 s no produjo aumentos de Ca^{2+} en los procesos astrocitarios. Sin embargo, estas células y los ROIs seleccionados sí mostraron aumentos de Ca^{2+} tras la estimulación con ATP (5 mM) lo que indicaba la viabilidad de las células para producir señales de Ca^{2+} intracelular (Figura 4.12).

El estudio de la respuesta sináptica en los animales transfectados con el virus vector no mostró cambios respecto a la situación basal tras la estimulación con diferentes pulsos de luz (97,31 ± 11,64 % valores normalizados frente al control después de la estimulación de 20 s; n=15; P=0,169), lo que excluyó que la transfección viral o la estimulación óptica pudieran contribuir por si mismos a los cambios observados con melanopsin (Figura 4.13).

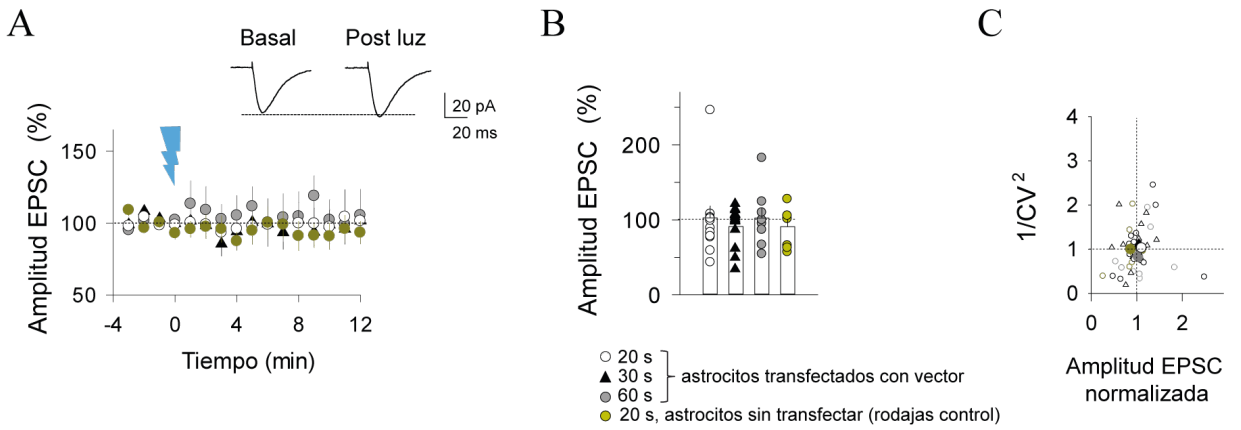


Figura 4.13 / *Estimulación de astrocitos transfectados con vector no provoca cambios sinápticos.* **A.** Curso temporal de la respuesta media de los EPSCs, se muestra la amplitud normalizada. **B.** Cambios relativos de amplitud de los EPSC 10 min después de impulsos de luz de 20s (n=15), 30 s (n=15), 60s de estimulación (n=8) y rodajas no transfectadas (n=8). **C.** Valores de CV 10 minutos post estimulo. Nótese que el análisis del CV no muestra desplazamientos sobre el eje de valores 1-1 dado que no hay modificaciones sinápticas.

4.1.3. ChR2 estimula la señal de Ca^{2+} en astrocitos y la modulación sostenida de la transmisión sináptica

ChR2 ha sido utilizada de forma exitosa en astrocitos y hasta la fecha representa la opsina más comunmente utilizada para la activación de estas células (Gourine et al., 2010; Pelluru et al., 2016; Perea et al., 2014; Sasaki et al., 2012; Shen et al., 2017). Con el fin de analizar las características y consecuencias del uso de ChR2 para la activación de astrocitos se utilizaron las mismas condiciones de luz que las aplicadas a melanopsin (Figura 4.5).

Se siguió una estrategia viral análoga (AAV2/5-GFAP-ChR2-mCherry), y los eventos Ca^{2+} fueron monitorizados mediante la expresión selectiva de Lck-GCamp6f para el registro de microdominios, y cyto-GCaMP6f para el registro de Ca^{2+} en el soma (Figura 4.14).

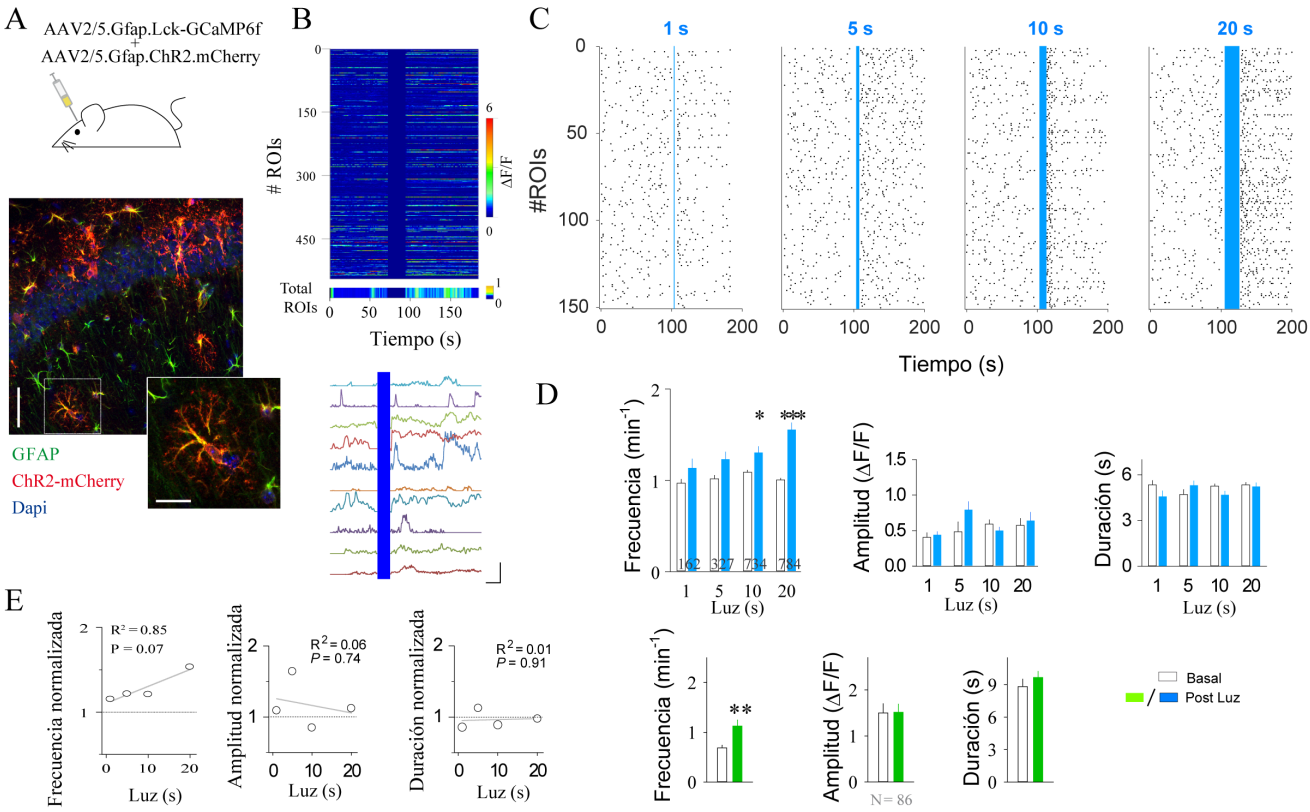


Figura 4.14 / ***La activación selectiva de ChR2 de los astrocitos hipocampales estimula la señalización de Ca^{2+}.*** **A.** Sup, transfección viral de AAV2/5-GFAP-Lck. GCaMP6f y AAV2/5-GFAP-ChR2-mCherry en astrocitos de hipocampo. Inf, inminucitoquímica de ChR2-mCherry (rojo), GFAP (verde), y DAPI (azul). Detalle de astrocito representativo. Escala, 50 y 20 μm; respectivamente. **B.** Sup, gráfica de actividad representativa de los microdominios en respuesta a estimulación 20s (superior, n = 500) y actividad poblacional promedio (inferior, n = 784). Inf, trazos representativos de las señales Ca^{2+} inducidas por la estimulación de la luz ChR2 (20s; barra azul). Escala, 1,5 DF/F, 25 s. **C.** Análisis de las propiedades de Ca^{2+} para microdominios (azul) y somas (verde) mostrando las respuestas medias para la frecuencia, amplitud y duración con los cambios normalizados a las condiciones de reposo (1s, n = 162 de 237 (62,35 %); 5s, n = 327 de 451 (72,50 %); 10s, n = 734 de 851 (86,25 %); 20s, n = 784 de 821 (95,49 %); 25 rodajas de 5 ratones) y análisis de propiedades somáticas de eventos de Ca^{2+} (n = 86 de 3 ratones). **P <0,01, ANOVA one way ANOVA, Post-hoc Tukey-Kramer. **D.** Ajuste lineal entre diferentes condiciones de estímulos, R2 se muestra para cada gráfico. Análisis ANOVA two-way, post-hoc Tukey-Kramer; P>0,05. **E.** Gráficos que muestran ROIs representativos señalando para cada uno el inicio del evento en diferentes condiciones de luz, 1s, 5s, 10s y 20s (n = 150). La barra azul denota estimulación.

Observamos que pulsos de luz >10 s producían aumentos en la frecuencia de eventos de Ca^{2+} en los microdominios (Figura 4.14C), sin afectar la amplitud de los eventos o su

duración (Figura 4.14D), sin embargo, no se detectaron cambios en las señales de Ca^{2+} tras la estimulación de ChR2 con pulsos de luz de corta duración (1 y 5 s; (Figura 4.14D).

El análisis de la respuestas de Ca^{2+} somáticas inducidas por ChR2 fueron evaluadas tras pulsos de luz de 20s, revelando la capacidad de ChR2 para reclutar aumentos de Ca^{2+} a nivel del soma en astrocitos (Figura 4.14D).

Por otro lado, se realizaron registros electrofisiológicos de astrocitos transfectados con ChR2 que mostraron cómo la estimulación con la luz evocaba corrientes de entrada en los astrocitos, confirmando la expresión funcional de ChR2 en estas células (Lin, 2011; Arenkiel et al., 2007) (Figura 4.15).

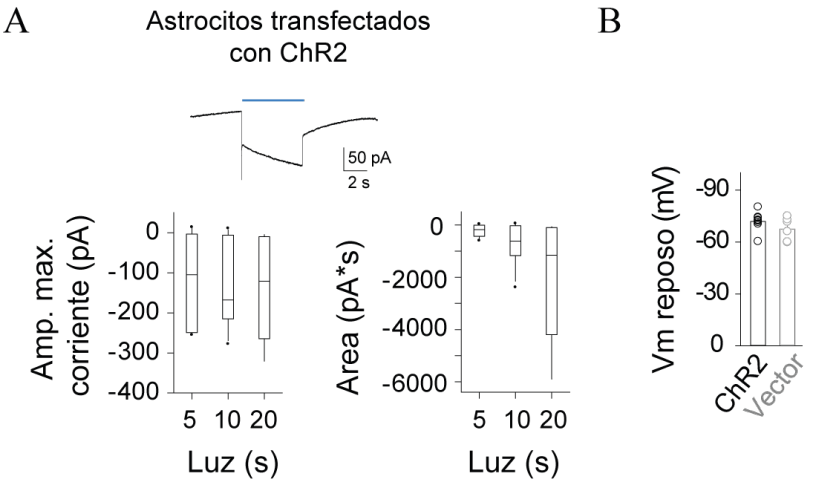


Figura 4.15 / *Propiedades electrofisiologicas astrocitos-ChR2.* **A.** Sup, Corriente de entrada inducida por la activación con luz de ChR2 (pulso de luz de 5s, barra azul). Inf, corrientes inducidas por ChR2 en diferentes condiciones: 5s (n=10), 10s (n=11) y 20s (n=5). P>0,05; ANOVA One-way, post-hoc Dunn's. **B.** Potencial de membrana en reposo (VM) (ChR2, n=9; vector, n=6). No se encontraron diferencias entre los grupos; P = 0,171; t-test.

Posteriormente, bajo las mismas condiciones experimentales usadas con melanopsin, evaluamos la capacidad de los astrocitos transfectados con ChR2 para modular la transmisión sináptica en las neuronas CA1 (Figura 4.16). Se observó una potenciación sináptica transitoria después de 5s de estimulación óptica; y una modulación sináptica de mayor amplitud y sostenida, al menos 20 min después del estímulo, tras estímulos de luz >10s de duración (154,05 ± 12,99 % para pulso de luz de 20 s; n = 13; P = 0,008; Figura 4.16C).

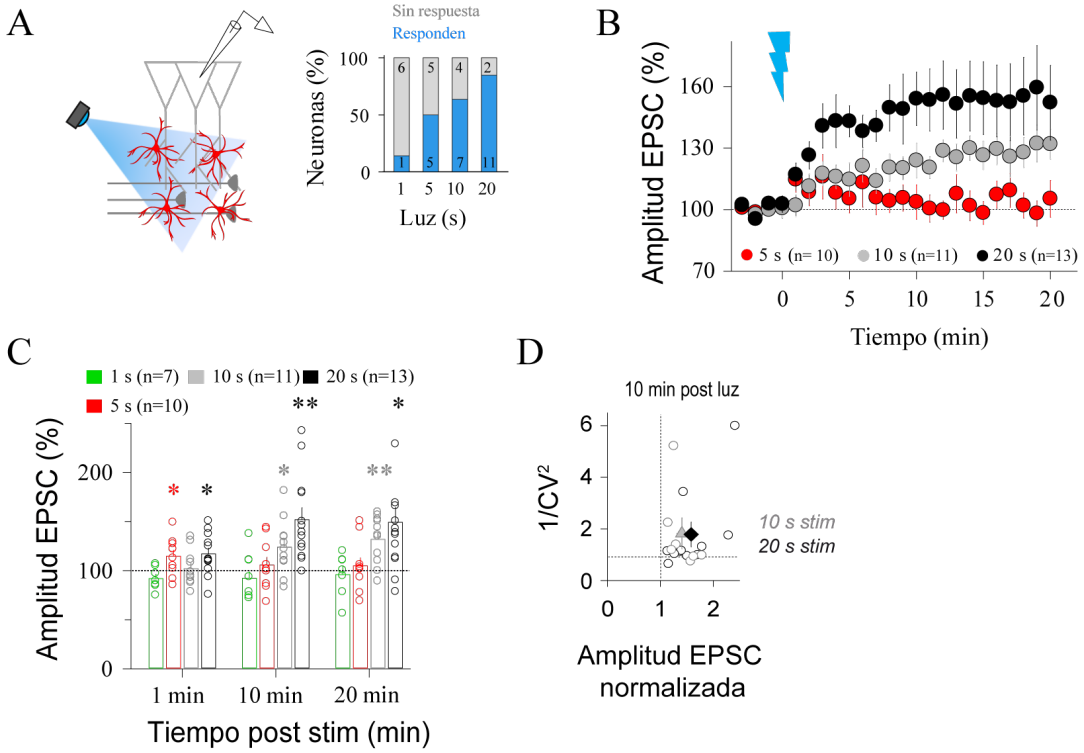


Figura 4.16 / *Modulación sináptica inducida por estimulación de ChR2.* **A.** Esquema de diseño experimental para registros de neuronas de CA1 y porcentaje de neuronas que muestran cambios sinápticos después de la luz. **B.** Promedio de los cambios relativos de la amplitud de los EPSC en el tiempo bajo diferentes condiciones de estimulación luz (1 s, n=7; 5 s, n=10; 10 s, n=11; 20 s, n=13). El tiempo cero indica pulso de luz. **C.** Cambios relativos de la amplitud de la EPSC por estimulación ChR2 en diferentes puntos. Valores registrados a 10 min después de la estimulación de ChR2 con 1s (media: 96,72 %; SD: 24,21 %; SEM: 9,15 %; n=7), 5s (media: 105,62 %; SD: 24,53 %; SEM: 7,76 %; n=10), 10s (media: 123,97 %; SD: 28,09 %; SEM: 8,47 %; n=11) y 20s (media: 151,95 %; SD: 43,74 %; SEM: 12,13 %; n=13). 5s: 1 min (p = 0,039); 10 s: 10 min (p=0,018), 20 min (p = 0,001); 20 s: 1 min (p = 0,012), 10 min (p = 0,001), 20 min (p = 0,008). * p<0,05,**p<0,01; t-test pareado. **D.** Cambios relativos del CV medidos a 10 min post estimulación de ChR2 (10s, n=9; 20s, n=9).

El análisis de las repuestas sinápticas mostró mecanismos de acción presináptica que subyacen a la potenciación inducida por ChR2 (Figura 4.16D) (Perea et al., 2014).

Considerando las diferencias observadas con el uso de estas dos opsinas, se compararon las respuestas de Ca^{2+} en astrocitos y las respuestas sinápticas inducidas por distintos pulsos de luz, 1 y 20 s, respectivamente (Figura 4.17). Se observó que protocolos de estimulación de 1s producían aumentos significativos en la frecuencia de eventos de Ca^{2+} en los microdominios de astrocitos transfectados con melanopsin, sin embargo, los astrocitos que expresaban ChR2 no mostraron modulación alguna (Figura 4.17A).

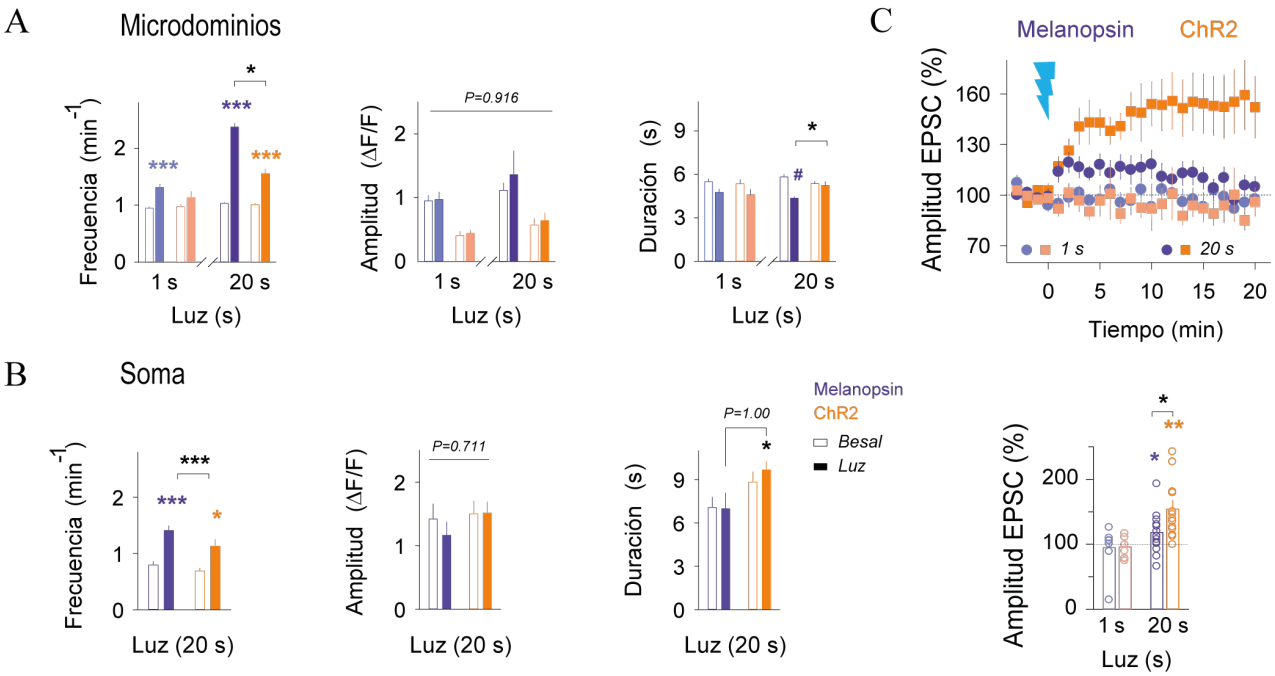


Figura 4.17 / ***Comparativa de las respuestas inducidas por melanopsin y ChR2 en las redes astrocito-neurona del hipocampo.*** **A.** Análisis de las propiedades de eventos de Ca^{2+} inducidos por melanopsin (púrpura) y ChR2 (naranja) en microdominios tras 1 y 20 s de estimulación lumínica. Nótese que la estimulación de melanopsin a 1 s aumentó la frecuencia de eventos Ca^{2+}, mientras que ChR2 no provocó cambios; 20s de luz evocó mayor frecuencia promedio en astrocitos transfectados con melanopsin que aquellos que expresaban ChR2 (p = 0,021). Adicionalmente, después de 20s de luz melanopsin, pero no ChR2, los eventos de Ca^{2+} inducidos disminuían su duración (p = 0,045). ANOVA two-way, post hoc Tukey–Kramer. **B.** Propiedades somáticas de eventos de Ca^{2+} registrados con GCaMP6f-cyto-Melanopsin y GCaMP6f-Cyto-ChR2 para estimulación de luz de 20s. Los cambios en la frecuencia de los eventos fueron mayores para melanopsin (p <0,001) que para los astrocitos transfectados con ChR2 (p = 0,01), mientras que la amplitud y la duración de los eventos de Ca^{2+} no mostraba diferencias (p = 0,711 y p = 1,00; respectivamente). ANOVA two-ways, comparación post hoc Tukey–Kramer. **C.** Sup: Cambios relativos de la amplitud de los EPSC a 1 y 20 s de estimulación de la luz en el tiempo. Tiempo cero indica pulso de luz (rayo azul). Inf, valores medios de la amplitud de los EPSC post 10 min luz . Se encontraron diferencias entre los pulsos de luz de 20 s. p = 0,014; t-test. *p <0,05; , # p <0,001. Datos se muestran como media ± SEM.

En el caso de protocolos de estimulación óptica de 20 s, tanto melanopsin como ChR2 inducían aumentos de Ca^{2+} en los microdominios y en el soma de los astrocitos transfectados (Figura 4.17A,B). Sin embargo, la potencia de la respuesta fue mayor en el caso de melanopsin, alcanzando valores de frecuencia de eventos de Ca^{2+} significativamente superiores a ChR2 (Figura 4.17A,B). Estos resultados parecen indicar una mayor sensibilidad de melanopsin para reclutar señales de Ca^{2+} en astrocitos.

Por su parte, las respuestas sinápticas mostraron un comportamiento opuesto. Si bien pulsos cortos de luz para estimular melanopsin o ChR2 no indujeron modulación alguna en las sinapsis registradas, pulsos de 20s provocaron respuestas completamente distintas (Figura 4.17C). Los astrocitos transfectados con melanopsin producían una potenciación transitoria de los EPSCs, mientras que astrocitos expresando ChR2 inducían una modulación de mayor amplitud y duración (mantenida >20 min post estímulo).

Se analizó si estas diferencias en sensibilidad demostradas por melanopsin y ChR2 en las señales de Ca^{2+} eran debidas a diferencias en la expresión de la opsina. El estudio de la expresión del reportero mCherry, fusionado a la opsina de interés, no mostró diferencias significativas en el patrón de expresión entre las distintas condiciones experimentales (Figura 4.18A,B).

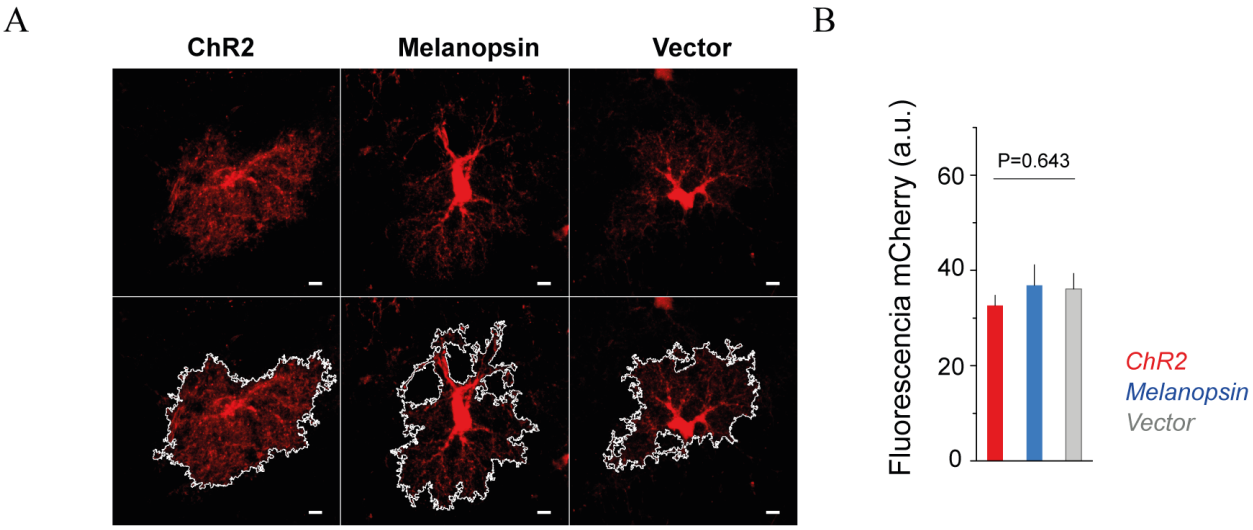


Figura 4.18 / ***Expresión del reportero mCherry de los distintos constructos virales.*** **A.** Imágenes de la fluorescencia de mcherry (paneles superiores) en astrocitos transfectados con ChR2, melanopsin y vector. La máscara superpuesta utilizada para el análisis se muestra en los paneles inferiores correspondientes. Escala, 5 μm. **B.** media de la señal de fluorescencia de mCherry, ChR2=2,59 ± 2,18, n=13 astrocitos; Melanopsin=36,86 ± 4,30, n =14 astrocitos; Vector =36,07 ± 3,31, n=11 astrocitos; P=0,643. P>0,05; ANOVA one-way,post-hoc Dunn's.

En conjunto, estos resultados sugieren una menor capacidad en el caso de ChR2 para conseguir un rango de modulación preciso para controlar tanto las señales de Ca^{2+} como las respuestas sinápticas, lo que destaca el papel de melanopsin, con una mayor sensibilidad para la señalización de Ca^{2+}, como herramienta para el control fino de la actividad de las redes astrocito-neurona. Dada la naturaleza de estas opsinas, las diferencias podrían estar

relacionadas con la forma en la que activan las vías de Ca^{2+} intracelulares en astrocitos.

4.1.4. La activación de melanopsin estimula vías acopladas a proteínas G y Ca^{2+} intracelular

La modulación de la transmisión sináptica por astrocitos se ha descrito tanto en base a mecanismos independientes como dependientes de Ca^{2+} (Bazargani and Attwell, 2016). A continuación se estudió si existía una relación causal entre la potenciación sináptica y el aumento de Ca^{2+} inducido por la activación de melanopsin. A través de la pipeta de registro se llenaron intracelularmente los astrocitos con un antagonista competitivo de la vía de proteínas G (Panda et al., 2005), GDPβS (20 mM) (Figura 4.19A). Después de 20-30 min que aseguraron la carga de los astrocitos con GDPβS, se estimuló con luz (20s), y se observó que no se inducía la potenciación sináptica (98,58 $\pm$ 9,20 % sobre el basal; n = 6; P = 0,820; Figura 4.19B). Además, se utilizó un quelante de Ca^{2+} BAPTA (40 mM), que al igual que en el caso anterior, se perfundió por la red astrocitaria a través de la pipeta de registro.

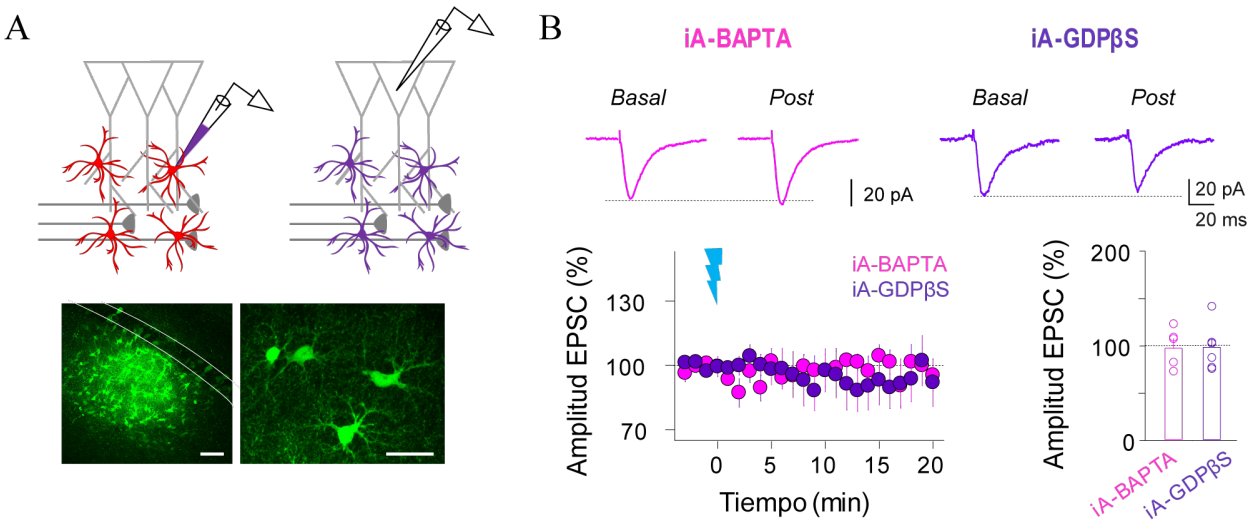


Figura 4.19 / ***Melanopsin desencadena señalización dependiente de Ca^{2+} y GPCR.*** **A.** Sup, Esquema carga intracelular de red astrocitaria con BAPTA o GDPβS a través de la pipeta de registro. Inf, imagen confocal del sincitio de astrocitos revelado por carga de biocitina a través de la pipeta de registro, y detalle de astrocitos cargados. Escala, 50 y 25 μm; respectivamente. **B.** Izda, Respuestas de EPSCs representativos antes y después de 20 s de estimulación de melanopsin tras el llenado con BAPTA y GDPbS en astrocitos. Dcha, Promedio de los cambios relativos de la amplitud de EPSCs registrados 10 min después de la estimulación de los astrocitos (BAPTA, 98,58$\pm$9,20 %; n=5; p=0,410; GDPβS, 97,59 $\pm$ 10,00 %; n = 6; p = 0,443). p >0,05; t-test páreado. Datos se muestran como media $\pm$ SEM.

En estas condiciones, la estimulación de los astrocitos no indujo cambios en los EPSCs (97,59 ± 9,99 % sobre el basal; n = 5; P = 0,885; Figura 4.19B),confirmando la contribución de las vías dependientes de proteínas G y de Ca^{2+} intracelular a la potenciación sináptica observada.

Debido a las limitaciones asociadas con las manipulaciones farmacológicas, y teniendo en cuenta que la activación de melanopsin induce la liberación de Ca^{2+} de los reservorios intracelulares sensibles a IP3 en las células ganglionares (Peinado et al., 2015), evaluamos la acción de melanopsin en ratones $Ip3r2^{-/-}$, que muestran una señalización disminuida de Ca^{2+} en los astrocitos (Agarwal et al., 2017; Navarrete et al., 2012; Sherwood et al., 2017; Srinivasan et al., 2015). Los ratones $Ip3r2^{-/-}$ fueron transfectados con melanopsin y Lck-GCaMP6f para evaluar eventos de Ca^{2+} transitorios espontáneos e inducidos por luz (Figura 4.20). En línea con resultados previos (Agarwal et al., 2017; Haustein et al., 2014; Srinivasan et al., 2015), se observó una señalización de Ca^{2+} disminuida en condiciones de reposo en los astrocitos de ratones $Ip3r2^{-/-}$ (Figura 4.20A-C).

La estimulación con luz no modificó las propiedades de los eventos de Ca^{2+} en los procesos de astrocitos que expresaban melanopsin, independientemente de cualquiera que fuese el protocolo de luz usado (Figura 4.20D). Para evaluar si melanopsin podría estimular las señales de Ca^{2+} en el soma de astrocitos, donde los reservorios de Ca^{2+} sensibles a IP3 desempeñan un papel importante, utilizamos cyto-GCaMP6f que fue expresado en astrocitos de ratones $Ip3r2^{-/-}$. El resultado de la estimulación mostró que la activación de melanopsin no conseguía evocar las señales Ca^{2+} en el soma (Figura 4.20), sugiriendo que la ruta de señalización de melanopsin implicaba de manera específica la señalización por IP3R2. Para comprobar si la expresión de melanopsin en astrocitos $Ip3r2^{-/-}$ era adecuada, se registraron las corrientes de membrana inducidas por melanopsin. En respuesta a los pulsos de luz, melanopsin indujo corrientes de salida de características similares a las observadas en astrocitos de ratones silvestres que también expresaban melanopsin (Figura 4.20F).

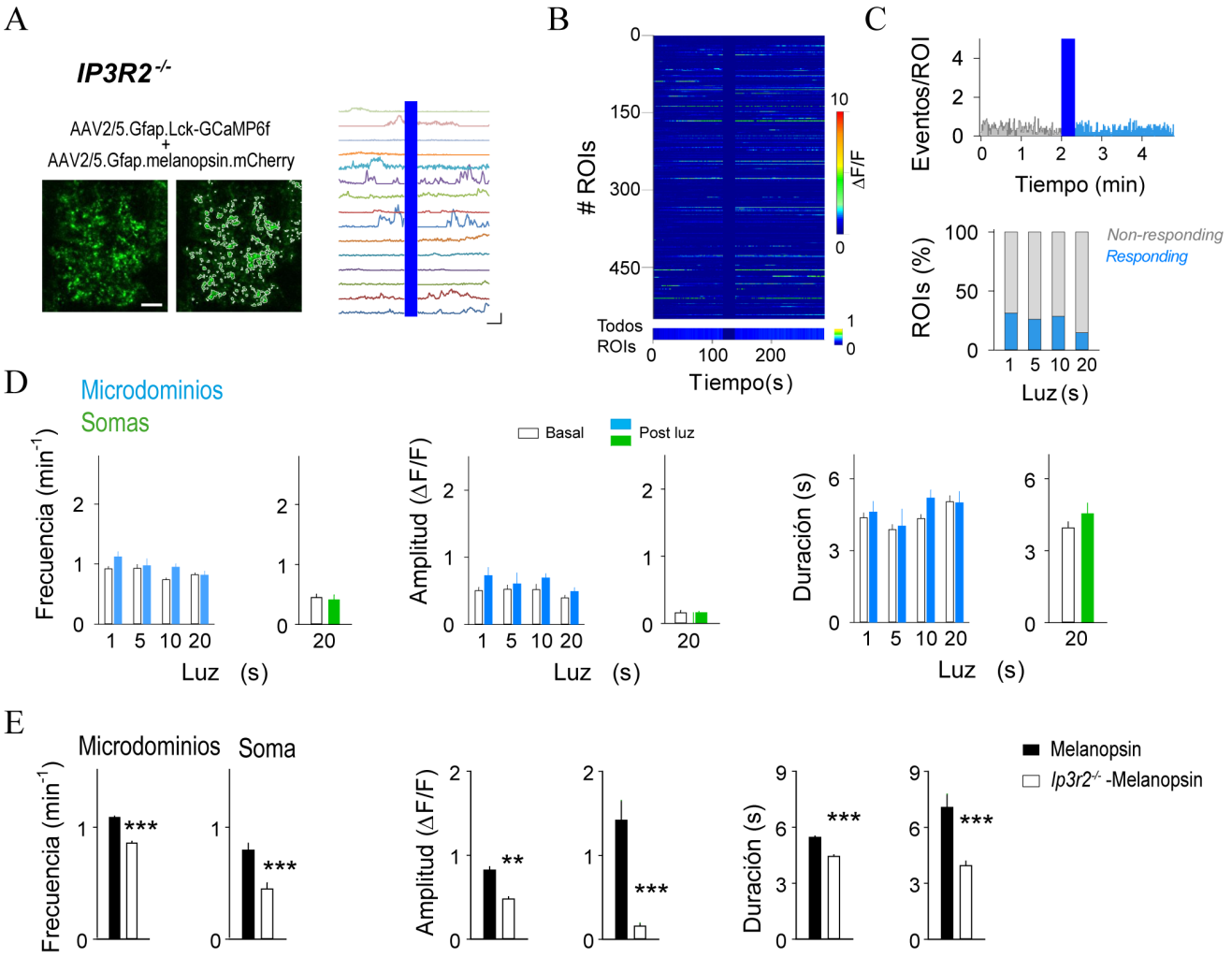


Figura 4.20 / ***Melanopsin desencadena señales de Ca^{2+} dependientes de Ip3R2 en los astrocitos.*** **A.** Izda, Imagen confocal de un astrocito marcado con GFAP-Lck-GCaMP6f en un ratón Ip3r2$^{-/-}$, y el mismo astrocito mostrando ROIs de los microdominios seleccionados identificados. Dcha, trazos representativos de señales Ca^{2+} inducidas por la estimulación de melanopsin (20 s; barra azul) en astrocitos Ip3r2 −/−. Escala, 10 μm; 3 DF/F, 25s. **B.** Sup, gráfica representativa de actividad de microdominios en ratones Ip3r2 −/− (n = 500), y actividad promedio de población de microdominios después de 20s de estimulación lumínica (inferior, n = 589). **C.** Sup, histograma de la frecuencia de eventos (20 s, n = 589). Inf, porcentaje de ROIs mostrando un evento durante los primeros 20 s después de la estimulación de la luz (1 s, n = 75; 5 s, n = 28; 10 s, n = 103, 20 s, n = 86; 19 rodajas de 4 ratones). **D.** Análisis de las propiedades de eventos de Ca^{2+} en los microdominios mostrando las respuestas medias para la frecuencia, amplitud y duración (1s, n = 238 de 531 (44,82 %); 5s, n = 105 de 405 (25,93 %); 10s, n = 359 de 759 (47,30 %); 20s, n = 589 de 789 (74,65 %); 19 rodajas; de 4 ratones). p>0,05. Las señales somáticas Ca^{2+} se registraron con Cyto-GCaMP6f a pulsos de 20s (n = 39 astrocitos, 10 rodajas de 3 ratones). p >0,05;ANOVA one-way, post hoc Tukey – Kramer. Nótese la ausencia de efectos sobre los eventos de Ca^{2+}.**E** Análisis de las propiedades de los microdominios en reposo comparando Lck - GCaMP6f Wt- melanopsin (negro; n = 3.816) y Ip3r2 −/− Melanopsin (blanco; n = 1.291). Análisis del Ca^{2+} en los somas en reposo (negro; n = 44) y Ip3r2 −/−Melanopsin-astrocitos (blanco; n = 39). **p = 0,001; ***p<0,001, ANOVA one-way, post hoc Tukey–Kramer.

Por tanto, estos resultados indican que la ausencia de respuestas de Ca^{2+} tras la estimulación de melanopsin en astrocitos de ratones $Ip3r2^{-/-}$ se debe a limitaciones en la movilización de Ca^{2+} intracelular y no a una disfunción de la opsina.

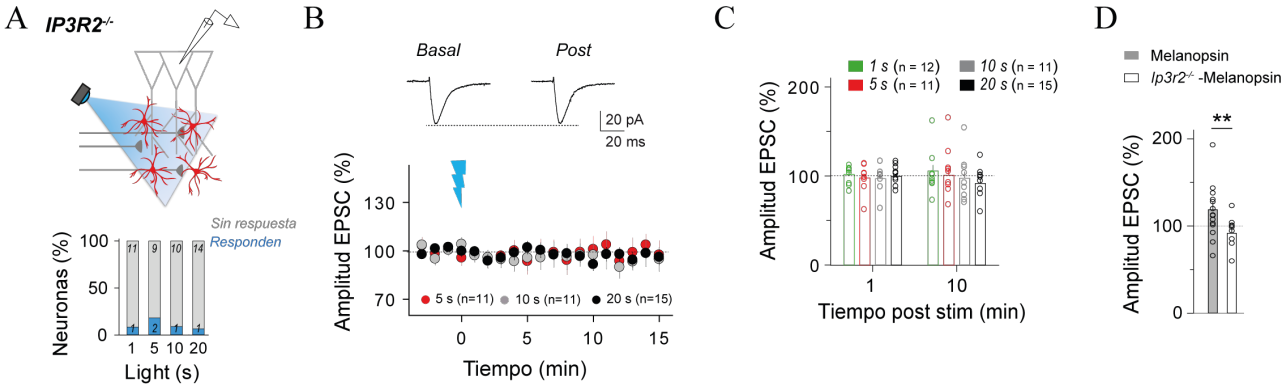


Figura 4.21 / *La modulación de la transmisión sináptica por melanopsin está ausente en ratones Ip3r2$^{-/-}$.* **A.** Esquema diseño experimental, y porcentaje de neuronas en ratones Ip3r2 −/− mostrando cambios sinápticos. **B.** Sup, EPSC representativos antes y después de 20s de activación óptica de astrocitos en ratones Ip3r2 −/−. Inf, promedio de la amplitud relativa de los EPSC en el tiempo. El tiempo cero indica pulso de luz (rayo azul). **C.** Cambios relativos de la amplitud de los EPSC en ratones Ip3r2 −/− por pulsos de luz (1s, n=12; 5s, n=11; 10s, n=11; 20s, n=15). Valores registrados a 10 min después de la activación de la luz de astrocitos Ip3r2 −/− con 1 s (media: 105,55 %; SD: 22,04 %; SEM: 6,36 %; n = 12), 5 s (media: 100,88 %; SD: 27,22 %; SEM: 8,21 %; n = 11), 10 s (media: 97,41 %; SD: 23,27 %; SEM: 7,02 %; n = 11) y 20 s (media: 91,57 %; SD: 14,82 %; SEM: 3,83 %; n = 15). p >0,05; t-test pareado. **D.** Análisis comparativo de los cambios inducidos en los EPSC después de la estimulación con 20 s (10 min después de stim). Obsérvese que los astrocitos Ip3r2−/− -melanopsin no evocan cambios sobre los EPSC comparados con los astrocitos control Melanopsin (p = 0,003; ANOVA one-way, post hoc Tukey–Kramer). ** p <0,01. Datos se muestran como media ± SEM.

Asimismo, registros de la actividad sináptica en neuronas de CA1 de ratones $Ip3r2^{-/-}$ no mostraron cambios en los EPSCs después de la estimulación de melanopsin (Figura 4.21). Por lo tanto, estos datos confirman que la potenciación sináptica mediada por melanopsin estaba asociada a la estimulación de las vías de señalización de Ca^{2+} dependientes de IP3 en astrocitos.

4.1.5. La señalización purinérgica es la responsable de la plasticidad sináptica inducida por melanopsin

A continuación evaluamos si los aumentos de Ca^{2+} inducidos por melanopsin se traducían en liberación de gliotransmisores y cuales serían los receptores implicados en los cambios sinápticos observados. La potenciación de los EPSCs se mantuvo en presencia de LY367385

(100 μM), un antagonista selectivo de los receptores metabotrópicos de glutamato de tipo I, mGluR1a (Figura 4.22A-B, (n=8 neuronas; P=0,046), que se ha relacionado previamente con la modulación sináptica inducida través de la liberación de glutamato por los astrocitos en el hipocampo (Gómez-Gonzalo et al., 2015; Perea and Araque, 2007) y otras áreas cerebrales (Martin et al., 2015; Perea et al., 2014; Sasaki et al., 2014). Por el contrario, la modulación de la transmisión sináptica es sensible a la señalización purinérgica (Di Castro et al., 2011; Gourine et al., 2010; Lalo et al., 2016; Panatier et al., 2011; Pougnet et al., 2014; Tan et al., 2017) y se bloqueaba presencia de MRS2179 (10 μM; 96,40 $\pm$ 6,16 % frente al basal; n = 12 neuronas; P = 0,571), un antagonista del receptor purinérgico P2Y1. Asimismo, en presencia de SCH58261 (10 μM; 100,86 $\pm$ 10,51 % del basal; n = 10 neuronas; P = 0,695),un antagonista del receptor A2A de adenosina, se producía el bloqueo de la potenciación sináptica inducido por melanopsin. Por el contrario, esta potenciación se mantenía al bloquear los receptores P2X con PPADS (Figura 4.22; 10 μ M; 143,57 $\pm$ 18,75 % frente al basal; n = 10 neuronas; P = 0,045). Por lo tanto, estos datos sugieren que la liberación de ATP/adenosina (ADO) por los astrocitos transfectados con melanopsin es la responsable de la modulación de la transmisión sináptica excitadora en el hipocampo.

Paralelamente, se estudiaron las propiedades moleculares de la modulación de la transmisión sináptica inducida por astrocitos transfectados con ChR2, comprobando que ésta se bloqueaba en presencia de LY 367385 (n = 11 neuronas; P = 0,899) y MRS 2179 (n = 8 neuronas; P = 0,491), y sin embargo, era insensible al antagonista del receptor purinérgico de adenosina, A2A (Figura 4.22B; n = 8 neuronas; P = 0,013). Así, estos resultados indicaron que mientras que melanopsin desencadenaba una modulación sináptica fundamentalmente purinérgica, la potenciación inducida por ChR2 requería de una señalización glutamatérgica y purinérgica.

Se analizaron las corrientes lentas de entrada dependientes de la activación de los receptores NMDA (SICs), en las neuronas de CA1. Dado que estas corrientes se han relacionado con el glutamato liberado por los astrocitos, podrían actuar como sensor de la liberación de glutamato por parte de los astrocitos transfectados con melanopsin ((Perea and Araque, 2005a; Shigetomi et al., 2008)). Tras la activación de melanopsin con pulsos de luz, las neuronas de CA1 mostraron un aumento significativo en la frecuencia de SICs (Figura 4.22C-D; 2,46 $\pm$ 0,77; n = 12; P = 0,007), indicando la capacidad de melanopsin para desencadenar la liberación de los diferentes gliotransmisores, tanto glutamato como ATP/adenosina.

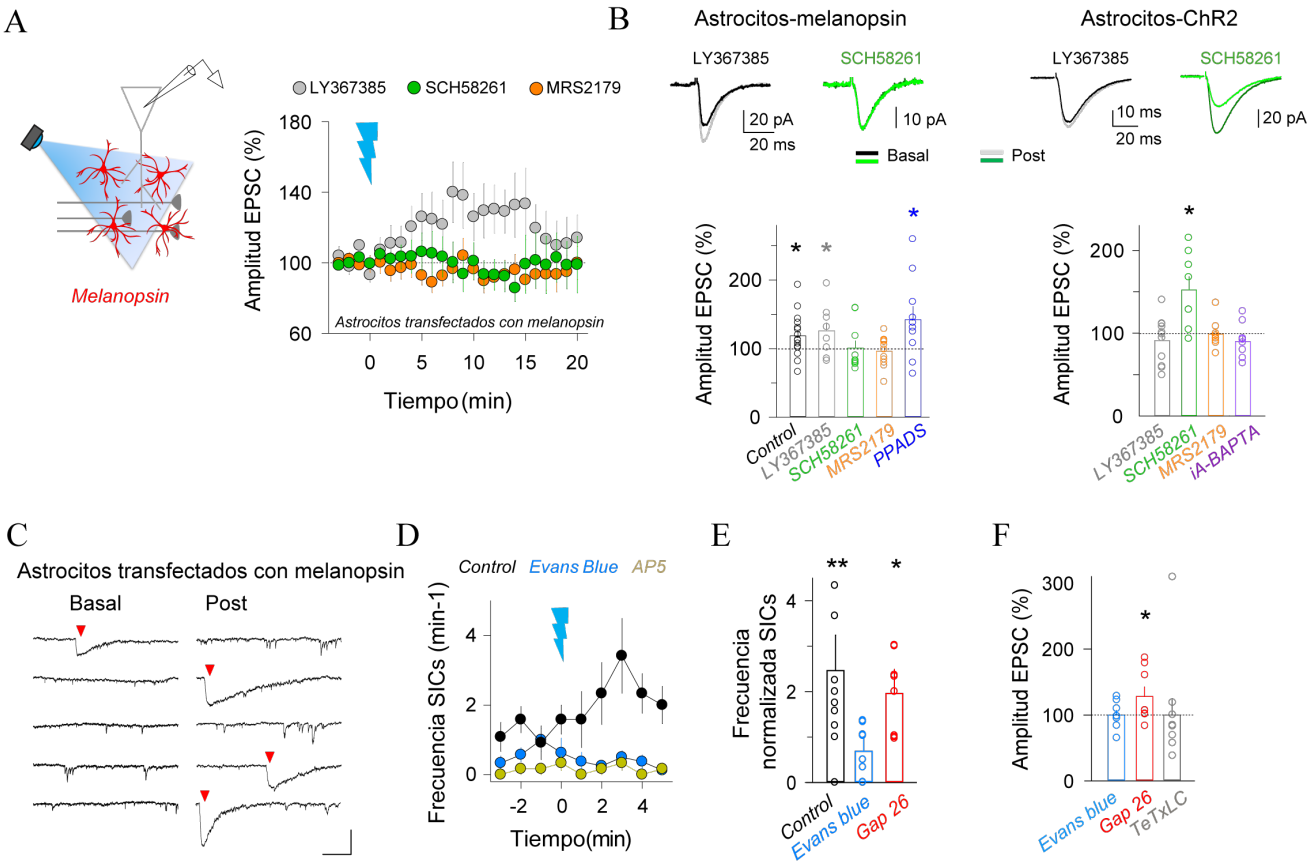


Figura 4.22 / ***La transmisión sináptica inducida por melanopsin requiere señalización purinérgica por parte de astrocitos.*** **A.** Esquema diseño experimental. Cambios en la amplitud relativa de los EPSC a lo largo del tiempo antes y después de 20s de estimulación de melanopsin en presencia de LY367385 (100 μM), SCH58261 (10 μM) y MRS2179 (10 μM). El tiempo cero indica pulso de luz (rayo azul). **B.** Sup: registro representativo de EPSC antes y después (10 min) de la estimulación de astrocitos en presencia de LY367385 (en negro/gris) y SCH 58261 (en verde). Inf, Izda, promedio de los cambios relativos de la amplitud de los EPSC inducidos por la estimulación de Melanopsin (20s de luz) en presencia de LY 367385 (n=8; p=0,046), SCH58261 (n=10), MRS2179 (n = 12) y PPADS (n = 10); * p <0,05; t-test páreado. Inf, Dcha, cambios en la amplitud de los EPSC inducidos por la estimulación de ChR2 (20s de luz) en presencia de LY367385 (n = 11), SCH58261 (n = 8; p = 0,013), MRS2179 (n = 8), y después de la carga de astrocitos intracelulares con BAPTA (n = 8). * p <0,05; t-test pareado.**C.** Registros representativos que muestran el aumento de la frecuencia de SICs (triángulos rojos) después de la activación de Melanopsin en astrocitos con pulso de 20s. Escala 25pA, 0,5s . **D.** Curso temporal de la frecuencia media de SICs después de la estimulación de melanopsin en condiciones control (n = 12), o después de la carga de astrocitos con Evans Blue (n=8), o en presencia de D-AP5 (50 μM, n = 6). **E.** Cambios relativos de la frecuencia de las SICs en control (n = 12; p = 0,007), en presencia de Evans Blue (5 μM, n=8), y Gap 26 (100 μM, n = 9, p = 0,016; * p <0,05; * * p <0,01; t-test pareado). **F.** Promedio de los cambios relativos de la amplitud de los EPSC tras la estimulación de melanopsin después de la carga intracelular de astrocitos con Evans Blue (n = 8), Gap 26 (n=8; p = 0,010) y LcTeTx (1 μM, n=8). $*p < 0,05$; t-test pareado. Datos se muestran como media ± SEM

Se ha descrito que la gliotransmisión puede tener lugar tanto por mecanismos independientes como dependientes de liberación vesicular (Bazargani and Attwell, 2016), implicando exocitosis (Araque et al., 2014) y/o comunicación por medio de hemicanales de conexinas (Bennett et al., 2012).

Para determinar los mecanismos que subyacen a la liberación de los gliotransmisores por parte de los astrocitos estimulados con melanopsin, se cargaron con Evans Blue (5 μM), a través de la pipeta de registro, que bloquea tanto la función del transportador de glutamato vesicular (VGLUT) (Eriksen et al., 2016; Goh et al., 2011; Sánchez-Mendoza et al., 2017), como los transportadores de nucleótidos (VNUTs) que acumulan activamente el ATP en las vesículas (Geisler et al., 2013; Oya et al., 2013; Sakamoto et al., 2015). En estas condiciones, se observó que la estimulación óptica no producía el aumento en la frecuencia de SICs observado en situación control (Figura 4.22D-E; 0,68 ± 0,31; n=8; P=0,677), y se bloqueaba la potenciación sináptica transitoria (Figura 4.22F, 99,96 ± 7,24 %; n=8 neuronas; P=0,996). Por el contrario, el bloqueo de los hemicanales de conexinas por medio de la aplicación en el baño de Gap26 (péptido que bloquea la conexina 43) (100 μM) (Karpuk et al., 2011; Roux et al., 2015) no bloqueó ni los cambios en la frecuencia de SICs (Fig. 6E, 1,95 ± 0,52; n = 8; P = 0,016), ni la potenciación sináptica inducida por la estimulación de los astrocitos con melanopsin (Figura 4.22, 126,33 ± 14,73 %; n = 8; P = 0,010). Para corroborar estos resultados se usó la cadena ligera de la toxina tetánica (TeTxLC), que escinde la sinaptobrevina-2 asociada a las vesículas bloqueando así la exocitosis. A través de la pipeta de registro se llenaron los astrocitos con TetxLC y se analizaron las respuestas sinápticas antes y después de la estimulación con luz. La presencia de TeTxLC (1 μM) en los astrocitos bloqueó la potenciación sináptica inducida por melanopsin en las neuronas vecinas (Figura 4.22, 107,39 ± 30,09 %; n = 8; P = 0,547). En conjunto, estos datos apoyan la idea de la participación de las vías dependientes de la liberación vesicular para la liberación de gliotransmisores (Henneberger et al., 2010; Jourdain et al., 2007; Min and Nevian, 2012; Perea and Araque, 2007; Schwarz et al., 2017), y su contribución a la modulación neuronal provocada por la activación de astrocitos a través de melanopsin.

4.1.6. La estimulación de astrocitos con melanopsin a baja frecuencia induce potenciación a largo plazo (LTP) en el hipocampo

En condiciones fisiológicas los astrocitos presentan una actividad de Ca^{2+} espontánea oscilando a bajas frecuencias (de 1,13 ± 0,024 en condiciones basales a 1,78 ± 0,048 min 1

después de los pulsos de luz de 5s; ∼ 0,03 Hz; P <0,001; 4.5 valores obtenidos en nuestro estudio focalizado en secciones de cerebro) (Srinivasan et al., 2015; Agarwal et al., 2017; Bindocci et al., 2017)). Por tanto, nos preguntamos si la activación de los astrocitos que expresaban melanopsin con protocolos de luz en el rango de frecuencia de la actividad endógena, podía involucrar diferentes formas de señalización de Ca^{2+} y plasticidad sináptica.

Los astrocitos transfectados con melanopsin fueron estimulados con un protocolo de baja frecuencia (LFS, del inglés *Low Frequency Stimulation*; que consistía en un pulso de luz de 5s a 0,06 Hz, durante 1 min; Figura 4.23).

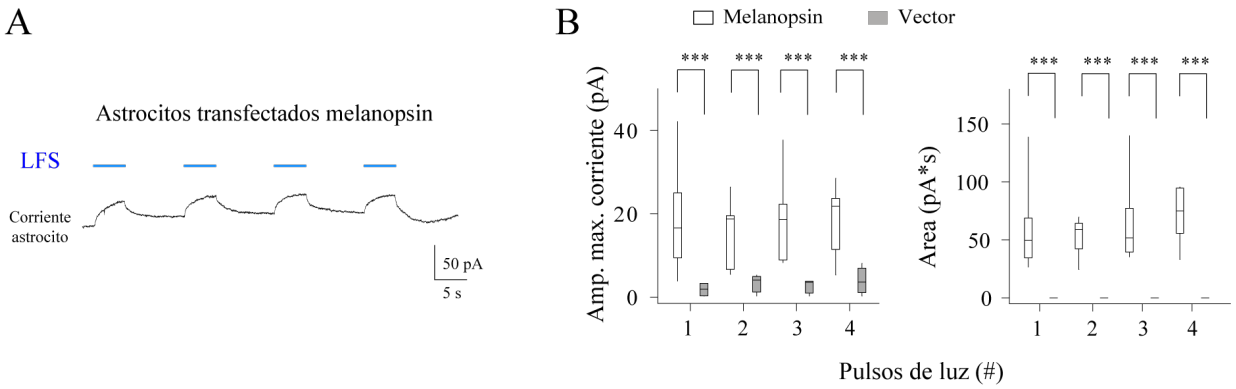


Figura 4.23 / *Protocolo de baja frecuencia (LFS) en astrocitos.* **A.** Corrientes inducidas en astrocitos al estimular melanopsin con pulsos de luz de 5s a 0,06 Hz (estimulación de baja frecuencia, LFS, barras azules). **B.** Valores promedio de pico y área de las corrientes inducidas por pulsos de LFS para los astrocitos con melanopsin (blanco; n=7), y astrocitos transfectados con vector (gris; n=4).*** P <0,001,One-Way ANOVA, post-hoc Dunn's.

El análisis de la señal de Ca^{2+} inducida por el protocolo LFS mostró un aumento sustancial de la frecuencia de eventos de Ca^{2+} localizados tanto en los microdominios como en el soma de los astrocitos (figura 4.24A-B).

La clasificación de los eventos de Ca^{2+} en base a su amplitud inicial indicó un incremento significativo de la frecuencia de los eventos para todos los grupos (Figura 4.24C). Sin embargo, sólo aquellos eventos con amplitudes pequeñas en reposo mostraron incrementos significativos tras el protocolo LFS (Figura 4.24C).

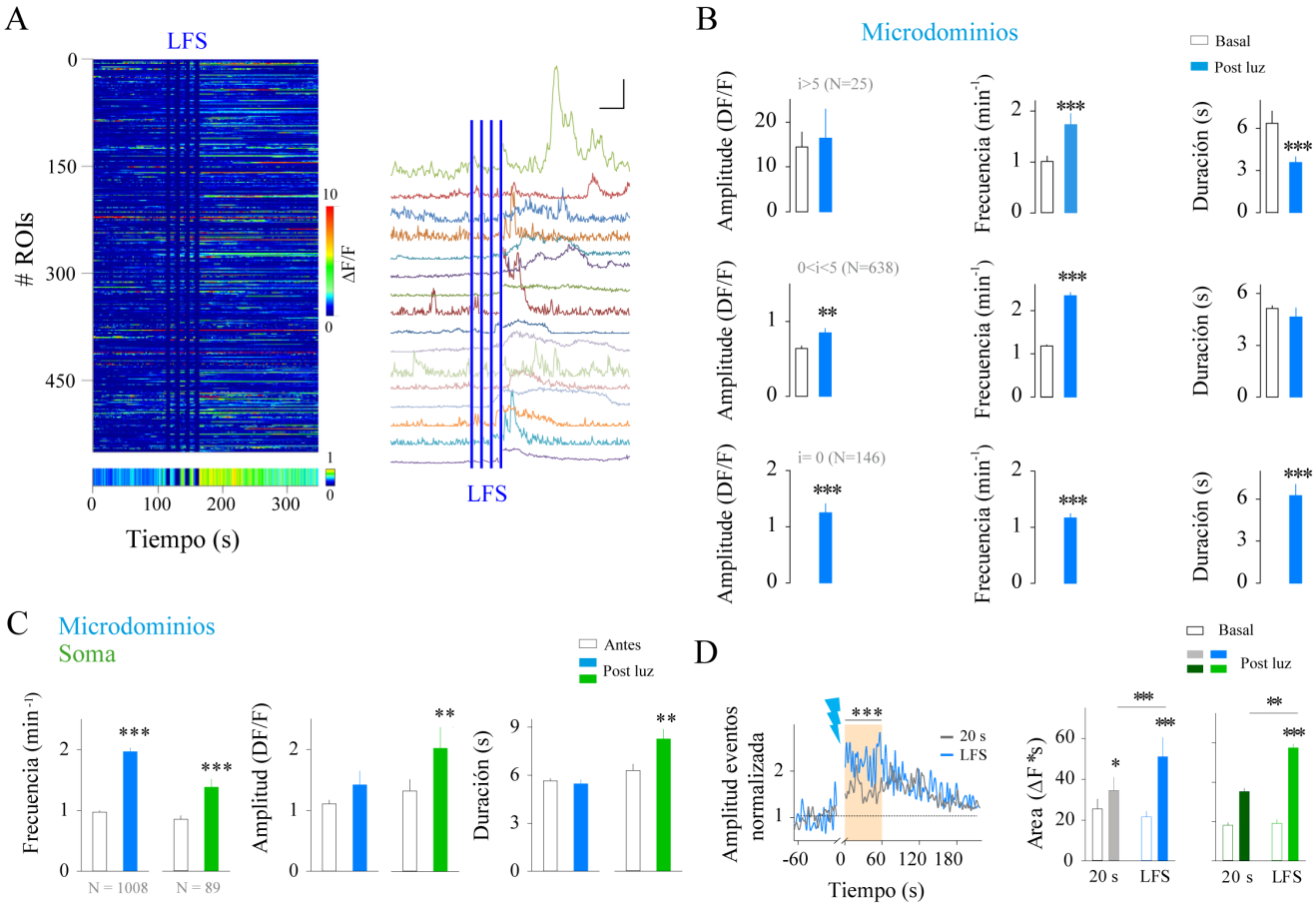


Figura 4.24 / ***La activación por LFS induce potenciación de las respuestas de Ca^{2+} en astrocitos.*** **A** Izda, gráfica representativa de la actividad de los microdominios, codificada en color según el cambio de fluorescencia (superior, n = 500), y actividad de poblacional de todos los ROI promedio en el tiempo (inferior, n = 1.008). Dcha, trazos representativos de las señales de Ca^{2+} inducidas por la estimulación con LFS de melanopsin (LFS; 5 s @ 0,06 Hz, 1 min; barras azules). Escala, 20 DF/F, 35s. **B** Análisis de propiedades de Ca^{2+} mostrando la respuesta medias de los microdominios (Azul) para amplitud, frecuencia (p<0,001) y duración (1.008 de 1.182 eventos; 85,30 %). p = 0,005 **; p <0,001 ***. 3 grupos basados en las amplitudes de los eventos en reposo. i denota valores de la amplitud del evento Ca^{2+}. **C** Análisis de las respuestas somáticas (verde) con la expresión de Cyto - GCaMPf6 mostrando la magnitud media para la amplitud del evento (p = 0,003), la frecuencia (p<0,∗<0,05; p <0,001; ANOVA two-way, post hoc Dunn's. **D** Análisis de propiedades de Ca^{2+} en los microdominios inducidos por 20s luz contínua y LFS. P = 0,005 **; P <0,001 ***; ANOVA one-way, post-hoc Tukey-Kramer.

Con el fin de establecer las particularidades de esta estimulación, se evaluó la diferencia en la eficacia que presentaba melanopsin para estimular la señal de Ca^{2+} en astrocitos mediante pulsos de luz continua de 20s y LFS. Nótese que la duración total del estímulo de luz era la misma, 20s (luz continua o 4 pulsos de 5 s, respectivamente). El área de las respuestas de Ca^{2+} inducidas por el protocolo LFS en microdominios y soma de los astrocitos fue mayor que la obtenida por el estímulo continuo de 20s. (Figura 4.24D), lo que indicaba que los

astrocitos activados por melanopsin podían discriminar distintos patrones de luz induciendo diferentes respuestas de Ca^{2+}.

En estas condiciones, se registraron neuronas de CA1 y se observó un fuerte incremento en la amplitud de los EPSC después del protocolo LFS, que persistía más de 30 minutos (potenciación a largo plazo, LTP) (217,65 ± 37,51 % sobre el basal; n = 10; P <0,001;Figura 4.25). Este efecto se produjo en el 80 % de las células registradas, lo que indica el efecto robusto de este protocolo sobre la transmisión sináptica (Figura 4.25A).

El análisis del CV indicó un mecanismo de acción presináptico subyacente a esta LTP (Figura 4.25). El estudio farmacológico reveló que la LTP mediada por astrocitos era sensible a los antagonistas purinérgicos SCH 8261 (91,39 ± 13,58 % sobre el basal; n = 11; P = 0,281) y MRS2179 (92,28 ± 12,54 % sobre el basal; n = 7; P = 0,396;Figura 4.25C,D). La presencia del antagonista del receptor mGluR1a (LY367385) no bloqueó la potenciación sináptica (144,89 ± 15,36 % sobre la transmisión basal; n = 10; P =0,006;Figura 4.25C,D), aunque se redujo la magnitud de la LTP frente a las condiciones control (P = 0,004). Como ocurría con estímulos continuos (ver Figura 4.22), el bloqueo de los hemicanales de conexina con Gap26 (100 μM) no impidió la LTP inducida por astrocitos (176,30 ± 22,79 % sobre la línea basal; n = 5; P <0,001;Figura 4.26). Sin embargo, la carga intracelular de astrocitos con Evans Blue (5 μM) si consiguió abolir la LTP (91,08 ± 6,75 % sobre el basal; n =7; P = 0126; Figura 4.26). Estos datos sugieren un papel relevante de los gliotransmisores ATP/ADO, liberados por los astrocitos a través de mecanismos vesiculares, en la LTP generada por la estimulación de astrocitos a bajas frecuencias. Para establecer la relación causal entre las señales de Ca^{2+} y la plasticidad sináptica inducida, se llenó la red astrocitaria con GDPβS, para bloquear la señalización mediada por GPCR, consiguiendo el bloqueo de la LTP tras la estimulación con LFS (100,12 ± 4,18 % sobre el basal; n = 6; P = 0,977; Figura 4.25). Por su parte, la estimulación de astrocitos con melanopsin en ratones $Ip3r2^{-/-}$ no dio lugar a cambios sinápticos (91,76 ± 7,42 % sobre el basal; n = 7; P = 0,281;Figura 4.25D) indicando que la señalización intracelular por proteínas G y la vía del Ip3 eran necesarias y suficientes para inducir LTP en las sinapsis hipocampales CA3-CA1.

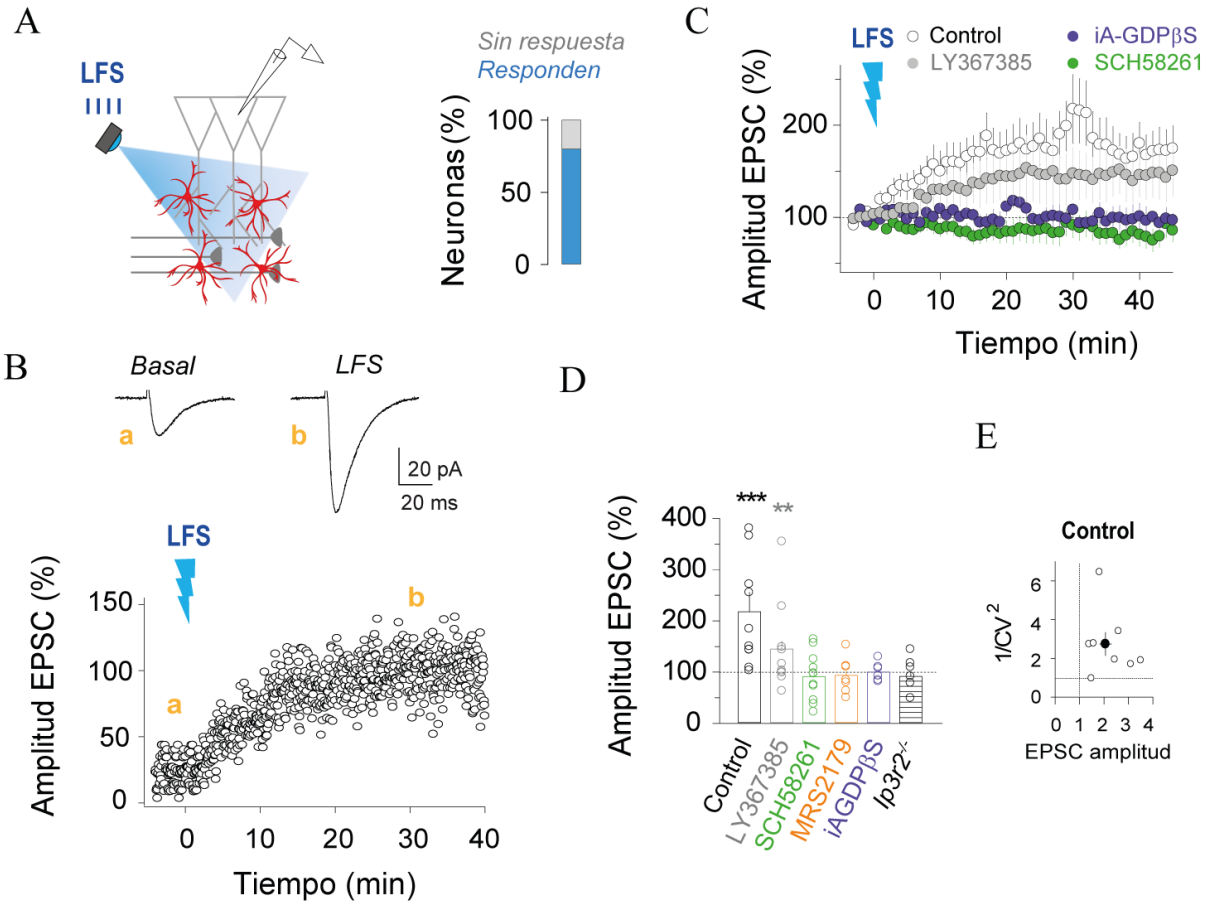


Figura 4.25 / *La activación de astrocitos con LFS induce LTP hipocampal.* **A.** Esquema diseño experimental, y porcentaje de neuronas que muestran cambios sinápticos después de LFS. **B.** Trazos de los EPSC antes (i) y después (ii) del protocolo de LFS sobre astrocitos y amplitud de un EPSC en el tiempo para célula representativa. **C.** Promedio de los cambios relativos de la amplitud de EPSC a en tiempo después de LFS en control y en presencia de distintas herramientas farmacológicas. El tiempo cero denota estimulación de la luz. **D.** valores medio relativos de la amplitud de los EPSC después del LFS (valor medio medido a 29 – 31 min) en control (n = 10, p <0,001), y en presencia de LY367385 (n=10, p = 0,006), SCH58261 (n=11), MRS2179 (n=7), iA-GDPβS (n=7), y en astrocitos Ip3r2 −/−- Melanopsin (n=7), **p <0,01, ***p <0,001, t-test páreado. **E** Coeficiente de variación normalizado (CV) a basal después de 30 min de estimulación de astrocitos (n = 8). Datos se muestran como media ± SEM.

Los receptores NMDA están ampliamente involucrados en los procesos LTP (Volianskis et al., 2015) y se han relacionado con formas particulares de plasticidad sináptica mediada por astrocitos (Adamsky et al., 2018; Henneberger et al., 2010; Min and Nevian, 2012; Andrade-Talavera et al., 2016). En consecuencia, estudiamos si la activación de los receptores NMDA contribuían a los fenómenos observados mediante la perfusión en el medio extracelular de D-AP5 (50 μ M). Observamos que la estimulación de los astrocitos con el protocolo LFS inducía aún potenciación sináptica (118,68 ± 5,62 % frente al basal; n = 13; P = 0,006; Figura 4.26A),

pero de menor magnitud que en condiciones control (P<0,001). Adicionalmente, analizamos la contribución de la actividad postsináptica a esta potenciación de larga duración mediante la carga intracelular de BAPTA en las neuronas registradas (nBAPTA; 20 mM).

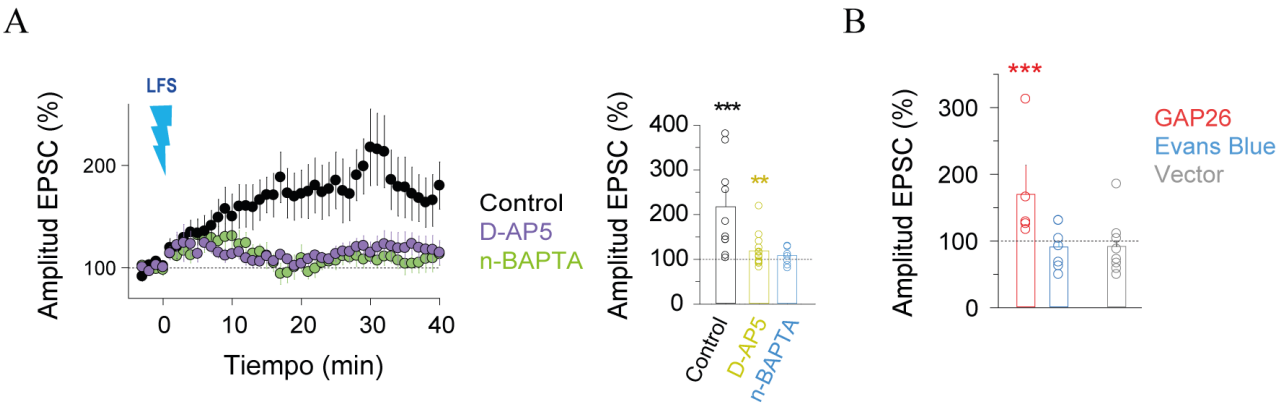


Figura 4.26 / ***Contribución de los NMDARs en la LTP inducida por astrocitos.*** **A.** Dcha, cambios relativos de la amplitud de los EPSCs en el tiempo inducidos por LFS en control (n = 10),y en presencia del antagonista D-AP5 (50 μM; n = 13), y después de carga neuronal con BAPTA (20 mM; n-BAPTA; n = 8). Izda, Promedio de la amplitud de los EPSCs en control y presencia de D-AP5 (n= 13, p=0,006), y BAPTA intracelular en las neuronas (n-BAPTA, n=8). **B.** cambios relativos de la amplitud de los EPSC medidos 30 min después del protocolo LFS en presencia de GAP26 (n = 5), carga de astrocitos con Evans Blue (n = 7), y astrocitos transfectados con vector (n = 8). P < 0,001; t-test páreado.

En estas condiciones, la estimulación de los astrocitos con el protocolo LFS no inducía LTP (108,60 ± 4,03 % frente al basal; n = 8; P = 0,081; Figura 4.26A), sugiriendo que junto con las acciones presinápticas derivadas de la estimulación óptica de astrocitos, las neuronas postsinápticas también contribuyeron a la LTP inducida por astrocitos. Cabe destacar que tanto el bloqueo de los receptores NMDA como el Ca^{2+} postsináptico con BAPTA permitieron un aumento transitorio de la amplitud de los EPSCs durante los primeros minutos después del protocolo LFS, similar a la potenciación sináptica a corto plazo observada por la estimulación aguda de melanopsin. Sin embargo, se requería la activación de NMDARs y el aumento de Ca^{2+} postsináptico para el aumento sostenido de la potenciación sináptica y la expresión LTP en las sinapsis hipocampales (Volianskis et al., 2015) (Figura 4.25 y4.26). Por tanto, estos datos revelan la habilidad de los astrocitos para desencadenar distintos tipos de plasticidad sináptica en respuesta a diferentes patrones de actividad, que pueden ser simulados de forma precisa con melanopsin.

4.1.7. Melanopsin como herramienta optogenética para estudios *in vivo*

La actividad de los astrocitos se ha relacionado con la correcta ejecución de tareas cognitivas (Florian et al., 2011; Lee et al., 2014; Matos et al., 2015; Oliveira et al., 2015; Perea et al., 2014). Así, nos propusimos investigar si los cambios sinápticos inducidos por la estimulación selectiva de los astrocitos con melanopsin podían tener un impacto en el comportamiento animal. Para ello se inyectaron ratones bilateralmente con AAV2/5-GFAP-Melanopsin-mCherry en la región del hipocampo, y se evaluó el rendimiento de la memoria mediante el test basado en la localización de nuevos objetos (NOL, de inglés novel object location, que consta de dos fases, adquisición y test).

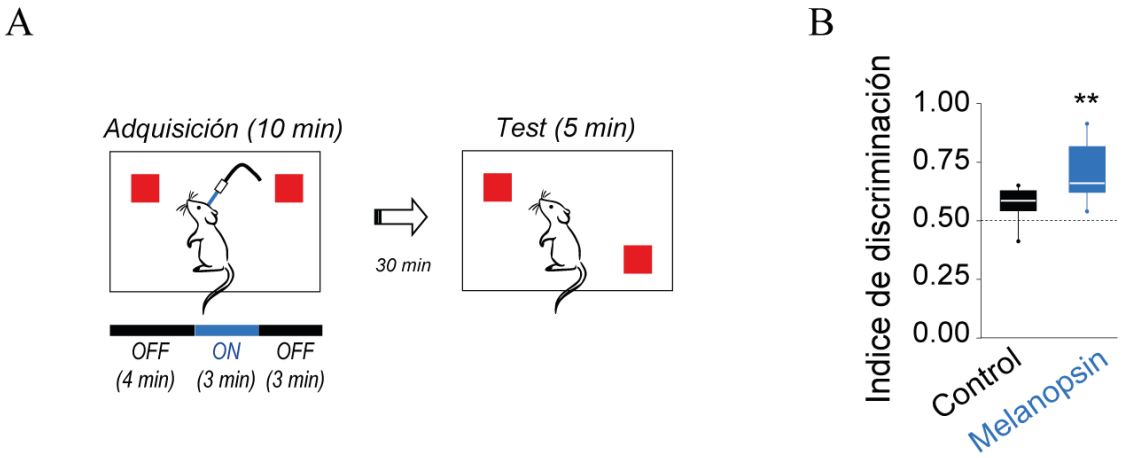


Figura 4.27 / *LFS en astrocitos aumenta el rendimiento de la memoria.* **A.** Esquema de la prueba NOL, indicando la aplicación de luz durante la prueba de adquisición tanto para el control (ratones no transfectados con fibra óptica) como para los ratones transfectados con melanopsin. El test consistía en la exposición de los ratones a 2 objetos durante 10 minutos (ensayo de adquisición), y 30 minutos más tarde se evaluó durante 5 minutos como era la exploración cuando uno de los objetos tenía una ubicación nueva. **B.** Cuantificación del índice de discriminación en control (0,569 ± 0,030; n = 5, negro), y en ratones con melanopsin (0,699±0,037; n=11, azul; p=0,041) mostrando la mejora del índice de reconocimiento inducido por la activación de astrocitos. ∗p <0,05, ANOVA one-way, post hoc Tukey –Kramer.

La estimulación de los astrocitos con el protocolo LFS se aplicó durante 3 minutos coincidiendo con el periodo de adquisición de la memoria. Se observó que la activación de astrocitos suponía un incremento significativo en la preferencia de objetos en nueva posición en comparación con los ratones control; es decir, mediante la activación selectiva de astrocitos con melanopsin se conseguía mejorar el índice de discriminación (0,57 ± 0,030 en ratones control implantados con fibras vs 0,56 ± 0,041 en ratones con virus control, P = 0,868; y 0,70 ±

0,037 en ratones transfectados con melanopsin, P = 0,041; n = 5, n = 6, y n = 11; respectivamente (4.27).

En conjunto, estos datos revelan la capacidad de los astrocitos para mejorar el rendimiento cognitivo y la memoria (Adamsky et al., 2018), y ponen de manifiesto la eficiencia de melanopsin como una herramienta optogenética ventajosa para el estudio de astrocitos *in vivo*.

4.2. La señalización GABAérgica en astrocitos participa en el balance E/I de los circuitos corticales

Durante la toma de decisiones, la actividad de la corteza prefrontal medial (CPFm) codifica información sobre eventos presentes y planes futuros. Los comportamientos dirigidos son complejos, y requieren que el sujeto perciba la información de su entorno, aprenda, y luego seleccione que hacer a continuación (Penner and Mizumori, 2012), proporcionando, por tanto, los cimientos de procesos de toma de decisión del reino animal (Pezzulo, 2014). En este tipo de comportamientos también se ha descrito la importancia de la participación de neuronas PV+, con un papel relevante en el mantenimiento de oscilaciones gamma que se han descrito fundamentales en la realización de estas tareas. Por tanto, nos propusimos estudiar la implicación de la activación GABAérgica de astrocitos en los fenómenos subyacentes a estos comportamientos.

4.2.1. La estimulación de PV+ en CPFm con un patrón theta-gamma recluta la actividad astrocitaria

La generación de oscilaciones locales theta y gamma está estrechamente relacionada con la actividad de interneuronas PV+ (Buzsáki and Wang, 2012; Cardin et al., 2009). Las interneuronas GABAérgicas corticales que expresan PV+ son importantes reguladores de las actividad de la red local (Hu et al., 2014), y su activación sincrónica es suficiente para la inducción de oscilaciones gamma y podrían encontrarse implicadas en la correcta ejecución de tareas comportamentales (Buzsáki and Wang, 2012; Cardin et al., 2009; Sohal, 2016). Por tanto, analizamos si este patrón de actividad theta-gamma en las neuronas PV+ podía activar astrocitos y las consecuencias de esta interacción para la transmisión sináptica inhibidora en los circuitos corticales de la CPFm.

Para ello, se realizaron registros *in vitro* en ratones transgénicos PV-tomato en la capa 2/3 de CPFm, en los que se identificaron las interneuronas PV+ en rojo y las neuronas piramidales en base a sus propiedades eléctricas. En un grupo de experimentos se realizaron inyecciones virales para marcar específicamente neuronas excitadoras, utilizando el promotor CamKII fusionado al reportero fluorescente YFP (AAV9-CamKII-YFP), asegurando el registro de neuronas excitadoras (Figura 4.28A-B).

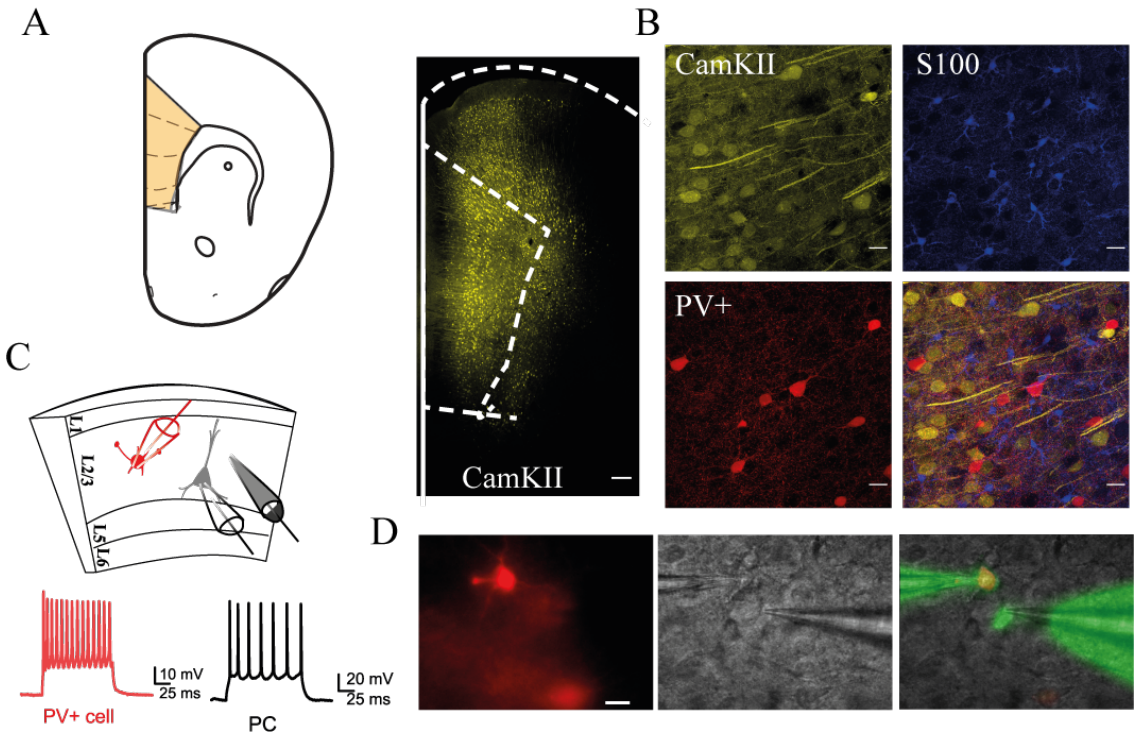


Figura 4.28 / *Identificación de neuronas PV+ y células PC en CPFm.* **A.** Izda, Esquema respresentativo de CPFm, zona de inyección con CamKII y zona de registro marcada en amarillo. Dcha, Rodaja de CPFm expresando el reportero CamKII para identificación de neuronas PC. **B.** Inmunocitoquímica de CamKII (amarillo), S100 (azul), PV+ (rojo) en rodajas de CPFm. **C.** Esquema representativo de abordaje experimental y patrón de disparo de PV+ y PC registradas en fijación de voltage. **D.** Imagen de epifluorescencia mostrando en rojo una célula PV+ y llenado con Alexa-488 en verde de las dos células registradas, PV+ y célula principal, respectivamente.

Las células PV+ se despolarizaron con un patrón theta-gamma de diferentes duraciones (5s, 10s o 30s) a través de la pipeta de registro. Se observó que estímulos crecientes en duración inducían diferentes respuestas en la transmisión inhibitoria inducida (IPSCs, del inglés *inhibitory postsynaptic currents*) en las neuronas principales registradas (Figura 4.29). Así, estímulos de 5s generaban una potenciación transitoria de los IPSCs, mientras que 10s inducían una rápida depresión (Figura 4.29B; n=10 y n=14, respectivamente). Por su parte, protocolos de 30s inducían una potenciación más prolongada de la transmisión sináptica inhibidora (de unos 15 min de duración en promedio) (Figura 4.29B, n=15).

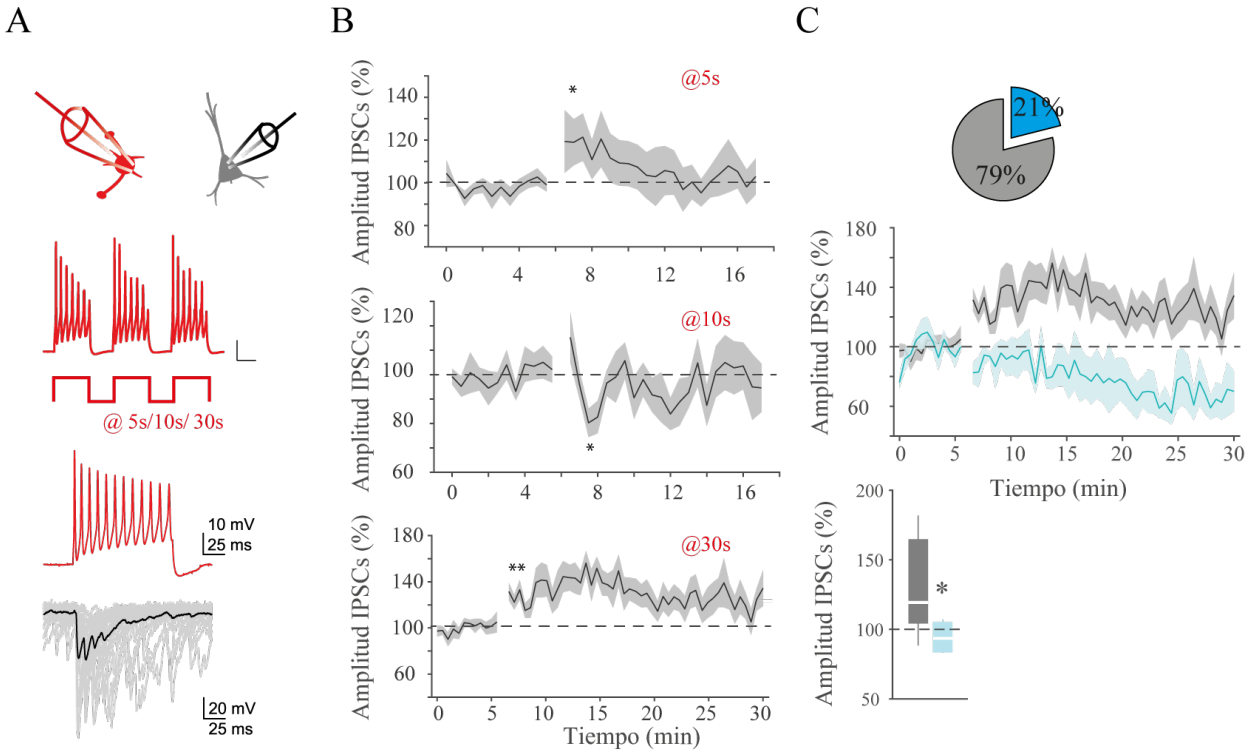


Figura 4.29 / ***Patrón anidado theta-gamma a diferentes duraciones provoca distintas respuestas de la transmisión sináptica inhibidora en CPFm.*** **A.** Sup, esquema representativo de aproximación experimental. Inf, protocolos de estimulación sobre las interneuronas PV+ y respuestas en las PC registradas simultáneamente. **B.** Curso temporal de los IPSCs bajo los diferentes patrones de estimulación (indicada su duración en rojo). **C.** Sup, porcentaje de células PC que responden potenciando (negro) o deprimiendo (azul) sus IPSCs en respuesta al protocolo theta-gamma de 30s. Inf, curso temporal y porcentaje de modulación de los IPSCs de estas mismas poblaciones.

En condiciones de estimulación de las PV+ durante 30 s encontramos una población mayoritaria de PCs, 79 % (12 de 15 neuronas registradas), que mostraban una potenciación de la inhibición; mientras que un 21 % presentaban una disminución en la amplitud de sus IPSCs. Por tanto, distintos rangos de actividad de las interneuronas PV+ afectan de forma diferencial a la respuesta de las neuronas excitadoras vecinas.

Dado que los astrocitos son capaces de detectar la actividad GABAérgica (Mariotti et al., 2018; Perea et al., 2016; Mederos and Perea, 2019; Mariotti et al., 2016b), nos propusimos estudiar si pueden modular estas las corrientes GABAérgicas. Para ello, se bloqueó la red astrocitaria con BAPTA intracelular (40 mM) por medio de la pipeta de registro y se probaron los protocolos de 5s, 10s y 30s de estimulación de las PV+. En estas condiciones, la modulación observada por protocolos de 5s y 10s seguía presente después del bloqueo del Ca^{2+} en astrocitos (n=4 y 8 neuronas, respectivamente); sin embargo, tras estimulaciones

de mayor duración (30s) se producía el bloqueo de la potenciación de los IPSCs (Figura 4.30; n=7). Estos resultados indican que eran necesarios periodos relativamente largos de actividad de las neuronas PV+ para reclutar la señalización en astrocitos.

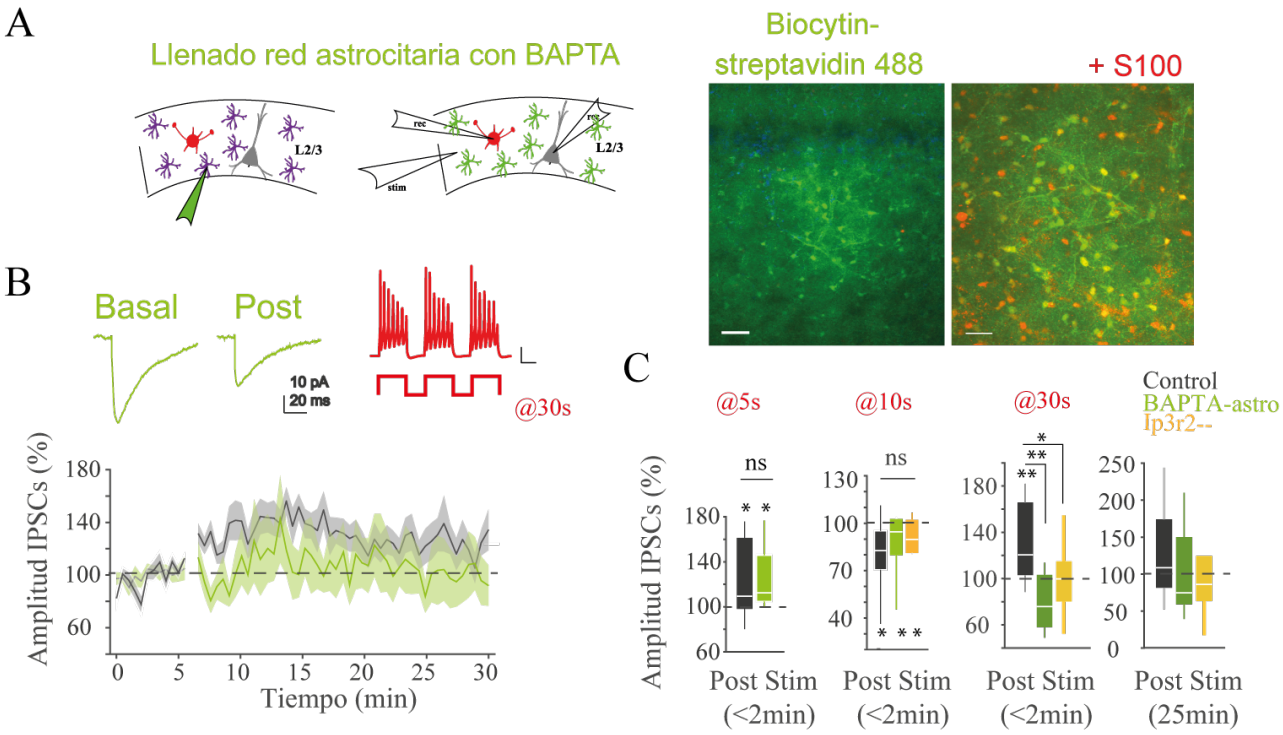


Figura 4.30 / ***La activación de interneuronas PV+ con un patrón theta-gamma de 30s es eficiente en reclutar astrocitos que participan en la modulación sináptica inhibitoria.*** **A.** Izda, Esquema representativo de llenado de astrocitos en CPFm con BAPTA para el bloqueo del calcio astrocitario. Dcha, imágenes del marcaje de la red astrocitaria con biocitina tras el llenado de un astrocito, y ampliación de la misma zona con el marcaje positivo para S100 (Dcha). Escala, 50 y 25 μm; respectivamente. **B.** Sup Izda, respuestas representativas de los IPSCs en presencia de BAPTA en los astrocitos (BAPTA-astro) antes y después de la activación de PV+ durante 30s, y patrones de despolarización theta-gamma sobre PV+; Inf, curso temporal de los IPSCs en control (negro) y BAPTA-astro (verde) tras la estimulación de PV+ 30s. **C.** Amplitud de los IPSCs en control (negro), BAPTA-astro (verde) e Ip3r2$^{-/-}$ (amarillo) para cada uno de los protocolos de estimulación de diferentes duraciones theta-gamma (indicado en rojo, 5, 10, 30 s). Nótese que el análisis de las respuestas sinápticas >25 min de estimulación de las neuronas PV+ 30s indica que el efecto sobre la transmisión sináptica inhibidora es transitorio.

Asimismo, se realizaron experimentos en ratones Ip3r2$^{-/-}$ que mostraban marcadas las interneuronas PV+ (ver Capítulo Materiales y Métodos), que confirmaron la independencia de la respuesta sináptica respecto a la actividad astrocitaria para pulsos cortos, pero no para pulsos prolongados en el disparo de las neuronas PV+ (n=4 y 12 neuronas respectivamente para las distintas condiciones), corroborando los resultados obtenidos con el bloqueo del

Ca^{2+} intracelular en la red astrocitaria con BAPTA (Figura 4.30).

En base a estas observaciones, nos propusimos estudiar la señal de Ca^{2+} astrocitaria inducida por protocolos theta-gamma en las neuronas PV+. Utilizando estrategias virales para la expresión de cyto-Gcamp6 en astrocitos de CPFm se observó un aumento en el número de eventos de Ca^{2+} tras la despolarización de las neuronas PV+ (Figura 4.31A-B).

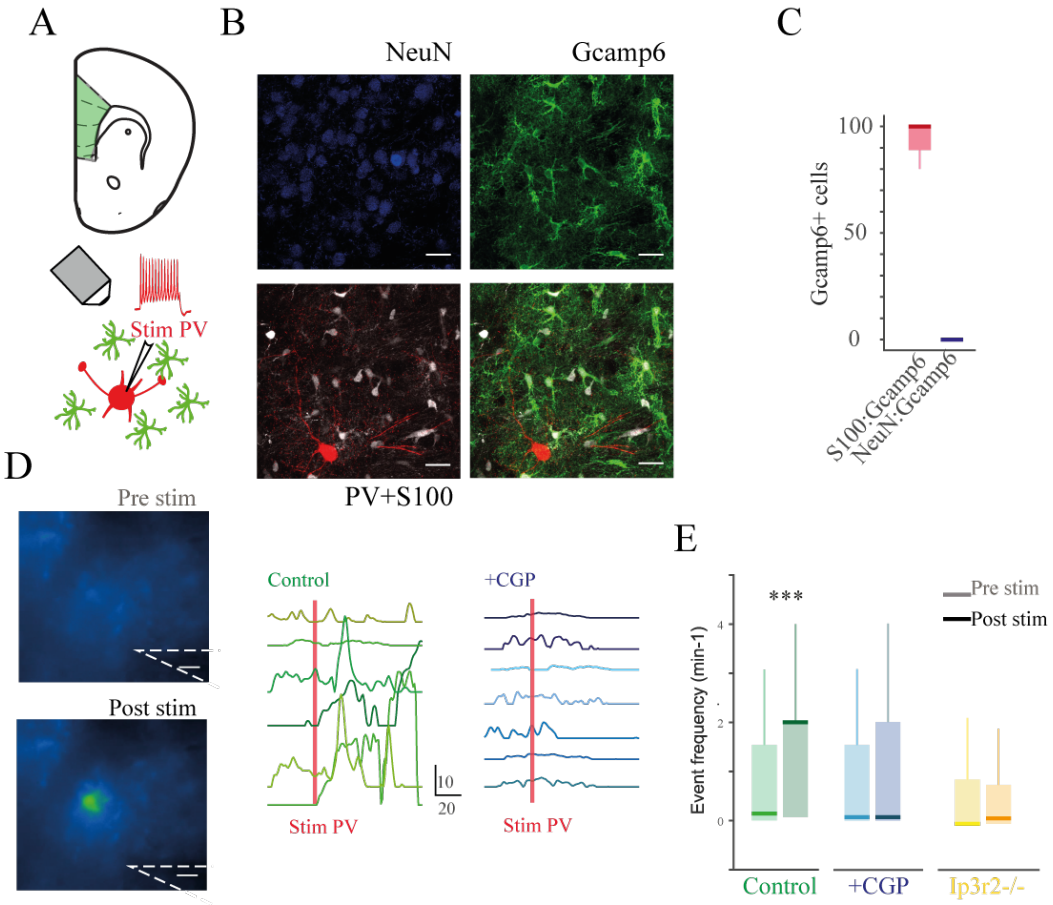


Figura 4.31 / ***Respuesta de Ca^{2+} en astrocitos mediada por $GABA_BR$ tras la estimulación de PV+.*** **A.** Sup, esquema de la expresión en CPFm con GCamp6-cyto para el estudio de Ca^{2+} en astrocitos. Inf, esquema del diseño experimental, registro de célula PV+ que será despolarizada (theta-gamma @30s) y los astrocitos Gcamp6-cyto monitorizados. **B.** Inmunocitoquímica de NeuN (azul), Gcamp6 (verde), S100 (blanco) y PV+ (rojo). **C.** Colocalización s100:Gcamp6 y NeuN:Gcamp6. Nótese expresión selectiva de Gcamp6 en astrocitos. **D.** Izda, imágenes de epifluorescencia de un astrocito antes y después del estímulo de la neurona PV+. Nótese el aumento de la fluorescencia tras el estímulo. Dcha, trazos representativos de Ca^{2+} intracelular a lo largo del tiempo (barra roja corresponde a la despolarización de la interneurona PV+) en condiciones control (verde), y después de aplicar CGP55845 (azul). **E.** Frecuencia de eventos en basal (tonos claros) y después del estímulo theta-gamma sobre PV+ de 30s (tonos oscuros) para diferentes condiciones experimentales (*** $p<0.001$; ANOVA one-way, post-hoc Tukey-Kramer).

Estas respuestas confirman datos previos (Mariotti et al., 2018; Perea et al., 2016; Covelo and Araque, 2018), mostrando un aumento en la frecuencia de eventos de Ca^{2+} sin provocar cambios en la amplitud de los mismos. Además, se comprobó que eran sensibles al bloqueo del receptor $GABA_B$ mediante el uso de CGP55845 (5 μM), un antagonista selectivo de estos receptores (Figura 4.31D-E). El uso de ratones Ip3r2$^{-/-}$ confirmó la ausencia de respuestas activas en astrocitos tras la estimulación de las interneuronas PV+ con pulsos de 30s (ver Figura 4.31E).

El análisis del coeficiente de variación (CV) de las respuestas sinápticas mostró un componente presináptico (Figura 4.32A; n=16 neuronas). Para estudiar en detalle las propiedades sinápticas de esta modulación, se analizaron los IPSCS unitarios debidos a la despolarización theta-gamma sobre las neuronas PV+ en los pares de neuronas PV+-PC conectadas (Figura 4.32B,C; n=9 parejas de neuronas). El resultado mostraba un aumento de la eficacia de las respuestas unitarias tras la estimulación de las PV+ mediado por un incremento de la probabilidad de liberación de neurotransmisor (Figura 4.32B,C). En conjunto, estos resultados indican una mejora de la transmisión inhibitoria a través de la potenciación de la liberación de GABA por parte de los terminales sinápticos de las neuronas PV+ y posiblemente de otros terminales GABAérgicos.

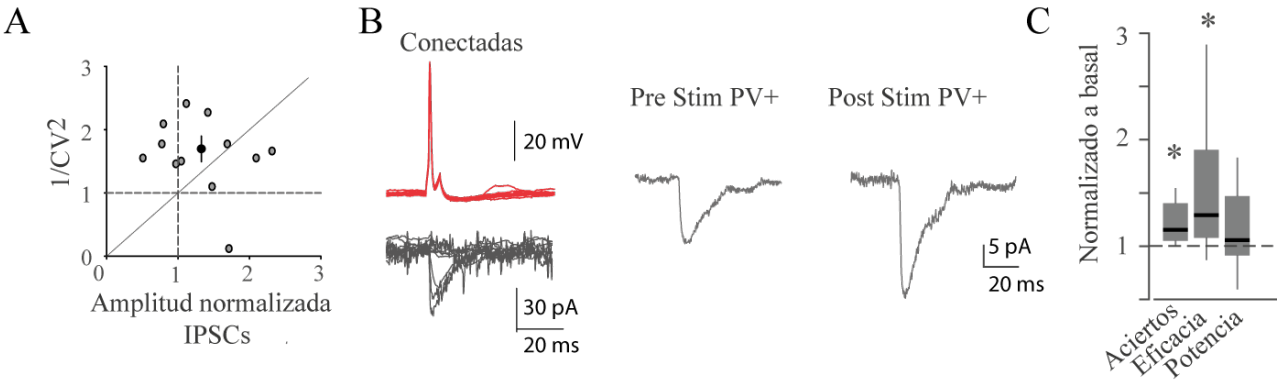


Figura 4.32 / ***Fenómeno presináptico: análisis CV y parejas monosinápticas de PV-PC.*** **A.** Cambios relativos del coeficiente de variación (CV) medidos 1'5 min después de la estimulación de las PV+. **B.** Izda, Respuestas sinápticas inducidas sobre la PC (negro) ante la despolarización transitoria de una PV+ conectada sinápticamente (rojo). Dcha, ejemplo promedio de los trazos para una neurona PV antes y después de la estimulación de la neurona PV+. Nótese la mejora en la eficacia en la condición post Stim (posterior al protocolo theta-gamma @30s). **C.** Cambios relativos al basal de los parámetros sinápticos (aciertos, eficacia y potencia) inducidos sobre la neurona PC por el protocolo sobre la interneurona PV+. Nótese que la potencia no es significativa frente a su propio basal.

Con el fin de determinar los gliotransmisores y receptores implicados en las respuestas sinápticas mediadas por la activación de astrocitos, se bloqueó la activación de los receptores $GABA_B$ con CGP55845 (5 μmM). Bajo estas condiciones, la estimulación de las neuronas PV+ con el protocolo theta-gamma de 30s, no indujo modulación alguna de los IPSCs (Figura 4.33; n=11 neuronas), en consonancia con los resultados obtenidos bloqueando la señal de Ca^{2+} en astrocitos (Figura 4.31D,E).

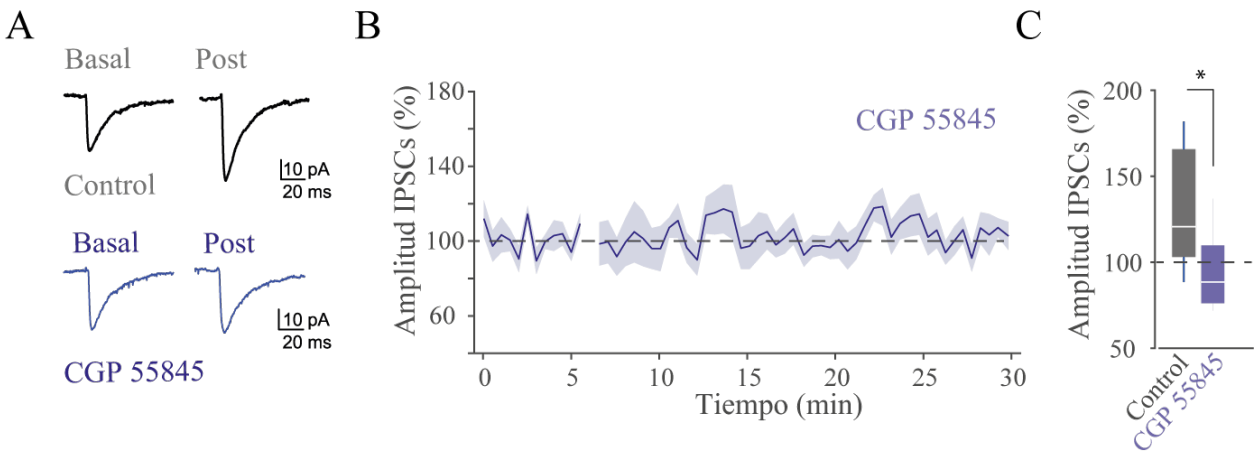


Figura 4.33 / ***$GABA_BR$ astrocitario regula la potenciación de la inhibición inducida por las PV+ sobre neuronas PC.*** **A.** IPSCs antes y después del Stim PV+, en control y presencia del antagonista $GABA_BR$ (CGP55845). **B.** Curso temporal de la respuesta en presencia de CGP55845 en el baño ante la aplicación del protocolo theta-gamma durante 30s sobre la interneurona PV+. Nótese la desaparición de la potenciación de la transmisión sináptica inhibidora en presencia del antagonista. **C.** Cambios relativos de los IPSC en control (negro) y en presencia de CGP55845 (azul oscuro) a 1 minuto tras la estimulación PV+ (* $p<0.05$; One way ANOVA post hoc Tukey-Kramer).

Las células PV+ presentan un alto grado de conectividad entre sí, lo que favorece la sincronización en los rangos de frecuencia gamma (Packer and Yuste, 2011). Por ello, evaluamos el efecto de la actividad poblacional de las interneuronas PV+ con el ritmo theta-gamma sobre la transmisión sináptica inhibidora de las PC.

La estimulación poblacional se obtuvo mediante la expresión selectiva de ChR2 en las células PV+ (ratones PV-Cre transfectados con AAV9-dio-ChR2-mCherry; Figura 4.34B). Observamos que la estimulación óptica de las células PV+ con protocolos de 30s theta-gamma producía una robusta potenciación de los IPSCs que se mantenía sostenida por más de 20 min (Figura 4.34C; n=15). Cabe destacar que el porcentaje de neuronas PC que mostraron la potenciación o disminución de la inhibición (73 % vs 27 %, respectivamente) en

respuesta a la estimulación poblacional de neuronas PV+ con ChR2 (Figura 4.34C), fue similar al obtenido con la estimulación selectiva de una única neurona PV+ por despolarización (Figura 4.29C); lo que refuerza los resultados obtenidos por despolarización unitaria y apoya la existencia de mecanismos paralelos para la modulación sináptica inhibidora.

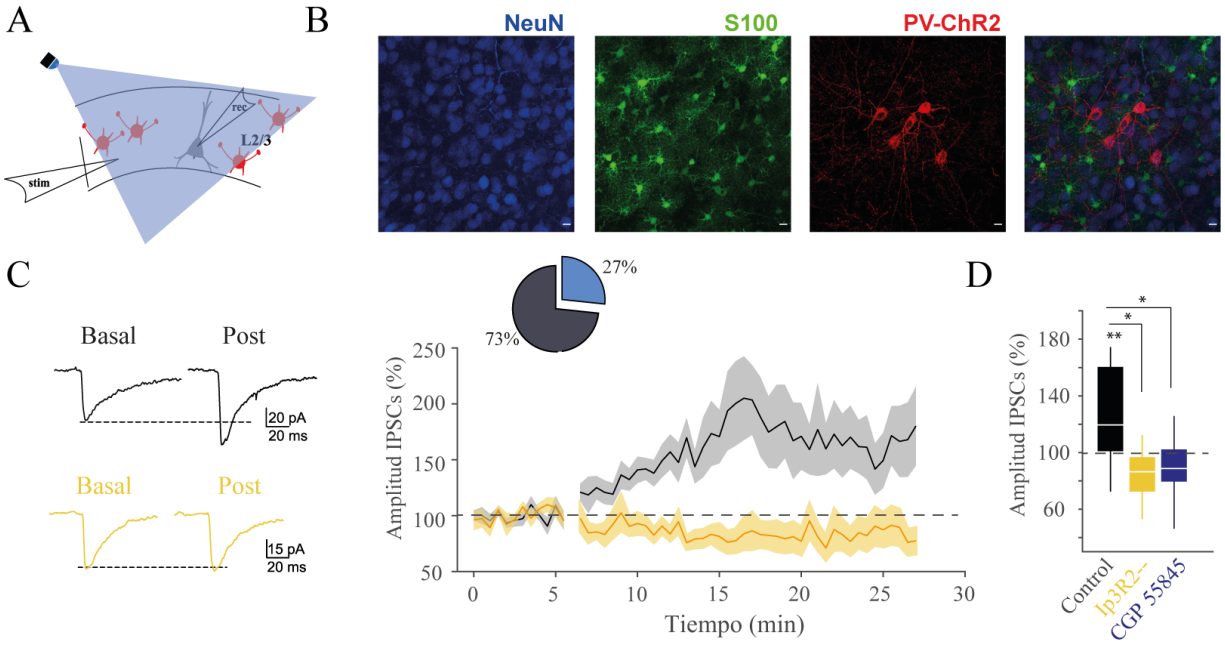


Figura 4.34 / ***Estimulación poblacional de células PV+ mediante ChR2.*** **A.** Esquema del diseño experimental de los registros de neuronas PC y aplicación de luz sobre las neuronas PV+ con el mismo protocolotheta-gamma durante 30s. **B.** Inmunohistoquímica mostrando la expresión de ChR2 sobre las células PVcre con el AAV-dio-ChR2-mCherry. **C.** Izda, Corrientes sinápticas inhibidoras (IPSCs) antes y después de la estimulación, en control (negro) y en ratones PVCre-Ip3r2$^{-/-}$ (amarillo). Nótese como los ratones Ip3r2$^{-/-}$ pierden la potenciación de la inhibición ante el estímulo poblacional de las PV+. Dcha Sup, Se muestra el número de células que presentan una potenciación de la inhibición en condiciones control (con valores muy similares a los obtenidos en la estimulación de una única PV+). Dcha Inf, curso temporal de la amplitud relativa de los IPSC tras la estimulación de PV-ChR2 en ratones WT e Ip3r2$^{-/-}$. **D.** Valores de los IPSCs registrados 1'5 min después de la estimulación de PV-ChR2 en el para las diferentes condiciones.

El bloqueo de los receptores de $GABA_B$ con CGP55845 abolió esta potenciación (Figura 4.34D; n=11 neuronas), al igual que no se produjo en ratones Ip3r2$^{-/-}$ tras la estimulación selectiva con ChR2 de neuronas PV+(Figura 4.34C, D; n=9). Por tanto, estos resultados indicaban que tanto a nivel unitario como poblacional, bajo condiciones fisiológicas de actividad de las neuronas PV+ se reclutan astrocitos que, a través de la activación de los receptores $GABA_B$ y la señalización de Ca^{2+} intracelular, participan en la potenciación de la inhibición cortical.

4.2.2. La señalización GABAérgica estimula la liberación de glutamato en astrocitos que contribuye al incremento del tono inhibitorio

Se utilizaron aproximaciones farmacológicas para explorar los mecanismos subcelulares responsables de la regulación de la potenciación de la inhibición por astrocitos.

Se ha descrito la liberación de glutamato y adenosina en respuesta a la estimulación de los receptores $GABA_B$ (Perea et al., 2016; Covelo and Araque, 2018). Por tanto, se propuso confirmar si la activación de los astrocitos por la actividad de las neuronas PV+ inducia la liberación de estos gliotransmisores. El bloqueo de los receptores mGluR1 consiguió abolir la potenciación de los IPSCs (n=8 neuronas), sin embargo, tras el bloqueo de los receptores de adenosina A2A (n=9 neuronas), así como el bloqueo del Ca^{2+} postsináptico (n-BAPTA) (n=7 neuronas) y las rutas ligadas a la señalización por proteínas G (n=8 neuronas), mediante el uso de BAPTA y GDPβS en la pipeta de registro de las PC, respectivamente; se observó la potenciación de la inhibición por la estimulación de las interneuronas PV+ (Figura 4.35A, B).

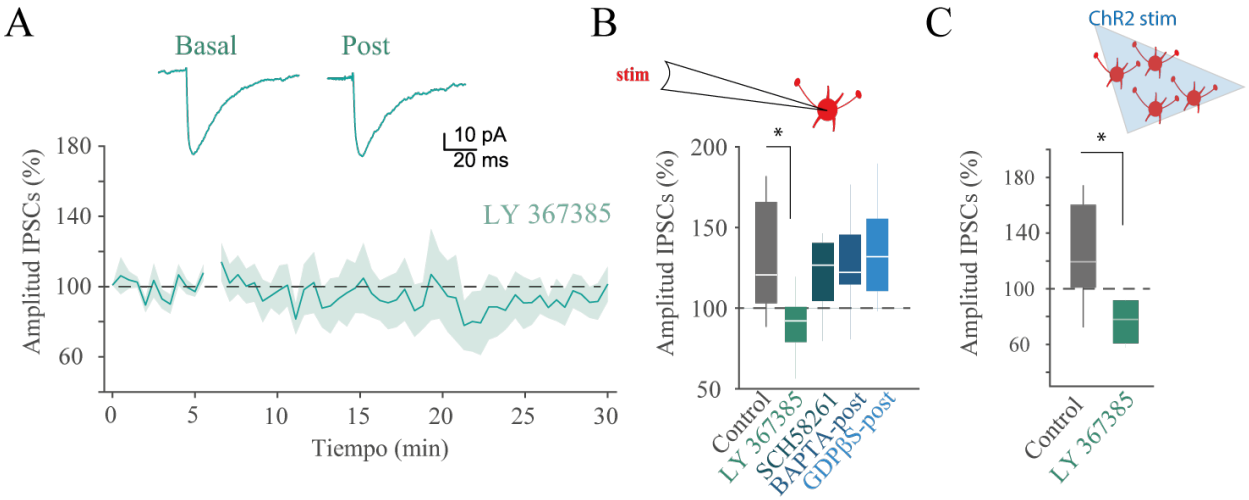


Figura 4.35 / ***La potenciación de la inhibición es dependiente de la liberación de glutamato por los astrocitos.*** **A.** Sup, Se muestran las corrientes sinápticas de los IPSC antes y después de la estimulación en presencia del antagonista de los mGluR1, LY367385. Inf, curso temporal de los IPSCs de la neuronas PC tras aplicar el protocolo sobre la PV+, a los 5 min de registro. Estimulación en min 5. **B.** Cambios relativos de la amplitud del IPSC 1'5 min después del estimulo unitario en las PV+ en control y bajo las distintas condiciones farmacológicas. **C.** Cambios relativos de la amplitud de los IPSCs 1'5 min después de la estimulación con ChR2 sobre las PV+, en control y en presencia de LY367385.

En una serie de experimentos se estimularon las PV+ por medio de ChR2 en presencia del antagonista de mGluR1 (Figura 4.35C; n=7 neuronas), ante el que no se observaron cambios significativos en la amplitud de los IPSCs.

En conjunto, estos resultados indicaron la habilidad de los astrocitos para liberar glutamato en respuesta a la actividad GABAérgica de las neuronas PV+, que provocó la activación de los receptores mGluR1 en las neuronas inhibitorias y el consiguiente incremento en la probabilidad de liberación de GABA.

4.2.3. La estimulación selectiva de astrocitos con melanopsin recapitula la potenciación de la transmisión GABAérgica

Decidimos comprobar si la activación de los astrocitos era suficiente para generar la potenciación del tono inhibitorio observado tras la estimulación de neuronas PV+, mediante la expresión selectiva de melanopsin en astrocitos (Figura 4.36A; siguiendo una estrategia similar a la descrita en la sección Resultados 4.1 y (Mederos et al., 2019)).

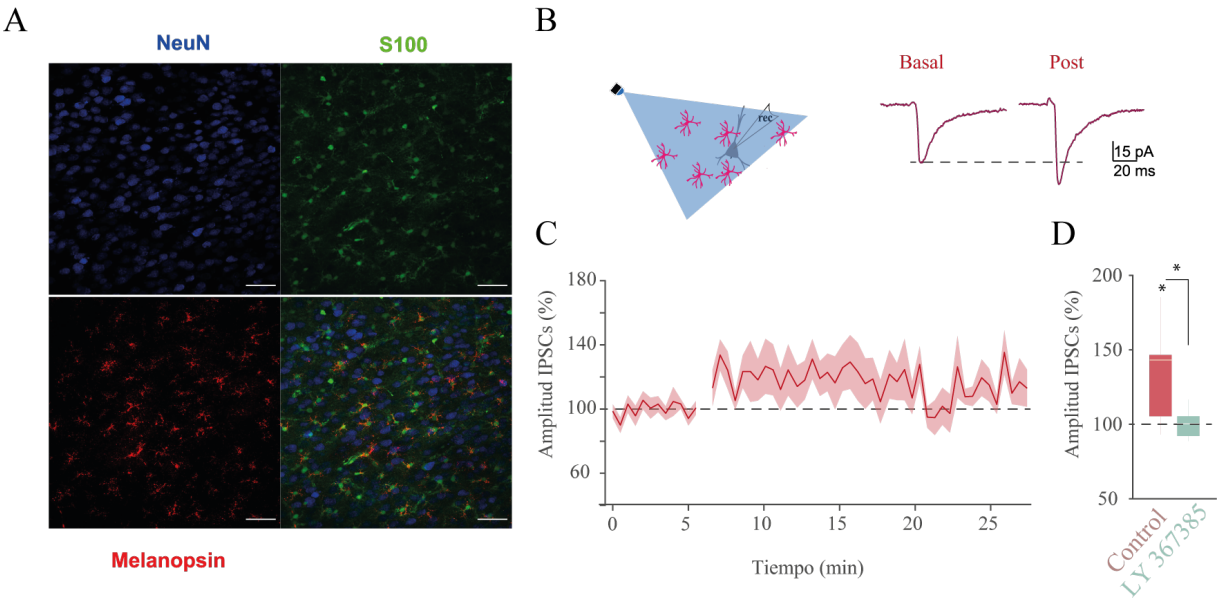


Figura 4.36 / ***Melanopsin recapitula la potenciación de la inhibición.*** **A.** Innmunohistoquímica de la expresión de melanopsin en astrocitos de CPFm. **B.** Sup, Esquema mostrando la estimulación de astrocitos Melanopsin - mCherry junto con el registro de una neurona PC en CPFm. Inf, IPSCs antes y después de la estimulación de astrocitos con melanopsin. **C.** Curso temporal la amplitud de los IPSCs, tras el estimulo de melanopsin (estimulación con luz a los 5 min de registro) **D.** Cambios relativos de la amplitud del IPSC 1'5 min después de protocolo de luz theta-gamma sobre astrocitos en control (rojo) y en presencia LY367385 (celeste).

Encontramos que la estimulación óptica de astrocitos con un patrón theta-gamma era suficiente para recapitular la potenciación de la inhibición sobre las PC (n=10 neuronas), y que esta potenciación se bloqueaba en presencia del antagonista. Descubrimos que la estimulación de los astrocitos mediante la activación de melanopsin con un patrón theta-gamma era producida a través de la activación de los mGluR1 presinápticos, LY367385 (Figura 4.36D; n=10 neuronas), indicando la capacidad de los astrocitos activados con este (patrón de luz theta-gamma) para liberar glutamato (Mederos et al., 2019). Poniendo de manifiesto, además, la capacidad de los astrocitos para producir *de novo* plasticidad de la transmision sináptica inhibitoria en CPFm, de forma similar a la que es generada por la actividad de las interneuronas PV+.

4.2.4. La activación de receptores $GABA_B$ en astrocitos es necesaria para la correcta ejecución de funciones cognitivas

Dado que demostramos que los $GABA_BRs$ en astrocitos tenían implicaciones importantes en la modulación de la transmisión sináptica inhibitoria, y puesto que el balance E/I está fuertemente ligado a la correcta ejecución de las tareas comportamentales (Gao et al., 2017; Yizhar et al., 2011a), nos propusimos estudiar si la ausencia de estos receptores en astrocitos daría lugar a alteraciones cognitivas. Para ello utilizamos ratones transgénicos para el gen $GABA_BR1$, que codifica para subunidad 1 del receptor de $GABA_B$ y se presenta flanqueado por una secuencia flox (Haller et al., 2004). Con el objetivo de eliminar la expresión del receptor $GABA_B$ en astrocitos, se expreso la Cre-recombinasa en astrocitos de CPFm selectivamente mediante transfección viral (AAV2.5-GFAP-Cre-mCherry)(Figura 4.37A), a partir de ahora estos animales los denominaremos como GbKO, y a los animales control (AAV2.5-GFAP-Cre-mCherry sobre animales hermanos no floxeados) los llamaremos GbWT.

Estudios previos del laboratorio habían mostrado alteraciones en la señal del LFP en el hipocampo de ratones GbKO anestesiados (Perea et al., 2016), que han sido recientemente corroborados en el estriado, donde se han mostrado alteraciones comportamentales como consecuencia de la sobreactivación de los receptores $GABA_BR$ astrocitarios (Nagai et al., 2019).

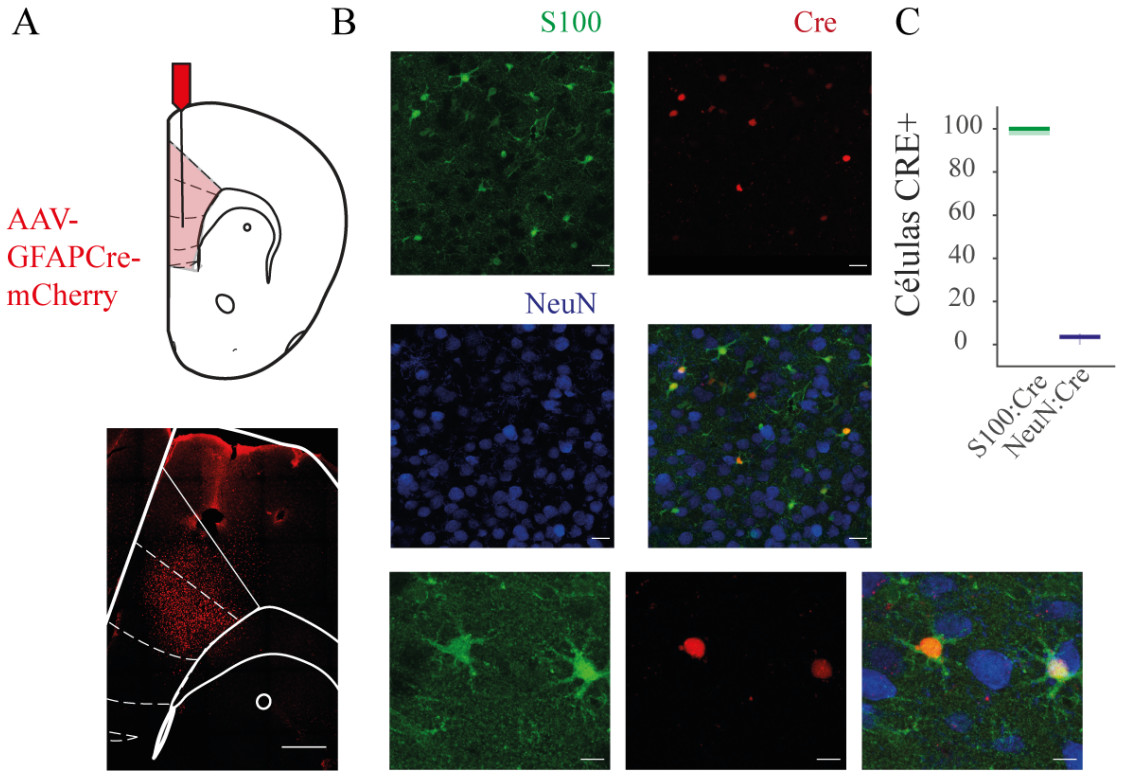


Figura 4.37 / ***Expresión de GFAPCre en astrocitos de CPFm.*** **A.** Sup, Esquema de inyección de GFAP-Cre-mcherry selectivamente en astrocitos de CPFm para generación de ratones GbKO. Inf, imagen confocal con expresión de Cre-recombinasa (rojo) en astrocitos de CPFm de ratones GbKO. **B.** Sup, Inmunocitoquímica de S100 (verde), Cre (rojo), NeuN (azul). Inf, Detalle de astrocitos mostrando expresión Cre en núcleo (rojo). Escala 50 y 20 μm, respectivamente. **C.** Colocalización Cre:S100 y Cre:NeuN. Nótese la expresión selectiva de la recombinasa en astrocitos.

Nuestro estudio se limita a la CPFm, generando ratones GbKO en astrocitos de esta region mediante la inyección de virus en este área (Figura 4.37A), donde comprobamos la selectividad de la expresión viral en astrocitos (colocalización mCherry:s100, $P<0.001$;Figura 4.37B,C). Además, se analizaron los niveles de expresión del receptor GABbR1 en la membrana celular astrocitaria mediante estudios inmucitoquímicos (Figura 4.38).

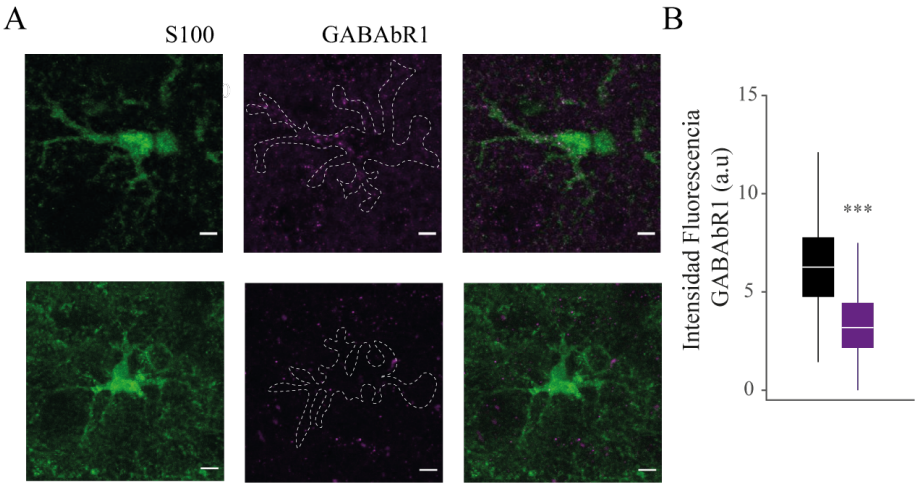


Figura 4.38 / *Disminución de niveles $GABA_BR1$ en astrocitos GbKO.* **A.** Sup, inmunocitoquímica de astrocito en GBWT para S100 (verde) y $GABA_BR1$ (morado). Inf, astrocito en ratón GbKO. Nótese la disminución de los niveles de $GABA_BR1$. **B.** Cuantificación de niveles de fluorescencia de $GABA_BR1$ en astrocitos de animales GbWT vs GbKO. N=129 y 159 astrocitos, respectivamente ***P<0.001; One-Way Anova.

Para asegurar no sólo la disminución en la expresión del receptor $GABA_B$ en astrocitos, sino también su deficiencia funcional se analizaron las respuestas de Ca^{2+} en estos astrocitos GbKO . Siguiendo estrategias virales ya descritas anteriormente, se transfectaron ratones GbKO con virus que contenían cyto-Gcamp6f para evaluar la dinámica de Ca^{2+} en los astrocitos de estos ratones GbKO frente a sus hermanos silvestres (GbWT)(Figura 4.39). La estimulación con baclofen (2 mM, 5 s), un agonista selectivo de los receptores $GABA_B$, provocó aumentos de Ca^{2+} en astroctios de ratones silvestres (confirmando resultados previos (Mariotti et al., 2016a; Perea et al., 2016; Mariotti et al., 2018; Nagai et al., 2019)), pero no indujo respuestas de Ca^{2+} en astrocitos de ratones GbKO siendo transfectados los dos grupos de ratones con el virus GFAP-Cre (Figura 4.39B)

Para testar que el baclofen selectivamente activaba los receptores de $GABA_B$ se aplicó en el baño el antagonista del receptor CGP5585 (5μM) en ratones GbWT (Figura 4.39D), demostrando la especificidad de las respuestas a la activación de estos receptores. Por otra parte, se comprobó que los astrocitos GbKO, que no respondian a baclofen, si tenían capacidad de aumentar su frecuencia de eventos de Ca^{2+} tras la estimulación con ATP (Lalo et al., 2014) (Panel D Figura 4.39), confirmando la ausencia selectiva de las respuestas de Ca^{2+} dependientes de receptores $GABA_B$ en ratones GbKO.

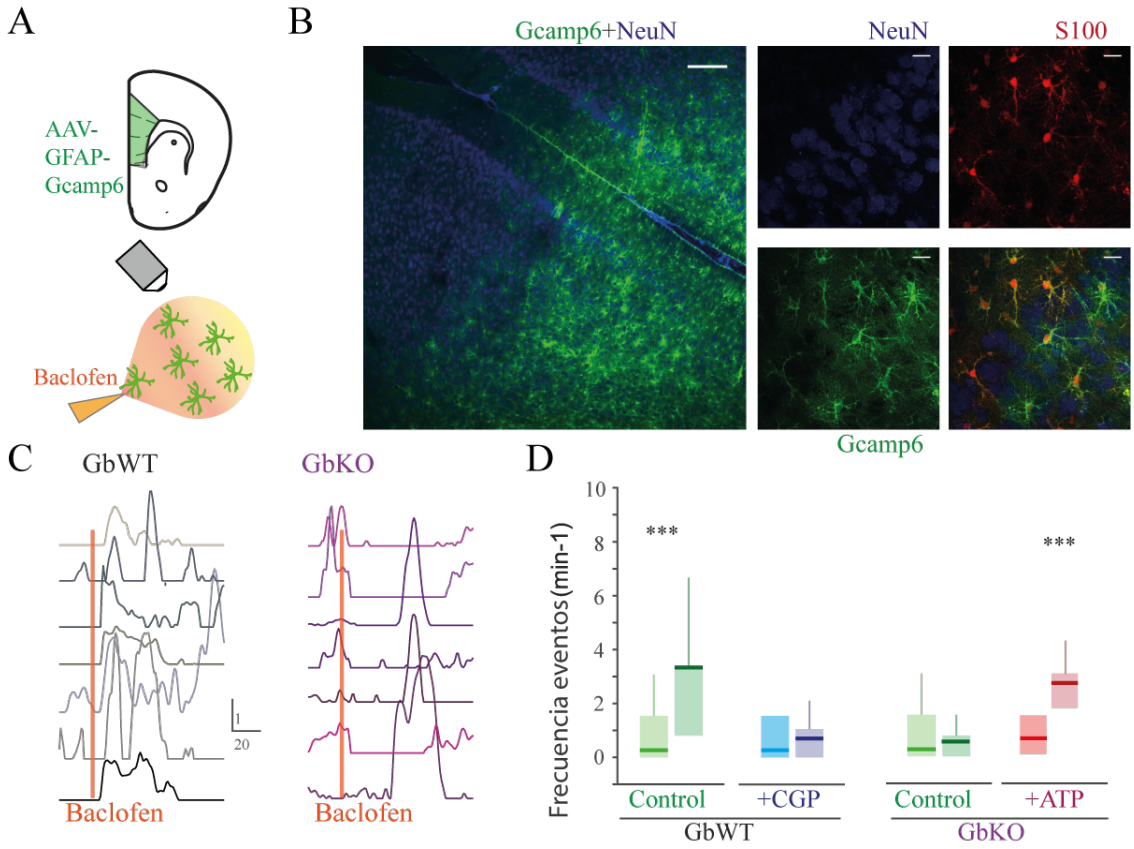


Figura 4.39 / ***Los astrocitos GbKO no responden al agonista baclofen.*** **A.** Esquema del diseño experimental con astrocitos de CPFm expresando GCaMP6-cyto y registro de dinámicas de Ca^{2+} ante pulsos de baclofen. **B.** Inmunocitoquímica de la expresión de GCaMP6-cyto en astrocitos de CPFm y detalle mostrando marcaje para NeuN (azul), S100 (rojo) y GCaMP6 (verde). Barras de escala 200 y 50 μm, respectivamente **C.** Izda, trazos representativos del aumento selectivo ante la estimulación con baclofen en GbWT y GbKO. Nótese la disminución de los eventos de Ca^{2+} tras la estimulación con el agonista selectivo baclofen en los ratones GbKO. **D.** Promedio de la frecuencia de eventos de Ca^{2+} en astrocitos antes y después de baclofen en las distintas configuraciones experimentales. Two-Way ANOVA Post hoc Tukey-Kramer.

Una vez comprobada la ausencia de señalización por $GABA_BR$ en los astrocitos de los ratones GbKO, se realizaron diferentes pruebas de conducta dirigidas a estudiar el comportamiento de estos, especialmente aquellos test que evalúan paradigmas comportamentales que presentan una implicación directa de CPFm en las tareas que requieren memoria de trabajo, planificación y toma de decisiones.

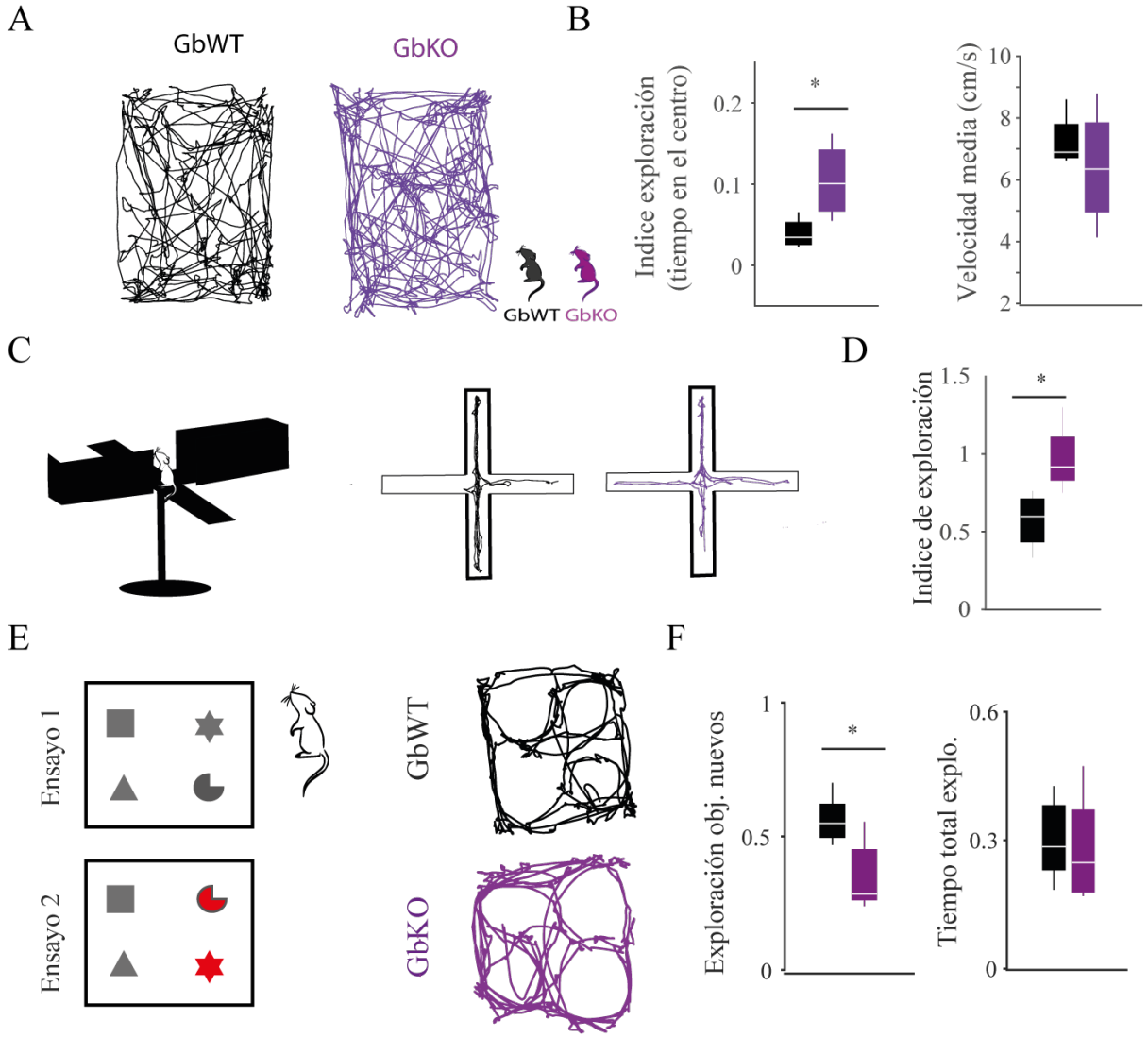


Figura 4.40 / ***La ausencia de $GABA_BR$ en astrocitos de CPFm condiciona la conducta de ratones GbKO.*** **A.** Trazos representativos de las trayectorias de animales GbWT y GbKO en el campo abierto. Nótese el aumento del tiempo en el centro de los animales GbKO. **B.** Valores para el índice de exploración de centro frente a bordes y velocidad media de movimiento para GbWt frente a GbKO. **C.** Izda, esquema del Elevated Plus Maze (EPM) que presenta dos brazos abiertos y dos cerrados. Izda, trazos representativos de las trayectorias de animales GbWT (negro) y GbKO (púrpura) en el EPM. **D.** Índice de exploración calculado como el número de exploraciones a brazo abierto frente al numero de exploraciones a brazo cerrado. Nótese que los animales GbKO tienen más exploraciones a los brazos abiertos que sus hermanos GbWT, lo que se relaciona con menores niveles de ansiedad. **E.** Izda, Esquema de paradigma comportamental, mostrando ensayo 1 de adquisición localización objetos y ensayo 2 con cambio de posiciones de 2/4 objetos (considerados ahora localizaciones novedosas). Dcha, trazos representativos de las trayectorias para animales GbWT y GbKO durante el ensayo 2. Nótese que los animales GbKO pierden la selectividad de exploración por las nuevas localizaciones. **F.** Resumen de los animales analizados (n=5 para GbWT, n=6 para GbKO) mostrando el con el índice de exploración entre posiciones nuevas y familiares, y el tiempo de exploración total durante los 3 minutos del ensayo, se cuantifican el número de exploraciones como acercamientos de la nariz a uno de los objetos.

Se realizaron varios test de conducta dirigidos a estudiar el comportamiento de los animales GbKO frente a sus hermanos GbWT, con idea de dilucidar la implicación del receptor $GABA_B$ en astrocitos de CPFm en tareas involucradas en comportamientos de tipo goal-directed, que directamente requieren de recuperación de memoria, planificación y toma de decisiones, funciones en las que la CPFm se encuentra altamente involucrada.

El análisis de estas pruebas comportamentales en los ratones GbKO mostró un incremento en el tiempo de exploración del centro de la arena en el test de campo abierto en comparación con sus hermanos silvestres (GbWT). Se comprobó que la velocidad de desplazamiento de exploración media era la misma para ambos grupos de animales, de forma que el tiempo que los GbKO pasaban en el centro de la arena no estaba relacionado con una menor velocidad durante la realización del test (Figura 4.40A,B). Además, el ratio de exploraciones de brazos abiertos frente a brazos cerrados en el laberinto elevado en cruz (EPM) estaba aumentado en los ratones GbKO frente a los animales GbWT (Figura 4.40C,D). Ambos resultados indicaban una reducción de los niveles de ansiedad frente a situaciones relacionadas con el estrés ante exploración de nuevos espacios (Steimer, 2011).

Además analizamos si el mayor índice de exploración se relacionaba con alteraciones en la exploración selectiva de objetos localizados en nuevas posiciones durante el test de localización de objetos (OIP, del inglés *Object in Place*). Los ratones GbKO mostraron una reducción en el tiempo empleado en los objetos localizados en las nuevas posiciones frente a los objetos familiares con respecto de los ratones GbWT (Figura 4.40E,F). Estos resultados indican el papel clave de la activación de los $GABA_BR$ astrocitarios en la CPFm en este tipo de tareas.

Por último, los ratones GbKO mostraron una clara deficiencia a la hora de realizar correctamente una prueba de toma de decisiones basada en la alternancia, laberinto en T. Los ratones GbKO, que debían aprender a elegir entrar en el brazo opuesto al que hubiesen visitado en el ensayo anterior, fallaban significativamente más a la hora de tomar la decisión correcta, y por tanto, en recibir la recompensa (n=13 ratones). Estos datos estaban en oposición a los obtenidos en sus hermanos silvestres (GbWT; n=9 ratones), que aprendían correctamente y, por tanto, recibían con mayor frecuencia la recompensa a partir del día 4 del test y sucesivos (Figura 4.41A-C).

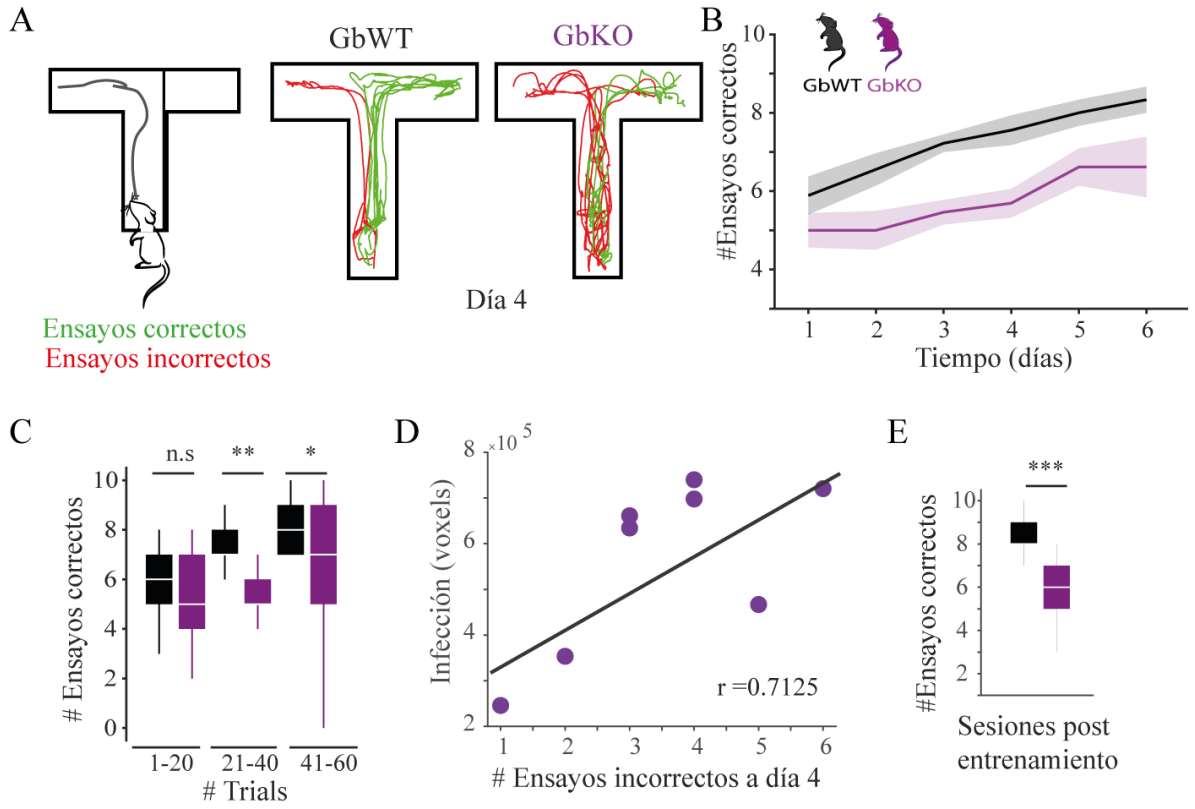


Figura 4.41 / *La ausencia de $GABA_BR$ en astrocitos de CPFm disminuye la memoria de trabajo.* **A.** Dcha, esquema de paradigma comportamental en laberinto T mostrando un ensayo de muestra hacia uno de los lados. Izda, sesión representativa (10 ensayos) del día 4 para GbWT y GbKO. Los ensayos correctos se dibujan en verde, mientras que incorrectos en rojo. Nótese el mayor número de ensayos incorrectos (líneas rojas) en GbKO con respecto a GbWT, lo que indica un peor rendimiento. **B.** Media de ensayos correctos para GbWT (negro) y GbKO (púrpura) durante los días de aprendizaje en la arena (lineas gruesas representan la media, áreas sombradas representan la SEM). **C.** Comparación estadística del número medio de ensayos correctos entre grupos animales. Los ensayos correctos se agrupan en grupos de 20 correspondientes a 2 días sucesivos. One- Way ANOVA post hoc Tukey-Kramer. **D.** Correlación de niveles de infección y la respuesta comportamental para los ratones GbKO. **E.** Media de 10 días (10 ensayos por día) para GbWT y GbKO tras el periodo de aprendizaje.

Encontramos una correlación positiva entre el área de CPFm con astrocitos mCherry positivos para la expresión de Cre-recombinasa, y por tanto deficientes en $GABA_BR1$, con el número de errores que cometían al realizar el test durante el día 4 (r=0.71, n=8 ratones) (Figura 4.41D). Estos resultados indicaban una clara relación entre el grado de transfección en los astrocitos y el bajo rendimiento cognitivo. Además, se analizó el efecto de la ausencia de $GABA_BR$ en astrocitos en sesiones sucesivas (10-20 más para cada animal) para evaluar los efectos a largo plazo, y se observó que los ratones GbKO no conseguían igualar los valores de referencia de los GbWT, lo que implicaba que la ausencia de $GABA_BR1$ en astrocitos

producía una disfunción sostenida de los circuitos de CPFm (Figura 4.41E). Estos resultados demuestran el importante papel que juegan los astrocitos a través de la señalización GABAérgica en la toma de decisiones y la planificación de tareas.

4.2.5. La ausencia de $GABA_BR$ en astrocitos modifica los patrones de oscilación de la CPFm *in vivo*

A continuación investigamos si la falta de señalización GABAérgica por $GABA_BR1$ en astrocitos, que producía alteraciones conductuales, inducía también modificaciones en la actividad oscilatoria de la CPFm provenientes de los patrones de actividad neuronal. Para ello se implantaron electrodos de registro multicanal en la CPFm que permitían estudiar cambios en el LFP y los patrones de disparo neuronales durante la ejecución del laberinto en T.

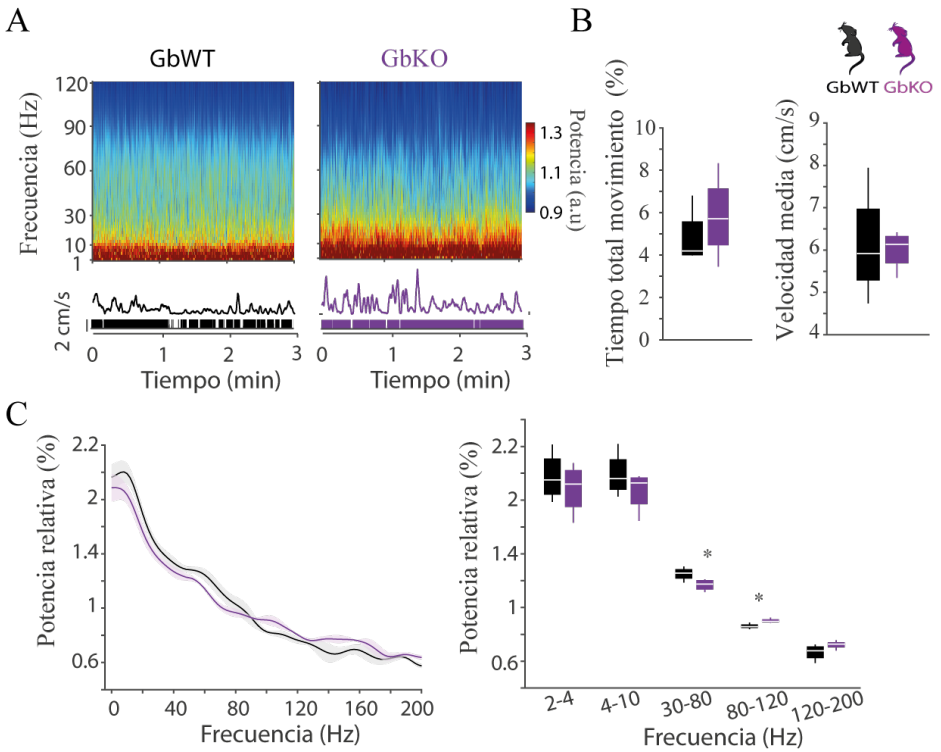


Figura 4.42 / ***Potencia del LFP durante la exploración activa.*** **A.** Se muestran 3 min representativos de los espectrogramas de frecuencia para ambos grupos animales durante EA. Inf, velocidad de movimiento durante 3 min de exploración activa. Aquellos puntos en los que la velocidad fue <3cm/s se muestran sin color. **B.** Medias velocidad y tiempo total de movimiento para GbWT (negro) y GBKO (púrpura) durante EA en los periodos de descanso durante los ensayos del laberinto en T. **C.** Espectrograma de frecuencias relativas para los dos grupos de ratones y potencia de las frecuencias agrupadas en rangos (Dcha).

En primer lugar se analizó el LFP durante las pausas de 5 minutos en los que los animales no realizaban la tarea de toma de decisiones en el laberinto en T, denominamos como exploración activa (EA) (Figura 4.42). En estos periodos se comprobó que la potencia relativa de las frecuencias gamma (30-80Hz) se reducía significativamente en los animales GbKO, mientras que las frecuencias más altas (80-120 Hz) se veían aumentadas frente a los animales GbWT (Figura 4.42C); sin que estos cambios estuvieses determinados por diferencias en el tiempo que estaban en movimiento, ni la velocidad media de los animales durante los periodos de EA (Figura 4.42B).

A continuación se analizó el LFP durante la toma de decisiones (tramos del test en los que el animal tenía que decidir entre izquierda y derecha), separando aquellos ensayos que implicaban decisiones correctas e incorrectas. Nos centramos en el analisis del LFP de aquellos ensayos que implicaban decisiones correctas. Para aportar una visión al respecto del desplazamiento de los animales en el espacio, el eje X se representó como espacio, quedando subdivido en: S (del inglés *start*), tramo en el que el animal empezaba a correr por el brazo de la T; DZ (del inglés *decision zone*), zona en la que el animal tenía que decidir alternar a izquierda o derecha; TP (del inglés *turning point*) zona en la que gira a izquierda o derecha en la T, donde ya se ha consolidado la decisión; y E (E, del inglés *End*), llegada al punto en el que se recibe (o no) la recompensa (Figura 4.43A,B). Los diferentes ensayos para cada animal se alinearon con respecto a TP.

En los ensayos correctos los ratones GbWT mostraban valores más elevados de gamma (30-60 Hz) que los animales GbKO (Figura 4.43C, E), estas diferencias eran significativas. Sin embargo, no se observaron cambios en frecuencias lentas como theta (4-10 Hz), o frecuencias más altas como HFO (del inglés *High Frequency Oscillations 80-120Hz*) entre los animales GbWT y GbKO durante la realización de estos ensayos correctos (Figura 4.43C-E).

Se comprobó para todos los animales que los electrodos de registro se encontraban correctamente posicionadas en CPFm (Figura 4.43F).

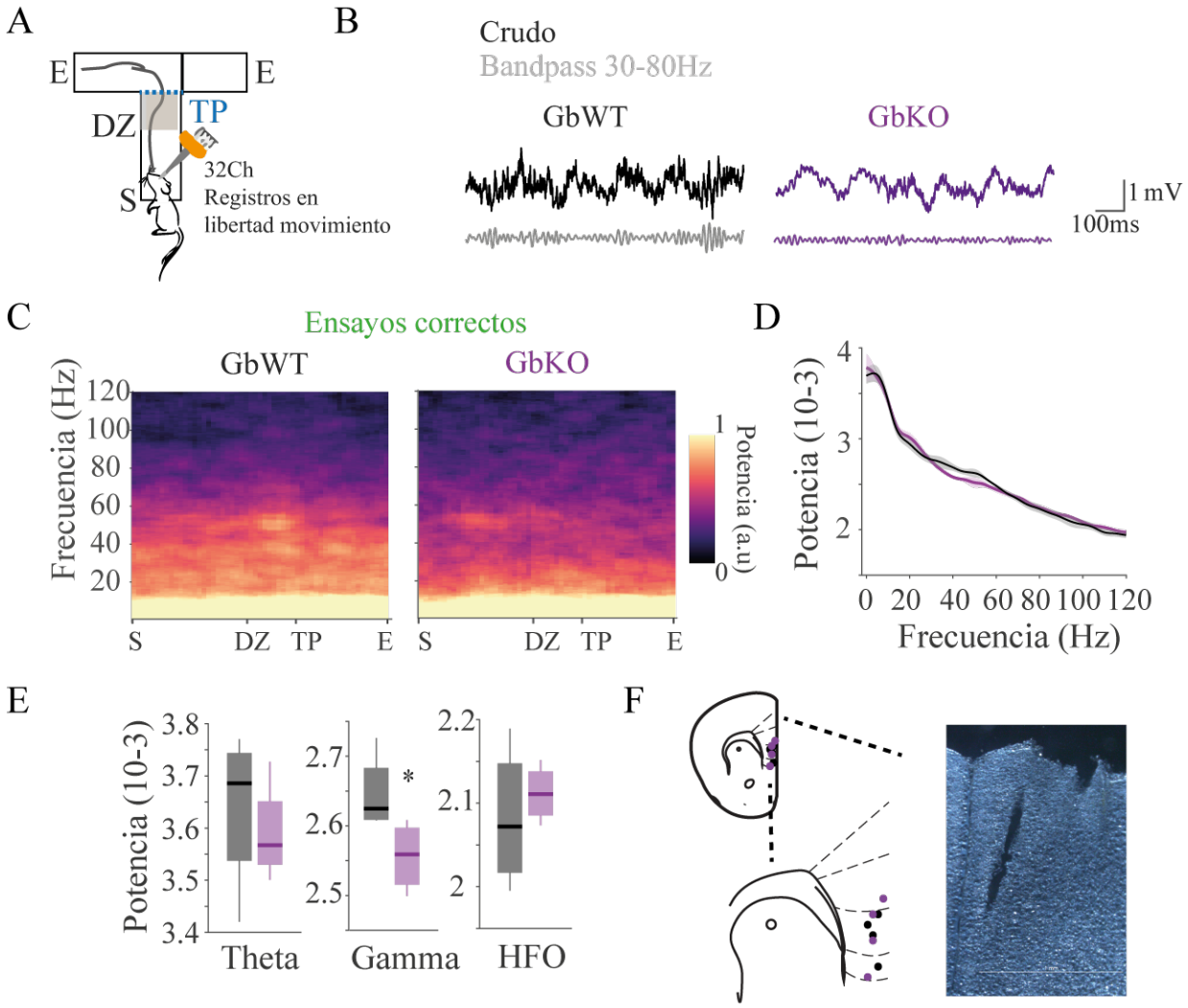


Figura 4.43 / ***Disfunción de las oscilaciones neuronales relacionadas con la toma de decisiones en la CPFm de ratones GbKO.*** **A.** Esquema de paradigma comportamental (s: inicio) de la tarea de alternancia del laberinto T; DZ: zona de decisión; TP: punto de giro; E: fin). **B.** Trazos representativos para GbWT (negro) y GbKO (púrpura) de la señal LFP sin procesar y las señales filtradas de paso de gamma durante un ensayo. **C.** Espectrogramas de frecuencia en el tiempo (eje X representado como espacio) para ambos grupos animales durante ensayos correctos.**D.** Espectrograma de la potencia de frecuencias en animales GbWT y GbKO. Nótese la disminución de gamma. **E.** Diagrama de cajas de la potencia para las tres bandas de frecuencia principales (Theta, Gamma, HFO del inglés *High Frequency Oscillation*) para ambos grupos animales. Nótese la disminución significativa de gamma para los ratones GbKO frente a GbWT * $P<0.05$. One Way-ANOVA. **F.** Representación de la localización de los electrodos de registros en cada uno de los animales implantados. Puntos morados representan animales GbKO y negros animales GbWT. Imagen representativa de una sección de CPFm mostrando el tracto del peine de electrodos. Escala, 1 mm.

Se ha sugerido que el acoplamiento entre distintas frecuencias (PAC, del inglés *Phase-Amplitud Coupling*) desempeña un papel importante en el procesamiento de las señales neuronales (Canolty and Knight, 2010). Esto es, la amplitud de una señal rápida es modulada por la fase de una señal lenta, y puede ser medida en base a un índice de modulación (PAC). Las oscilaciones gamma muestran una variación rítmica de magnitud y frecuencia dentro del ciclo de theta en el que se encuentran (Bragin et al., 1995; Buzsáki, 2002), por lo que determinamos si este acoplamiento o indice de PAC estaba alterado en los ratones GbKO durante la toma de decisiones.

El análisis de los *comodugramas* (del inglés *comodugram* [1]) de PAC demostró que en contraste con la modulación que se observa en ratones GbWT (Figura 4.44C), los ratones GbKO mostraron una menor eficacia en el acoplamiento entre la amplitud y la fase de estas frecuencias (P = 0.040, Figura 4.44B).

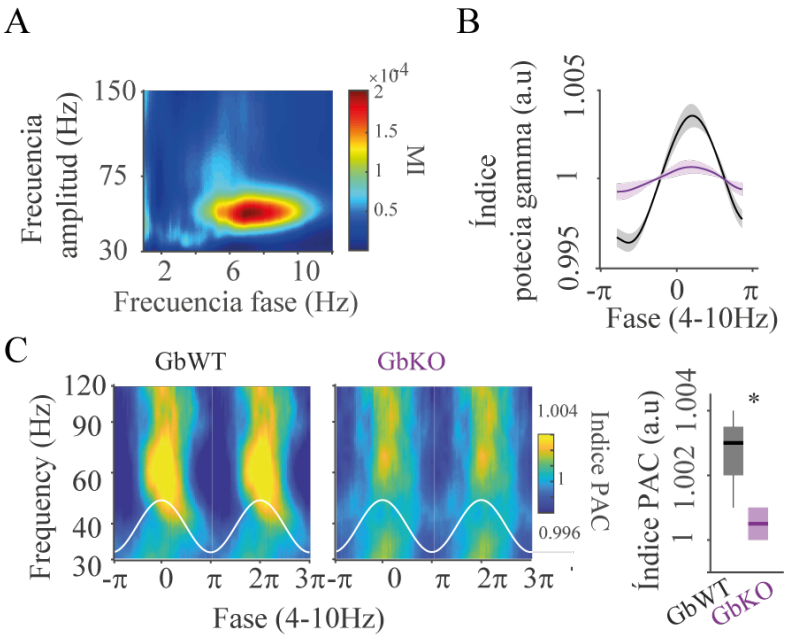


Figura 4.44 / ***Alteración de PAC en ratones GbKO.*** **A.** Perfiles de frecuencia-frecuencia entre para animal GbWT. **B.** Sup, potencia media de toda la frecuencia de gamma (30-80 Hz), para cada fase de theta (PAC). La línea negra o púrpura representa la media en los ratones GbWT o GbKO, respectivamente. Las áreas sombreadas representan el SEM. Inf, Gráfica de cajas y estadística del índice de PAC para GbWT vs GbKO. El índice de potencia gamma (PAC) se calculó para cada ratón como la proporción de la potencia máxima y mínima de gamma. **C.** Potencia media de las distintas frecuencias de gamma, para cada fase de theta en ratones GbWT y GbKO. Nótese que en el caso de los animales GbKO la modulación del PAC se pierde.

[1] En referencia a la representación gráfica de correlaciones de frecuencia

La fase para calcular los comodugramas de PAC se seleccionó en Theta (4-10 Hz) en base al acoplamiento observado entre la frecuencia 2-10 Hz y la frecuencia 30-150 Hz, previamente calculada para los animales GbWT (Figura 4.44A). El análisis del acoplamiento de amplitud en fase indicaba el estado general del circuito en los GbWT y su disfunción en los animales GbKO (Figura 4.44A-C).

Estos resultados mostraron que los ratones GbKO exhiben una disfunción general de la integración temporal de la información que impide el correcto aprendizaje de tareas que implican toma de decisiones dependientes de los circuitos locales de CPFm.

4.2.6. Modificación de los patrones de disparo de las neuronas de CPFm en ratones GbKO

A continuación se analizó la frecuencia de disparo de las poblaciones neuronales clasificadas como excitadoras e inhibidoras (ver Material y Métodos 3.11) en función del resultado de la prueba comportamental (respuesta correcta o incorrecta) en los ratones silvestres y GbKO.

Se observó que los ratones GbKO presentaban un aumento global en la frecuencia de disparo en las células excitadoras e inhibidoras durante el test, comparadas con ratones GbWT (considerando ensayos correctos e incorrectos) (Figura 4.45A). En el caso de los ensayos correctos, se observaba al representar cada neurona de manera individual en base a al promedio de disparo antes de DZ (eje X) y después de DZ (eje Y) una pérdida en la estructura de disparo (4.45B). Es decir, los animales GbWT presentaban poblaciones que aumentaban, disminuían o permanecían invariables (puntos en la diagonal en Figura 4.45B), mientras que las neuronas GbKO permanecían invariables, nótese el desplazamiento de los puntos morados mayoritariamente a la diagonal (Figura 4.45B, C). Además, los animales GbWT presentaban un incremento en la frecuencia media de disparo de las neuronas excitadoras e inhibidoras cuando el animal entraba en DZ (nótese aumento en la gráfica cuando el animal entra en la zona marcada en gris, P=0.032), que no estaba presente en los animales GbKO (Figura 4.45C).

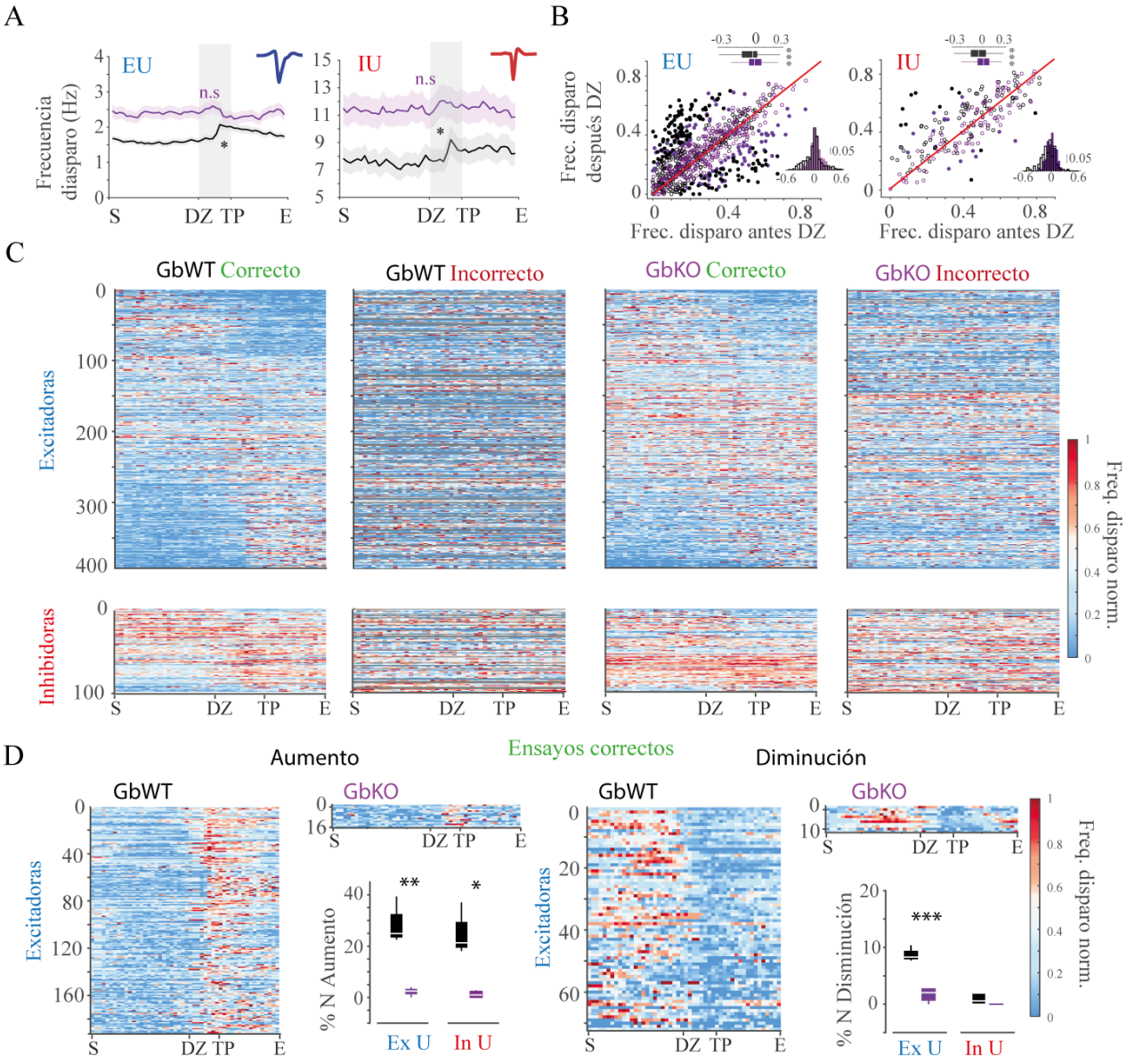


Figura 4.45 / ***La ausencia de $GABA_BR$ altera los patrones de actividad neuronal en CPFm.*** **A.** Frecuencia de disparo promedio para cada población de neuronas en GbWT (negro) y GbKO (púrpura). Izda, unidades excitadoras; Drcha, unidades inhibitorias. Las áreas sombreadas representan la SEM. **B.** Representación de la frecuencia de disparo promedio antes de la entrada en DZ y después de entrar en DZ para cada neurona. Nótese como las unidades de los animales GbWT se encuentran alejados de la diagonal con respecto a los GbKO. Inset sup, coeficiente de variación para cada distribución. Inset inf, histograma de distribución poblacional. **C.** Distribución de los PAs para un conjunto de neuronas registradas durante la prueba. Cada fila representa una sola unidad (neurona), con frecuencia disparo normalizada con respecto a su frecuencia de disparo máxima, diferenciando ensayos correctos e incorrectos. Sup, neuronas excitadoras; Inf, población de las neuronas inhibidoras. **D.** Distribución de unidades que representan subpoblaciones que aumentan (izquierda) y disminuyen (derecha) para unidades excitadoras. Inset, gráfico de cajas comparando subpoblaciones de GbWT y GbKO para unidades excitadoras, así como unidades inhibitorias. Para la comparación estadística, se expresa la subpoblación de cada ratón como el porcentaje de unidades que representan de la población total para ese tipo de unidades para los dos grupos de animales. **P<0.01 y *P<0.05.

Durante los ensayos correctos, las neuronas de ratones GbWT revelaron una clara disociación en el comportamiento de las células excitadora, al mostrar cambios en la frecuencia de disparo cuando el animal entraba en DZ, con un 27 % de las neuronas excitadoras mostrando un incremento en la actividad (192 de 853) y un 10 % con una reducción de la actividad (72 excitadoras de 853) (Figura 4.45C,D). Estos grupos se redujeron significativamente en animales GbKO, 16 unidades excitadoras de 409 aumentaron su disparo y 10 de 409 lo disminuyeron (Figura 4.45C,D). Las células inhibidoras mostraron una subpoblación que aumentaba la frecuencia de disparo durante las pruebas correctas (23 de 110)(cf. (Kim et al., 2016)) que también desaparecieron en los animales GbKO (2 de 109)(Figura 4.45C,D).

Estos resultados muestran las dificultades de los animales GbKO para mantener un código en la estructura de disparo de su población total que permita integrar la información, mostrando la alteración de las frecuencias de disparo de sus poblaciones excitadoras e inhibidoras. Cabe destacar que los patrones de actividad neuronal observados en los animales GbKO son similares a la actividad mostrada por parte de las neuronas en animales GbWT durante ensayos incorrectos (Figura 4.45 (Gregoriou et al., 2014; Kim et al., 2016)).

Para explorar la relación entre las respuestas de las neuronas individuales y las fluctuaciones en el LFP, analizamos la tasa de disparo de las neuronas respecto a la fase de frecuencia de gamma (30-80 Hz) en ratones GbWT y GbKO. Descubrimos que el porcentaje de neuronas que estaban significativamente acopladas a la fase de gamma estaba disminuido en animales GbKO, tanto para las células excitadoras (17 % frente a 5 % P=0.013, Chi-cuadrado) como para las inhibidoras (24 % frente a 7 % P=0.002, Chi-cuadrado). Además, este acoplamiento también se perdía cuando los animales realizaban ensayos incorrectos, tanto en animales GbWT como GbKO (Figura 4.46). Estos datos tomados en conjunto, indican que la ausencia de $GABA_BR$ en astrocitos disminuye la codificación funcional a través de descargas reguladas con precisión a la fase de gamma durante la toma de decisiones en la CPFm.

Los patrones de disparo, mostrados en los gráficos polares, y el alineamiento observado en las interneuronas GbWT a la fase de gamma ($\sim 270^o$) son consistentes con la dinámica del ritmo gamma dirigida por las neuronas PV+, que ha sido previamente descrita como impulsada por las PV+ (Pritchett et al., 2015; Kim et al., 2016; Buzsáki and Wang, 2012). Figura 4.46).

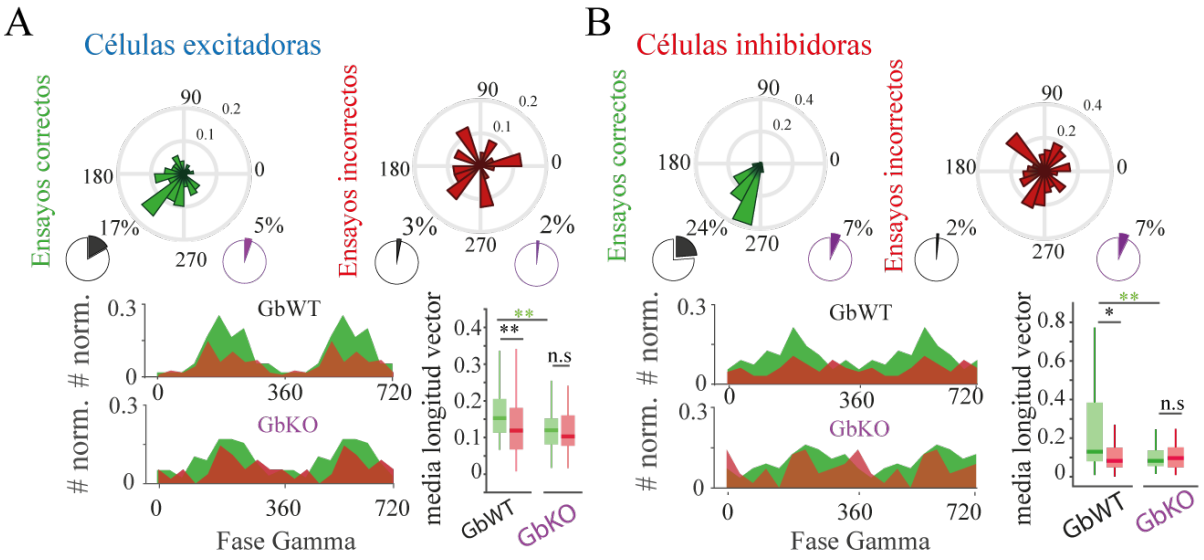


Figura 4.46 / ***Las neuronas de ratones GbKO pierden el disparo acoplado a la fase gamma durante la realización de tareas cognitivas.*** **A.** Sup, distribución polar de neuronas excitadoras representativa durante la fase gamma para un animal GbWT durante los ensayos correctos (verde) e incorrectos (rojo). Medio, gráficos circulares indican el porcentaje de neuronas que estaban significativamente acopladas a la fase de gamma (P <0.05, Rayleigh test). Inf, PAs para todas las unidades excitadoras durante los ensayos correctos (verde) e incorrectos (rojo) para GbWT (negro) y GbKO (púrpura) a lo largo de la fase gamma. Dcha Inf, longitud media del vector para la población total de neuronas. Se trata de una medida del grado de acoplacimiento a la fase de gamma para las células (tomada de 0 a 1, donde 1 es máximo acoplamiento). **B.** Igual que en (A) pero para unidades inhibitorias.

4.2.7. La activación de astrocitos con melanopsin mejora la realización de tareas cognitivas

Dado que melanopsin es capaz de generar un aumento del tono inhibitorio al estimular astrocitos, estudiamos si su activación en astrocitos *in vivo* podría tener efectos sobre el comportamiento. Tras la inyección de virus que contenían melanopsin (AAV2.5-GFAP-melanopsin-mCherry, (Figura 4.47A,B) y la implantación de fibras ópticas en CPFm, observamos que la estimulación optogenética de los astrocitos con un ritmo theta-gamma alteró el comportamiento en el laberinto en T (n=7 ratones infectados con vector y n=12 ratones infectados con melanopsin).

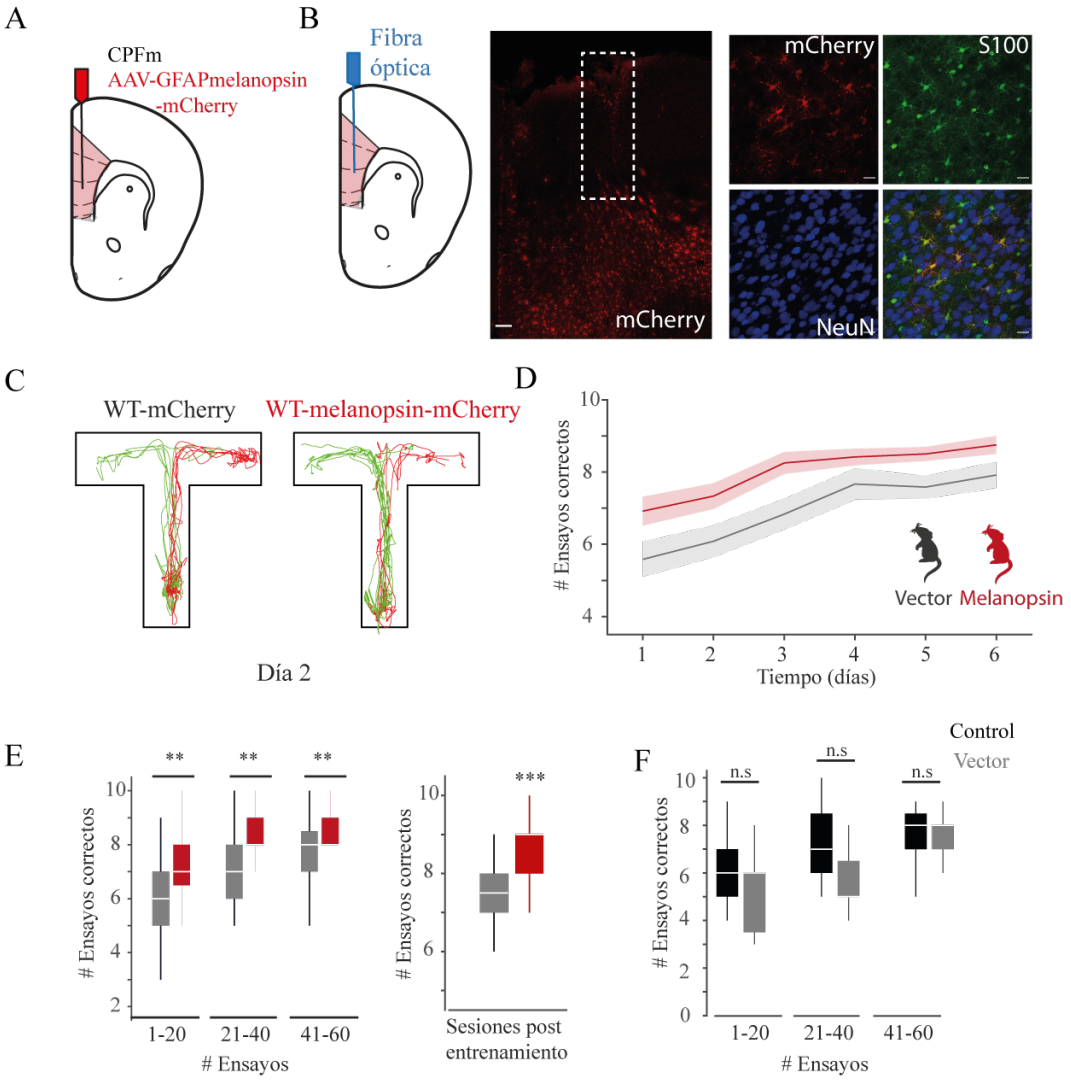


Figura 4.47 / ***La activación de astrocitos con melanopsin mejora la toma de decisiones.*** **A.** Esquema de la transfección con melanopsin en astrocitos de CPFm. **B.** Izda, esquema de implante de fibra óptica en CPFm para estimulación de astrocitos durante realización de test de conducta. Medio, Melanopsin expresándose en astrocitos de CPFm. Punta de flecha indica marca de la fibra óptica. Escala 50 μm. Dcha, Inmunohistoquímica de astrocitos expresando melanopsin en CPFm, con melanopsin (rojo), S100 (verde) y NeuN (azul). **C.** Sesión representativa (10 ensayos) del día 2 para ratones transfectados con vector y melanopsin (ensayos correctos en verde, incorrectos en rojo). Nótese el mayor número de ensayos correctos (líneas verdes) en el ratón estimulado con melanopsin pese a estar en una fase muy temprana de realización del test, indicando un mejor rendimiento. **D.** Media de ensayos correctos para vector (gris) y melanopsin (rojo) durante los días de aprendizaje en el laberinto (áreas sombreadas SEM). **E.** Izda, Comparación estadística del número medio de ensayos correctos entre grupos animales. Los ensayos correctos se agrupan en grupos de 20 correspondientes a 2 días sucesivos. One- Way ANOVA post hoc Tukey-Kramer.Izda, Media de 10 días (10 ensayos por día) para animales vector y Mmelanopsin posterior a periodo de aprendizaje. **F.** Comparación estadística del número medio de ensayos correctos entre animales control (sin estimulación, ni infección) y vector (AAV-mCherry y estimulación con luz mediante fibra óptica). Nótese que el efecto selectivo de melanopsin no es debido a la luz o a la infección viral ya que no se aprecian diferencias entre los animales vector y control.

La estimulación de astrocitos aumentó el número de aciertos disminuyendo además el tiempo de aprendizaje de la tarea (Figura 4.47C-E). Nótese que los animales que expresaban melanopsin mostraron un ratio de aciertos del 80 % en el día 2, un incremento significativo frente a los animales control para este mismo periodo (Figura 4.47D,E). Se comprobó que la luz *per se* no tenía nigún efecto sobre el comportamiento ya que los animales inyectados con vector (AAV2.5-GFAP-mCherry) y estimulados con luz no presentaron diferencias frente a los animales silvestres (Figura 4.47F).

Además, se observó que la estimulación de astrocitos con melanopsin también mejoraba el tiempo de exploración de objetos localizados en una nueva posición (OIP) (Figura 4.48), sin alterar el tiempo de exploración total frente a los controles.

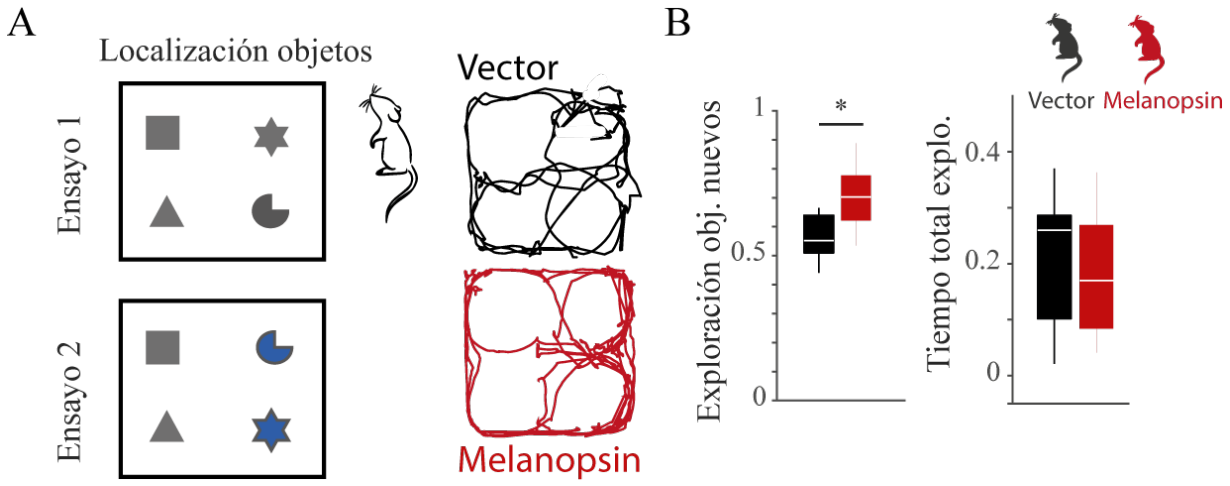


Figura 4.48 / ***La expresión de melanopsin en astrocitos mejora OIP.*** **A.** Esquema del paradigma comportamental, mostrando ensayo 1 de adquisición localización objetos y ensayo 2 con cambio de posiciones de 2/4 objetos (considerados ahora localizaciones novedosas). Dcha, trazos representativos para animales Vector y Melanopsin durante el día 2. Nótese que los animales melanopsin pasan más tiempo en el lado correspondiente a los objetos con las nuevas localizaciones. **B.**Resumen de todos los animales con el índice de exploración entre posiciones nuevas y familiares. Izda, tiempo de exploración total durante los 3 minutos del ensayo (exploraciones analizadas como acercamientos de nariz a uno de los objetos) *P<0.05. One-Way ANOVA.

4.2.8. La estimulación con melanopsin en animales GbKO rescata las deficiencias observadas en la toma de decisiones

Con el fin de estudiar si la activación de astrocitos con melanopsin podía rescatar los déficits en la toma de decisiones observados en los animales GbKO, se expresó selectiva-

mente melanopsin en los astrocitos que presentaban ausencia del receptor $GABA_BR1$. Para ello y posteriormente a la generación los animales GbKO en CPFm mediante la estrategia previamente descrita, una semana después estos mismos animales fueron transfectados con melanopsin (Figura 4.49A) e implantados con fibras ópticas siguiendo el procedimiento descrito en el Capítulo de Materiales y Métodos.

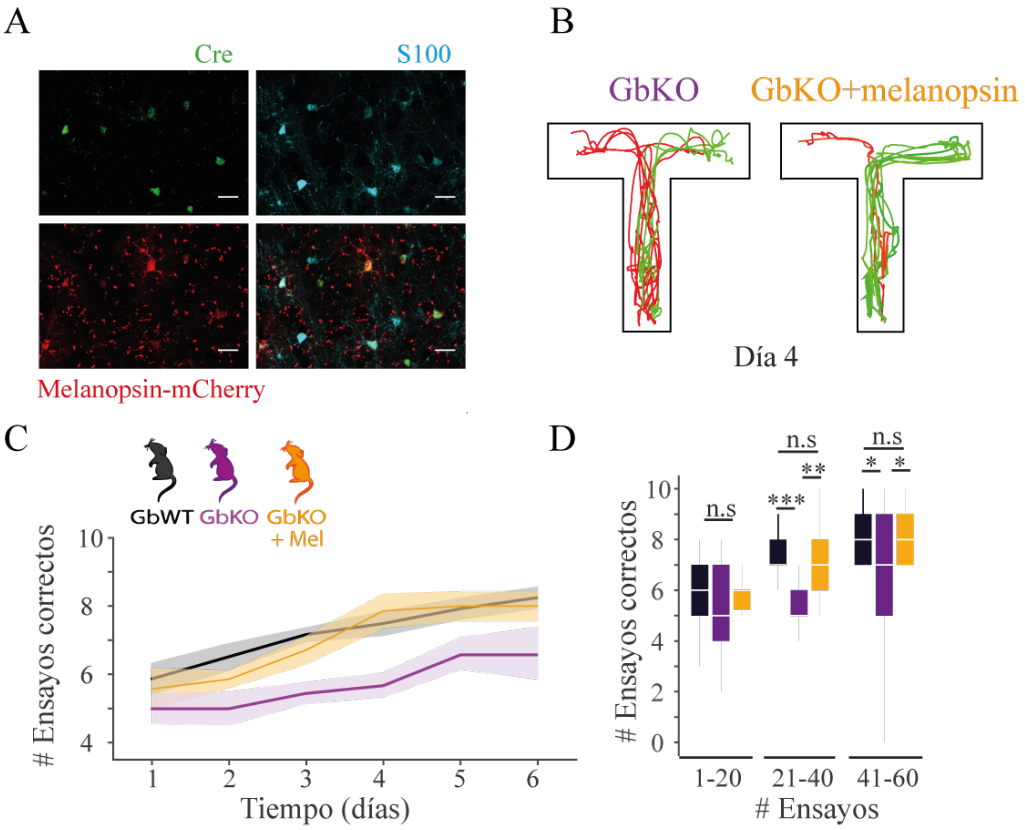


Figura 4.49 / ***La expresión de melanopsin en astrocitos rescata las deficiencias de animales GbKO en la toma de decisiones.*** **A.** Dcha, Inmunocitoquímica de astrocitos expresando melanopsin en CPFm de animal GbKO con melanopsin (rojo), S100 (celeste) y Cre (verde). Nótese la colocalización para Cre y Melanopsin sobre los astrocitos de la CPFm. **B.** Sesión representativa (10 ensayos) del día 4 para GbKO y GbKO-Melanopsin (ensayos correctos en verde, incorrectos en rojo). Nótese el mayor número de ensayos correctos en el ratón estimulado con melanopsin pese a ser GbKO. **C.** Media de ensayos correctos para GbKO (púrpura) y GbKO-melanopsin (naranja) durante los días de aprendizaje en el laberinto (áreas sombreadas SEM). **D**. Gráfico de cajas con comparación estadística del número medio de ensayos correctos entre grupos animales. Los ensayos correctos se agrupan en grupos de 20 correspondientes a 2 días sucesivos. One- Way ANOVA post hoc Tukey-Kramer. Nótese como los animales GbKO-melanopsin (naranja) se comporta igual que GbWT (negro) mientras los niveles de aprendizaje en la tarea no son alcanzados por GbKO (púrpura).

La estimulación optogenética de los astrocitos con el patrón theta-gamma durante la realización de los ensayos mostró que los animales GbKO eran capaces recuperar la capacidad

de realización de la tarea a niveles similares a los ratones silvestres (GbWT) (Figura 4.49; N=7 ratones GbKO con expresión de melanopsin).

Por tanto, estos resultados muestran como la actividad de los astrocitos es suficiente para modular las respuestas de los circuitos corticales responsables de la memoria de trabajo y la toma de decisiones, sugiriendo que las oscilaciones gamma que aparecen de manera fisiológicas en la CPFm durante este tipo de tareas son dependientes de la señalización GABAérgica en los astrocitos.

Capítulo 5

Discusión

5 | Discusión

5.1. Melanopsin para el control preciso de redes neurogliales

Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral muestran la eficiencia y precisión del uso de melanopsin como herramienta optogenética para el estudio de redes neurogliales. Durante las últimas dos décadas se ha demostrado que los astrocitos modulan la actividad neuronal por medio de diferentes mecanismos, que incluyen procesos dependientes e independientes de la señalización de Ca^{2+} intracelular (Agulhon et al., 2013; Araque et al., 2014; Bindocci et al., 2017; Bazargani and Attwell, 2016). La optogenética aparece como una herramienta ideal para lograr modificaciones específicas, con la posibilidad de controlar con precisión temporal y de tipo celular las dinámicas en los circuitos, revolucionando el campo de la Neurociencia (Yizhar et al., 2011b). Por tanto, el uso de la optogenética en astrocitos y su manipulación específica podría esclarecer el papel de los astrocitos en la función cerebral (Xie et al., 2015).

Nuestros resultados describen por primera vez el uso de melanopsin, un fotopigmento acoplado a proteínas G, presente en las neuronas ganglionares de la retina, como una nueva aproximación experimental para estimular con precisión las señales de Ca^{2+} en astrocitos. Melanopsin presenta una cinética lenta en respuesta a la luz visible, con un pico de absorción a 480nm (Do et al., 2009; Mure et al., 2016), regulando la excitabilidad celular durante varias decenas de segundos, incluso después de apagarse la luz, lo cual permite una ventana de integración temporal extendida a las neuronas ganglionares de la retina (Sexton et al., 2012). En este contexto, las características de melanopsin (alta fotosensibilidad, regulación de la dinámica intracelular de Ca^{2+} y cinética lenta) parecen convertirla en el candidato ideal para manipular la fisiología de los astrocitos.

Nuestro estudio revela que la activación de melanopsin induce aumentos de Ca^{2+} en los

microdominios y corrientes de membrana relacionadas con los canales de K^+ activados por Ca^{2+}, que tienen lugar en respuesta a un amplio rango de pulsos de luz. La correlación encontrada entre la frecuencia de eventos de Ca^{2+} y la duración del pulso de luz podría sugerir la capacidad de los astrocitos para ajustar su excitabilidad a diferentes rangos de actividad sináptica. Adicionalmente, observamos que los eventos de Ca^{2+} en microdominios en astrocitos de ratones Ip3r2$^{-/-}$ transfectados con melanopsin no mostraban cambios en frecuencia o amplitud después de la estimulación con luz (Srinivasan et al., 2015), aunque existían aún eventos transitorios de Ca^{2+} independientes de la señalización por IP3R2, posiblemente mediados por aperturas del poro de transición mitocondrial (Agarwal et al., 2017). La estimulación por luz inducía corrientes de salida en astrocitos Ip3r2$^{-/-}$, lo que sugería que la expresión de melanopsin era adecuada aún cuando no se encontraron cambios significativos en la dinámica de los eventos de Ca^{2+} ni en los microdominios ni en el soma, y no se detectaron cambios sinápticos en las neuronas vecinas. Por tanto, estos datos apoyan la relevancia de la señalización por IP3R2 (Sherwood et al., 2017) como la vía principal reclutada por melanopsin en astrocitos para la estimulación del Ca^{2+} intracelular.

Considerando que los astrocitos expresan un amplio repertorio de receptores acoplados a proteínas G, que son activados por Nts liberados sinápticamente, el uso de melanopsin como herramienta óptica representa un enfoque adecuado para estimular la vía de señalización endógena ligada a la activación de proteínas G. El llenado de la red astrocitaria con GDPβS y BAPTA permitió demostrar la dependencia de la señalización por proteínas G y Ca^{2+} intracelular al bloquear el efecto sobre la transmisión sináptica excitadora que inducía melanopsin, una potenciación transitoria de la amplitud de los EPSCs.

Cabe destacar que la adquisición de imágenes utilizada es de 1 Hz, lo que compromete el registro de eventos de Ca^{2+} de altas frecuencias. Futuros estudios utilizando un escaneo más rápido o registros 3D (Bindocci et al., 2017; Stobart et al., 2018) permitirán monitorizar con mayor precisión la dinámica de Ca^{2+} inducida por melanopsin en los astrocitos, pudiendo revelar acciones más rápidas de esta opsina.

Melanopsin se muestra como una herramienta eficaz para estimular la gliotransmisión en astrocitos, liberando glutamato y ATP/Ado de manera Ca^{2+}-dependiente y a través de mecanismos vesiculares (Henneberger et al., 2010; Jourdain et al., 2007; Min and Nevian, 2012; Perea and Araque, 2007; Schwarz et al., 2017). Mientras el glutamato inducía SICs

dependientes del receptor NMDA en las neuronas de CA1, aumentando la excitabilidad de estas neuronas, ATP/Ado inducían la potenciación sináptica mediante la activación de los receptores purinérgicos A2A y P2Y1. La acción autocrina del ATP se ha demostrado previamente en respuesta a OptoXRs (Figueiredo et al., 2014) y la estimulación de ChR2 (Shen et al., 2017), lo que podría reconciliar las respuestas generadas por los diferentes receptores purinérgicos después de la estimulación con melanopsin (Hamilton and Attwell, 2010). Como resultado, la activación óptica de astrocitos podría provocar la liberación de ATP, que activaría astrocitos vecinos a través de la estimulación de los receptores P2Y1 dando lugar al reclutamiento de un mayor número de células que participarían de la potenciación sináptica de los EPSCs impulsada finalmente por la adenosina (como producto de la degradación extracelular de ATP o por liberación directa de adenosina desde los astrocitos) y la activación de los receptores neuronales A2A presinápticos. Cabe destacar que no todas las señales de Ca^{2+} inducidas por melanopsin fueron competentes para liberar gliotransmisores, ya que la modulación de la transmisión sináptica sólo se observó después de la activación de astrocitos por encima de 5s, sugiriendo la existencia de un umbral de activación para que la neuromodulación inducida por astrocitos sea efectiva.

Es posible que la señalización purinérgica activada por melanopsin esté modulando la liberación de glutamato por parte de astrocitos a través de la activación de los canales TREK1 y BEST1, que se expresan preferentemente en microdominios adyacentes a las sinapsis glutamatérgicas induciendo SICs dependientes de la activación de NMDARs (Woo et al., 2012). Por ello, una acción cooperativa entre el ATP y la señalización glutamatérgica resultaría en el aumento de las SICs después de la estimulación de melanopsin. Además, las corrientes excitatorias derivadas de ATP a través de P2XRs también podían ser consideradas como SICs (Lalo et al., 2014, 2016). Es relevante mencionar que la liberación de D-serina, junto con el glutamato, se vería afectada después del bloqueo de la señalización vesicular , lo que podría derivar en una reducción de la frecuencia de las corrientes dependientes de NMDA (Papouin et al., 2017; Rasooli-Nejad et al., 2014).

Estudios previos en rodajas de hipocampo han demostrado que el ATP liberado por los astrocitos disminuye el número de receptores AMPA en las membranas postsinápticas a través de la activación del receptor P2X (Pougnet et al., 2014, 2016); sin embargo, la potenciación observada en la amplitud de los EPSCs en nuestro estudio no parece indicar que la activación de los receptores P2X7 estén contribuyendo de manera significativa a estas

respuestas (Pougnet et al., 2014); y además, la potenciación sináptica no se vió bloqueada en presencia del PPADS, un antagonista de P2XR. Alternativamente, el ATP liberado por los astrocitos puede estimular la activación P2XRs postsinápticos y provocar corrientes sinápticas purinérgicas que contribuyen a la transmisión excitadora (Lalo et al., 2016). Dada la complejidad en aislar el componente purinérgico de los EPSC rápidos, debido a su baja probabilidad y amplitud de sus eventos (Pankratov et al., 2007), no podemos excluir totalmente la contribución de P2XRs en los efectos descritos a través de melanopsin (Boué-Grabot and Pankratov, 2017); sin embargo, la magnitud de la modulación sináptica observada bajo el bloqueo P2XRs fue similar a las condiciones de control (P=0,190; t-test), datos que sugieren que el ATP liberado por los astrocitos modula la transmisión sináptica excitadora a través de un componente purinérgico que depende principalmente de la activación de los receptores P2Y1 y A2A.

Diversos estudios han demostrado que la manipulación optogenética de astrocitos con ChR2 modula las señales intracelulares de Ca^{2+} y la actividad neuronal regulando su tasa de disparo (Gourine et al., 2010; Perea et al., 2014; Tan et al., 2017), así como la transmisión sináptica excitadora e inhibidora (Perea et al., 2014; Sasaki et al., 2014), siempre bajo una alta tasa de estimulación (pulsos de luz de larga duración). De acuerdo con estudios previos, encontramos que la estimulación de ChR2 evocaba señales de Ca^{2+}, pero éstas fueron desencadenadas por pulsos de luz largos (10s y 20s); sin embargo, estímulos más cortos mostraron un capacidad de control notablemente reducida en la modulación del Ca^{2+} astrocitario comparado con el efecto de melanopsin (1 y 5s). Por el contrario, mientras que pulsos largos de luz sobre astrocitos que expresaban melanopsin desencadenaron una modulación transitoria de los EPSC, la estimulación de astrocitos que expresaban ChR2 produjo una potenciación sostenida de la transmisión sináptica, lo que sugiere que la activación de ChR2 podría desencadenar mecanismos adicionales a la señal de Ca^{2+} y liberación de gliotransmisor que restringen su capacidad para controlar de manera precisa y transitoria la transmisión sináptica (Beppu et al., 2014; Octeau et al., 2019). Por tanto, este estudio muestra las diferentes capacidades de melanopsin y ChR2 para desencadenar señales de Ca^{2+} en astrocitos y modular la actividad neuronal liberando glutamato o ATP. Nuestros datos sugieren que melanopsin y ChR2 modulan la actividad sináptica con diferentes escalas temporales. Con ello, a la hora de aumentar las opciones disponibles para la estimulación óptica de astrocitos, melanopsin ofrece condiciones más amplias para inducir cambios sinápticos de corta o larga duración. Además, nuestros datos apuntan a que las diferencias observadas entre estas dos

opsinas, en la magnitud y la duración de los cambios sinápticos, estarían asociadas a diferentes modos de liberación de gliotransmisores (Beppu et al., 2014); o a través de la modificación del ambiente iónico extracelular incrementando los niveles de K^+ y generando un aumento de la excitabilidad neuronal (Octeau et al., 2019). Cabe destacar, que la modulación inducida por melanopsin muestra un perfil temporal similar al de los cambios sinápticos mediados por los endocanabionoides o la activación GABAérgica de astrocitos (Martin et al., 2015; Perea et al., 2016), lo cual sugiere que la estimulación de melanopsin podría recapitular la activación de los astrocitos en condiciones fisiológicas, y la sitúan como opsina de referencia para evitar los efectos colaterales de la activación de astrocitos mediante canales iónicos (Octeau et al., 2019).

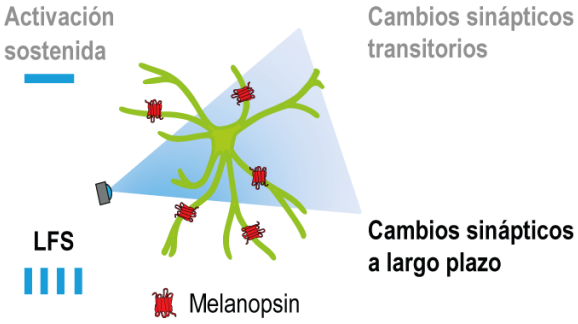


Figura 5.1 / *Melanopsin discrimina frecuencias de estimulación.* Esquema que muestra la capacidad de los astrocitos estimulados con melanopsin para decodificar la duración y la frecuencia de los protocolos de luz que originan respuestas sinápticas a diversas escalas temporales.

El papel de las señales de Ca^{2+} como código intracelular para la señalización y comunicación por parte de los astrocitos, sigue siendo motivo de debate (Araque et al., 2014; Bazargani and Attwell, 2016; Rusakov, 2015). Así, nos propusimos evaluar si los cambios en la dinámica de Ca^{2+} de los astrocitos podían tener un impacto diferencial en la red neuronal local. Encontramos que la estimulación a baja frecuencia de melanopsin (LFS, 0.06Hz) provocó respuestas significativamente más robustas de Ca^{2+} en procesos y soma de los astrocitos que los pulsos de luz continuos, y sorprendentemente, cambios duraderos en la transmisión sináptica excitadora (LTP). Estos resultados indican que los cambios en la duración y la frecuencia de los protocolos de luz aplicados a melanopsin, que simularían diversos estados de actividad de los astrocitos, provocan en estas células diferentes señales intracelulares de Ca^{2+}, en cuanto a su cinética y frecuencia, con consecuencias dispares sobre la plasticidad sináptica, esto es, fenómenos transitorios o efectos de larga duración. Así, mientras que un solo pulso de 5s induce la potenciación transitoria de los EPSCs, el protocolo LFS provocó LTP (Figura 5.1). Por tanto, estos datos sugieren que la modificación del código de la señal de Ca^{2+} en los astrocitos determina diferentes formas en plasticidad sináptica, lo que supone la contribución decisiva de los astrocitos a estados cerebrales concretos.

Se ha demostrado el papel de la señalización de astrocitos a en la modulación de los EPSCs a corto y largo plazo provocada por diferentes patrones de actividad neuronal postsináptica (Gómez-Gonzalo et al., 2015; Martin et al., 2015; Perea et al., 2016), así como la contribución de los astrocitos a los *Up and Down states* corticales, donde podrían desempeñar un papel crucial en el control de la sincronización neuronal (Poskanzer and Yuste, 2011, 2016). Nuestros resultados mostraron que períodos de actividad de baja frecuencia en los astrocitos pueden comprometer la plasticidad sináptica hipocampal a largo plazo, lo que afectaría el comportamiento del animal. Así, observamos que la activación de astrocitos con melanopsin *in vivo* inducía una mejora de las tareas de memoria dependientes de hipocampo (NOL), apoyando el papel de los astrocitos en los procesos de memoria y aprendizaje (Adamsky et al., 2018), y su potencial terapéutico como estimuladores del rendimiento cognitivo.

Recientemente se han descrito otros mecanismos que permiten la activación de vías intracelulares por medio de mecanismos optogenéticos como son los OptoXRs, receptores quiméricos que comprenden bucles intracelulares de receptores adrenérgicos fusionados a opsinas sensibles a la luz (Airan et al., 2009). Los OptoXR han sido aplicados a astrocitos en preparaciones en cultivo e *in situ* (Figueiredo et al., 2014; Tang et al., 2014), y también *in vivo*, donde han mostrado su impacto en el rendimiento de la memoria hipocampal (Adamsky et al., 2018). Sin embargo, se desconocen por el momento los detalles de las vías moleculares y las características subcelulares de la activación de estas proteínas G activadas por luz en astrocitos. Por el contrario, esta tesis proporciona una caracterización exhaustiva de los mecanismos de acción de melanopsin sobre la fisiología de la señalización del Ca^{2+} en astrocitos y las consecuencias para la transmisión sináptica excitadora. Mientras que nuevos estudios revelarán los beneficios y la idoneidad del uso de los OptoXRs o melanopsin, los datos aquí expuestos extienden el conjunto de herramientas optogenéticas existentes para la manipulación de astrocitos y el estudio de la interacción neurona-glía tanto *in situ* como *in vivo*. De esta forma, estos avances ofrecen una oportunidad excepcional para dilucidar el papel de las células gliales en las funciones superiores del Sistema Nervioso.

En resumen, los datos mostrados sugieren el uso de melanopsin para los estudios de la comunicación neurona-glia como una valiosa herramienta optogenética, revelando la implicación de los astrocitos en funciones cerebrales concretas. Estos resultados sugieren que la optogenética, y en concreto melanopsin, podrían servir como estrategias terapéuticas para

restaurar disfunciones en la señalización astrocito-neurona (debidas a una disminución de la señal de Ca^{2+} en astrocitos) en modelos animales de enfermedades neurodegenerativas y neuropsiquiátricas.

5.2. La señalización GABAérgica en astrocitos es necesaria para la correcta planificación y toma de decisiones

Los resultados obtenidos en esta tesis (a partir de la Sección 4.2) muestran por primera vez el papel crítico de los astrocitos en el mantenimiento de las oscilaciones gamma mediante la potenciación de la inhibición en la CPFm, que parece ser imprescindible para la recuperación de la memoria de trabajo y el control de la toma de decisiones (Brown and Pluck, 2000).

La existencia de señalización entre las interneuronas GABAérgicas y los astrocitos ha sido demostrada previamente indicando cómo el GABA liberado por las interneuronas conduce a elevaciones de Ca^{2+} en astrocitos, siendo mediadas por diversos mecanismos entre los que se encuentra la activación de los receptores $GABA_B$ (Andersson et al., 2007; Kang et al., 1998; Serrano et al., 2006; Mariotti et al., 2016a, 2018; Perea et al., 2016). Estos aumentos de Ca^{2+} pueden inducir la potenciación de la transmision sináptica inhibidora (Kang et al., 1998), o a la potenciación de la excitación (Perea et al., 2016) por el glutamato liberado por astrocitos, y la depresión heterosináptica de transmisión excitadora por adenosina derivada de ATP liberado por astrocitos (Andersson et al., 2007; Chen et al., 2013; Serrano et al., 2006).

Nuestros resultados demuestran que los astrocitos ejercen una modulación sobre las interneuronas de la CPFm, siendo esta regulación crítica para la potenciación de la inhibición sobre las células principales (PC). Hemos descrito la existencia de un mecanismos endógeno y dinámico por el cual la actividad de las interneuronas PV+ siguiendo patrones fisiológicos (ritmos theta-gamma) recluta la señalización de la red astrocitaria y produce la potenciación de la inhibición sobre las PC, generándose una regulación de retroalimentación positiva de la inhibición. Se han observado un efecto similar en los astrocitos después de la activación de interneuronas somatostatina positivas en el hipocampo, donde los astrocitos potencian el tono inhibitorio (Matos et al., 2018); sin embargo, estos estudios en el hipocampo no detecta-

ron modulación alguna tras la estimulación de las neuronas PV+, posiblemente debido a los protocolos de diferente frecuencia y/o duración estudiados o las herramientas optogenéticas empleadas para la activación de astrocitos, i.e ChR2 (Matos et al., 2018; Tan et al., 2017). Nuestros datos demuestran que la actividad sináptica theta-gamma de las interneuronas PV+ en ciclos de 30s activa la señalización por Ca^{2+} en los astrocitos de CPFm, de forma similar a lo reportado en corteza somatosensorial (Mariotti et al., 2018), donde se mostraba como estimulaciones de 30s de duración son capaces de modular el Ca^{2+} astrocitario, mientras que protocolos de menor duración sobre las neuronas PV+ no reclutaban la señalización de Ca^{2+} en astrocitos (Mariotti et al., 2018). Hemos observado que la interacción PV+-astrocito está mediada por la activación de receptores $GABA_B$ en astrocitos y el consiguiente aumento de Ca^{2+}. Esta estimulación GABAérgica en astrocitos estimula la liberación de glutamato que activa receptores mGluR1 en las células y/o los terminales inhibitorios potenciando así la liberación de GABA y el tono inhibitorio en las neuronas principales de CPFm (Figura 5.2).

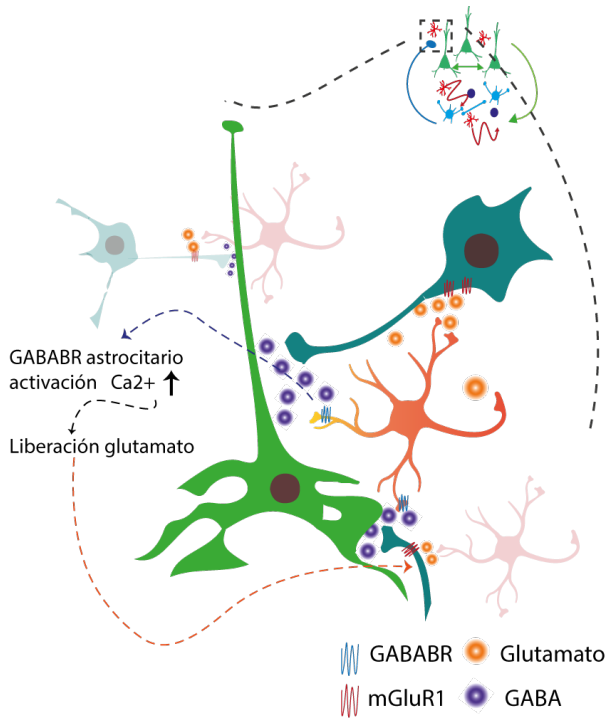


Figura 5.2 / ***Activación de astrocitos por protocolos de estimulación theta-gamma sobre las neuronas PV+.*** Esquema del mecanismos propuesto en el que los astrocitos se activan a través de $GABA_BR$ por el GABA liberado por las neuronas PV+ (en azul) y liberan glutamato que induce la potenciación del tono inhibitorio sobre las neuronas PC (en verde).

Las células PV+ disparan acopladas a frecuencias de gamma anidadas en oscilaciones theta (Buzsáki et al., 1983; Gloveli et al., 2005; Korotkova et al., 2010). Su alta tasa de disparo (son de tipo fast-spiking) supone la inhibición tónica de las neuronas sobre las que contactan, de esta manera en periodos largos de tiempo sin actividad intensa de las PV+ las neuronas PC aún pueden activarse; por lo tanto, la potenciación de la inhibición por

parte de los astrocitos en respuesta a periodos de actividad intensa de las neuronas PV+ actuaría como un filtro de paso alto sobre el circuito, activándose en respuesta a actividad de alta frecuencia y ampliando el rango de control de la inhibición sobre las PC. Debido a que alteraciones del equilibrio E/I se han relacionado con diferentes estados y patologías como la epilepsia, la esquizofrenia y los trastornos del estado de ánimo (Marín, 2012). Nuestros resultados sugieren que la señalización interneurona-astrocito podría estar implicada en los desequilibrios excitación/inhibición presentes en estados cerebrales alterados.

Considerando los distintos tipos de interneuronas, la señalización interneurona-astrocito, tiene por lo tanto, características particulares dictadas por el tipo específico de célula GABAérgica y sus sinapsis específicas, lo que extiende las posibilidades de regulación del equilibrio E/I por parte de los astrocitos utilizando diferentes mecanismos (transportadores GAT, gliotransmisión, etc). Como resultado, esta señalización específica GABAérgica permitiría a los astrocitos participar activamente en diversos comportamientos impulsados por subtipos particulares de interneuronas (Mariotti et al., 2018).

Nuestros resultados, enfocados al estudio de la señalización interneurona PV-astrocito, muestran la capacidad de los astrocitos para decodificar la actividad de las interneuronas PV+ y potenciar la transmisión GABAérgica. Así, la existencia de estos mecanismos para refinar la actividad de las sinápsis locales por medio de la actividad de astrocitos podría contribuir a controlar el equilibrio E/I en los circuitos corticales. Para comprobar esta hipótesis estudiamos cómo la potenciación de la inhibición afectaba a las oscilaciones locales de la CPFm *in vivo*. Nuestros datos mostraron que la realización exitosa de tareas relacionadas con la toma de decisiones se acompaña de un incremento de la potencia en la banda gamma en el LFP de CPFm generando además una actividad sincrónica de las interneuronas (Cardin et al., 2009). Además, durante este incremento de la potencia de gamma las células excitadoras también se sincronizaron a la fase de este ritmo (Hasenstaub et al., 2005), apoyando la idea de que el ritmo gamma proporciona el sustrato para la formación de redes de neuronas PC con disparos coordinados (Buzsáki and Wang, 2012; Sohal, 2016).

La generación de ratones deficientes para el receptor $GABA_B$ específicamente en astrocitos de CPFm (GbKO) se consiguió mediante aproximaciones virales en animales adultos, lo que permitió evaluar el impacto de esta señalización GABAérgica *in vivo*. Describimos que para que el incremento del gamma durante la ejecución de la tarea tuviese lugar era preciso

la activación de astrocitos mediante los receptores $GABA_B$. Esta activación tendría lugar por medio del GABA liberado por las interneuronas PV+, de acuerdo a los resultados observados en rodajas de CPFm, pero además, presumiblemente, también por otros tipos de interneuronas que se encontrarían activas *in vivo* (Matos et al., 2018; Tang et al., 2014; Deemyad et al., 2018). Los GbKO mostraron una pérdida del aumento en la potencia de gamma y la modulación tanto de las interneuronas como de las células excitadoras, lo cual se acompañaba con una disminución en el desempeño correcto de tareas que requerían la toma de decisiones. Recientemente, se ha descrito cómo los astrocitos podrían encontrarse implicados en la toma de decisiones dado que la activación selectiva por medio de ChR2 induce la liberación de L-lactato y rescata las alteraciones causadas en la coherencia entre la amigdala basolateral y la corteza cingulada anterior (ACC) por la hipersensibilidad visceral (Wang et al., 2017). Sin embargo, es importante destacar que la activación de astrocitos por medio de ChR2 no recapitula la activación fisiológica de estas células (Mederos et al., 2019; Octeau et al., 2019).

El estudio de las señales del LFP en la CPFm reveló una disminución en la magnitud de PAC en los ratones GbKO de manera global, tanto en los ensayos correctos como incorrectos, indicando un deterioro del circuito (independientemente de si se encontraba ejecutando la tarea). En esta linea existen evidencias que sugieren que dependiendo de la región específica registrada o de la tarea específica que se esté realizando, la combinación exacta de la fase de las bajas frecuencias (theta) y la amplitud de las altas frecuencias (gamma) pueden ser diferentes (Cohen et al., 2009; Osipova et al., 2008). Nuestros datos sugieren, por tanto, la importancia de los receptores $GABA_B$ astrocitarios en el mantenimiento del acoplamiento entre las distintas frecuencias dentro de los rangos fisiológicos, ya que la ausencia de estos receptores en astrocitos de la CPFm deterioró tanto el comportamiento cognitivo así como el índice de PAC, disminuyendo el acoplamiento theta-gamma, en los ratones GbKO. Se ha descrito que las oscilaciones gamma se correlacionan con la memoria de trabajo (Yamamoto et al., 2014), por lo que estos datos apoyan la importancia del ritmo gamma que subyace a estos comportamientos, y aportan nuevos datos sobre la relevancia de los astrocitos en su mantenimiento.

En esta línea, nuestros resultados acerca de la distribución de los disparos de las células individuales concuerdan con la hipótesis de la comunicación entre diversas áreas cerebrales a través de la coherencia (CTC) para orquestar los comportamientos innatos (Fries, 2015) y los modelos basados en balance E/I. Durante los ensayos correctos, que imponen la recupe-

ración de la memoria y la toma de decisiones, en los animales GbWT las células excitadoras muestran una preferencia a una fase de gamma (220º), y una fase ligeramente más tardía para las inhibidoras (270º), lo que implicaría la regulación de las interneuronas ante la activación previa excitadora (microsegundos de desfase temporal apuntan a este cambio en la fase preferente) (Kim et al., 2016; Sohal, 2016; Cardin, 2016). Así, después de la activación de las interneuronas las neuronas excitadoras se vuelven transitoriamente silentes, volviendo a su potencial de reposo, lo cual se refleja en las señales registradas en el LFP, y se traduce en la generación transitoria de ciclos de gamma preferentemente en los picos de las oscilaciones (Sohal, 2016). Nuestros resultados muestran que la comunicación mediada por GABA sobre los astrocitos es necesaria para el correcto mantenimiento de este balance y, por tanto, para la correcta regulación de las oscilaciones gamma, que en último término estarían mediando la sincronización entre la CPFm y otras áreas cerebrales (Sohal, 2016).

Se ha descrito que la codificación, el almacenamiento y la recuperación de la memoria de trabajo así como de procesos de atención están fuertemente ligadas a la sincronización de las oscilaciones gamma (Kim et al., 2016; Pritchett et al., 2015; Roux et al., 2012; Senkowski and Gallinat, 2015; Siegle et al., 2014; Yamamoto et al., 2014), siendo la potencia de gamma modulada por la fase de los ritmos en la frecuencia de theta (Buzsáki and Wang, 2012; Sohal et al., 2009; Tort et al., 2008; Varela et al., 2001). Por lo tanto, la sincronización de la actividad de las PC se ha propuesto como un mecanismo por el cual la oscilación en gamma podría promover el paso de información relevante dentro de los circuitos e impulsar la realización de tareas cognitivas con mayor eficacia (Buzsáki and Wang, 2012; Salinas and Sejnowski, 2000). En este sentido, nuestros datos apuntan a que los astrocitos podrían tener un papel relevante en la consecución de esta eficacia cognitiva, puesto que contribuyen directamente a la recuperación de la memoria y la realización de tareas motivacionales, beneficiando, en ultima instancia, la toma de decisiones. Nuestros resultados mostraron que los ratones GbKO perdieron la precisión de los disparos en fase con gamma tanto en las PC como en las células inhibidoras; por lo que la codificación durante la toma de decisiones se vio deteriorada. Observamos una pérdida de las subpoblaciones de neuronas que selectivamente aumentan su frecuencia de disparo durante estas tareas cognitivas en los ratones GbKO. Desde un punto de vista funcional, las subpoblaciones que aumentan o disminuyen su frecuencia de disparo, y que se ven alteradas en los animales GBKO, podrían implicar un mecanismo de incremento de la señal/ruido del sistema, siendo la población silenciada aquella que presentaría señales con información no relevante, mientras que se potenciarían aquellas neuronas que reciban

información de alguna significancia para el sistema (subpoblación que aumenta su frecuencia de disparo). Por tanto, la capacidad de astrocitos de potenciar y deprimir la transmisión sináptica los posicionaría como la unidad de control ideal del índice señal/ruido.

En conjunto, estos datos establecen que los astrocitos a través de la comunicación con neuronas GABAérgicas son necesarios para mantener tanto el disparo de las neuronas de CFPm en la fase de las oscilaciones gamma, como la correcta ejecución en tareas de alternancia.

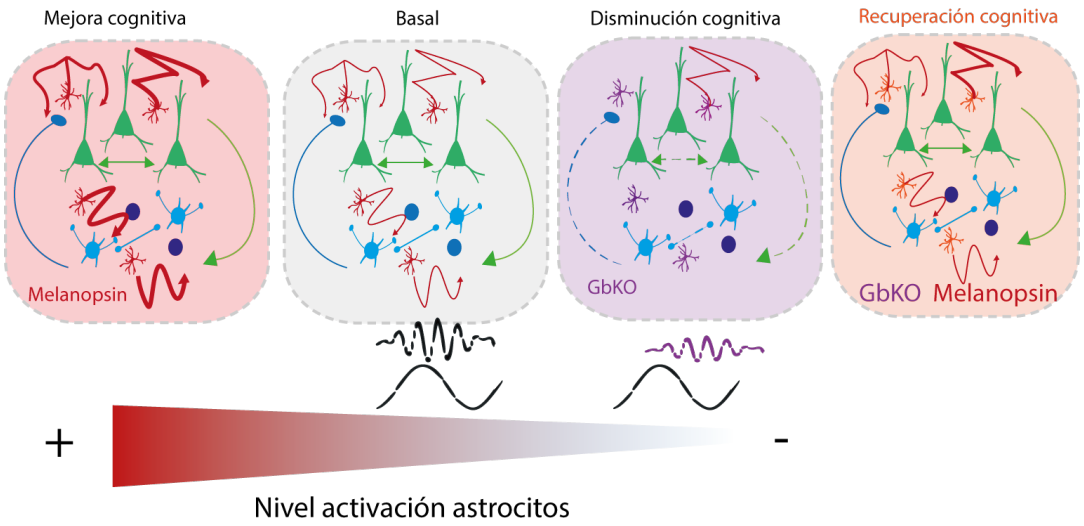


Figura 5.3 / ***Realización de tareas cognitivas en animales control, GbKO y transfectados con melanopsin.*** Esquema de la propuesta de señalización en las redes neuro-gliales donde los astrocitos estarían mediando en tareas cognitivas y las vías subyacentes.

Con el fin de evaluar el impacto de la actividad astrocitaria *per se* en las redes corticales *in vivo* utilizamos melanopsin (Mederos et al., 2019), simulando un patrón de actividad theta-gamma sobre los astrocitos análogo al mostrado por las interneuronas PV+ en los ratones GbKO. Sorprendentemente, los resultados mostraron que la activación selectiva de astrocitos no solo mejoraba la realización de tareas de toma de decisiones, sino también rescató otras deficiencias cognitivas que presentaban los ratones GbKO (reconocimiento de objetos y laberinto en T), revelando el potencial terapéutico de los astrocitos en las patologías que acontecen con disfunciones corticales.

Esta modulación selectiva por parte de los astrocitos con patrones concretos de actividad theta-gamma supone la primera descripción de correlación entre patrones de activación con-

cretos en astrocitos *in vivo*, la modulación de las oscilaciones gamma, y que son suficientes para la mejora de la toma de decisiones. Aunque nuestros datos *in vitro* muestran que la estimulación de melanopsin en CPFm genera la potenciación de la inhibición mediada por glutamato, los mecanismos que subyacen las modificaciones comportamentales generadas por melanopsin *in vivo* requieren ser estudiados en detalle. (Nagai et al., 2019; Wang et al., 2017; Martin-Fernandez et al., 2017).

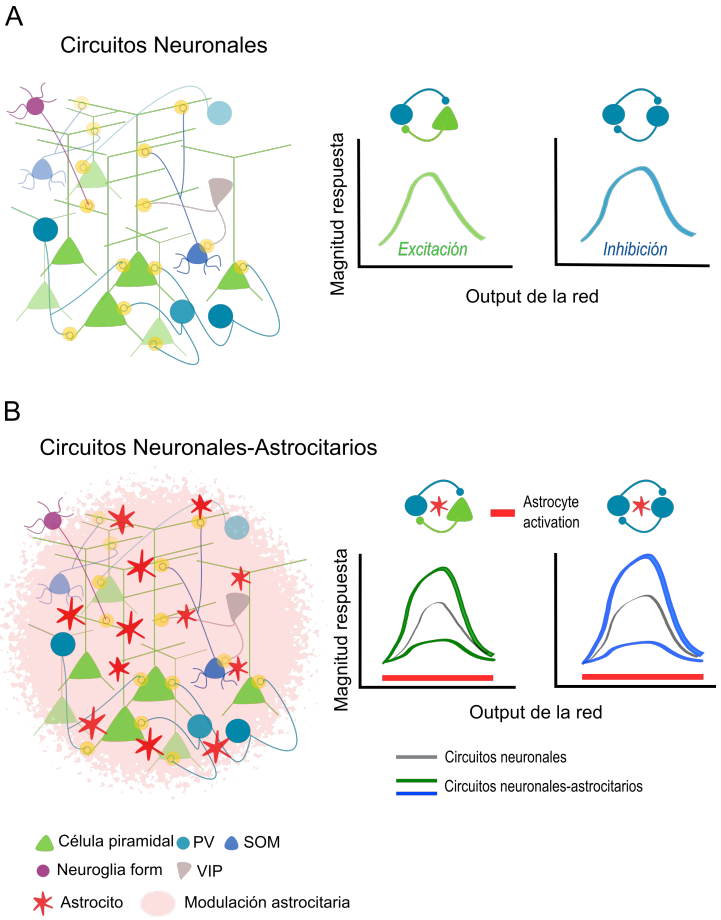


Figura 5.4 / ***Los astrocitos participan en la modulación de la actividad de los circuitos corticales, aumentando sus posibilidades computacionales.*** Los astrocitos son capaces de responder a diferentes Nts, tipos celulares en diferentes áreas del cerebro y bajo diversos patrones de estimulación, modificando las salidas computacionales del sistema y ampliando la diversidad de respuestas ante un mismo estimulo. La participación de los astrocitos en las redes neuronales aumenta de forma eficiente la plasticidad de las mismas. Adaptada de (Mederos and Perea, 2019)

Dado que la CPFm puede encontrarse realizando la integración de información que proviene de varias regiones cerebrales (Bedwell et al., 2014; Murugan et al., 2017), es muy posible que otras áreas también participen en la realización de tareas de conllevan la toma de decisiones, y en las que presumiblemente los astrocitos también estén jugando un papel relevante.

Evidencias recientes indican que la sobre-estimulación de los $GABA_BRs$ astrocitarios en el estriado influye negativamente en la atención y generan comportamientos de hiperactividad y déficit de atención (Nagai et al., 2019). Considerando que el estriado presenta proyecciones a la CPFm (Fitoussi et al., 2018), ésta podría actuar como un procesador ascendente de los circuitos que controlan los comportamientos motivacionales donde los astrocitos tendrían un papel crucial.

En conjunto, los datos presentados en esta tesis doctoral revelan consecuencias novedosas e inesperadas de la señalización interneurona-astrocito con implicaciones clave en la actividad de las redes neuronales. Los astrocitos decodifican la actividad temporal de las interneuronas PV+ y transforman las señales neuronales, que afectan la función del circuito a través de mecanismos basados en diferentes escalas de frecuencia y tiempo. Así, la activación de astrocitos, por acción de las neuronas PV+ a un ritmo oscilatorio theta-gamma, están directamente involucrados en la codificación de la información de los circuitos de CFPm, afectando sus propiedades funcionales y los comportamientos que de ella derivan (Figura 5.4), siendo competentes en expandir las capacidades de computación de las redes neuronales.

Capítulo 6

Conclusiones

Conclusiones

Considerando los resultados obtenidos junto con los análisis descritos en el Capítulo 4 y según la interpretación expuesta en el Capítulo 5, se concluye que:

1) Melanopsin, un fotopigmento que activa vías de señalización mediadas por GPCRs, es competente para estimular aumentos de Ca^{2+} a nivel de los procesos y el soma de los astrocitos.

2) Melanopsin recapitula la señalización endógena de Ca^{2+} derivada de la activación de reservorios sensibles a IP3R2.

3) La activación de melanopsin en astrocitos estimula la liberación de los gliotransmisores glutamato y ATP/adenosina, que activan receptores NMDA y purinérgicos en las neuronas piramidales de CA1, respectivamente.

4) Melanopsin permite el uso de patrones de frecuencia para reclutar respuestas fisiológicas diferenciales en astrocitos, y con ello descubrir la amplia gama de cambios sinápticos mediados por astrocitos, desde efectos transitorios a efectos a largo plazo (LTP).

5) Las respuestas comparativas del uso de ChR2 y melanopsin indican el mayor rango dinámico de melanopsin como herramienta optogenética para estudios astrocito-neurona.

6) Melanopsin se muestra como una herramienta óptima para el control temporal de la actividad astrocitaria *in vivo*, mejorando las capacidades cognitivas y el rendimiento de la memoria dependiente de hipocampo.

7) Los astrocitos en CPFm responden a GABA liberado por las interneuronas PV+ durante la actividad theta-gamma de larga duración, con aumentos de Ca^{2+} dependientes de receptores GABAb.

8) La activación GABAérgica de los astrocitos induce la liberación de glutamato que media una potenciación de la inhibición en las células principales de CPFm.

9) La ausencia de receptores GABAb en astrocitos de CPFm deriva en un empeoramiento cognitivo relacionado con la toma de decisiones y las capacidades de la memoria de trabajo.

10) Los ratones con astrocitos deficientes para el receptor GABAb en CPFm presentan una disminución en la potencia del ritmo gamma relacionado con la memoria de trabajo y la correcta toma de decisiones.

11) Los ratones con astrocitos deficientes para el receptor GABAb presentan una disminución del grado de acoplamiento entre los ritmos theta-gamma en la CPFm.

12) La señalización GABAérgica de los astrocitos desempeña un papel crucial en el control de la frecuencia de disparo de las neuronas corticales durante la toma de decisiones.

13) La estimulación con melanopsin en ratones con astrocitos deficientes para el receptor GABAb en CPFm recupera las habilidades cognitivas y mejora la toma de decisiones, demostrando la capacidad de los astrocitos para controlar el grado de actividad de los circuitos corticales que subyacen a los comportamientos del individuo.

Conclusions

Given the above results, the analysis described in section 4, and according to the interpretation presented in section 5, data from the present PhD thesis allow extracting the following conclusions:

1) Melanopsin, a photopigment that activates signaling pathways mediated by GPCRs, is competent to stimulate Ca^{2+} increases at the level of the processes and soma of astrocytes.

2) Melanopsin recapitulates the endogenous Ca^{2+} signaling pathways derived from the activation IP3R2 intracellular reservoirs .

3) The activation of melanopsin in astrocytes stimulates the release of the gliotransmitters glutamate and ATP/adenosine, which activate NMDA and purinergic receptors at CA1 pyramidal neurons, respectively.

4) Using different light frequency patterns, melanopsin recruits diverse physiological responses in astrocytes, revealing the wide range of synaptic changes mediated by astrocytes, from transient effects to long-term effects (LTP).

5) The comparative responses using ChR2 and melanopsin indicate higher dynamic range, tunning, for melanopsin as optogenetic tool for astrocyte-neuron studies.

6) Melanopsin is shown as an optimal tool for a precise temporal control of astrocyte activity in vivo, improving cognitive abilities and hippocampal-dependent memory performance.

7) Astrocytes in mPFC respond to GABA released by PV+-interneurons during sustained theta-gamma activity with GABAb receptor Ca^{2+}-dependent elevations.

8) GABAergic activation of astrocytes induces glutamate release that mediates an enhancement of inhibitory transmission in mPFC principal cells.

9) The absence of GABAb receptors in astrocytes from mPFC leads to cognitive worsening related with decision making and working memory abilities.

10) Mice showing astrocytes lacking GABAb receptors in mPFC pressent a decrease in power of gamma rhythm linked to working memory and proper decision making choices.

11) Mice showing astrocytes deficient for GABAb receptors in mFPC display a reduced phase-amplitude coupling between theta-gamma rhythms.

12) Astrocytic GABAergic signaling plays a crucial role in controlling the firing of cortical neurons during decision making.

13) Melanopsin stimulation rescues the cognitive disabilities and improves decision making in mice showing astrocytes deficient for GABAb receptors in mPFC, validating the capacity of astrocytes to control the gain of cortical circuits' activity, which underlies mouse behavior.

Bibliografía

Adamsky A, Kol A, Kreisel T, Doron A, Ozeri-Engelhard N, Melcer T, Refaeli R, Horn H, Regev L, Groysman M, London M, Goshen I (2018) Astrocytic Activation Generates De Novo Neuronal Potentiation and Memory Enhancement. *Cell* 174:59–71.

Agarwal A, Wu PH, Hughes EG, Fukaya M, Tischfield MA, Langseth AJ, Wirtz D, Bergles DE (2017) Transient Opening of the Mitochondrial Permeability Transition Pore Induces Microdomain Calcium Transients in Astrocyte Processes. *Neuron* 93:587–605.

Agulhon C, Boyt KM, Xie AX, Friocourt F, Roth BL, Mccarthy KD (2013) Modulation of the autonomic nervous system and behaviour by acute glial cell Gq protein-coupled receptor activation in vivo. *Journal of Physiology* 591:5599–5609.

Airan RD, Thompson KR, Fenno LE, Bernstein H, Deisseroth K (2009) Temporally precise in vivo control of intracellular signalling. *Nature* 458:1025–1029.

Alivisatos AP, Chun M, Church GM, Greenspan RJ, Roukes ML, Yuste R (2012) The brain activity map project and the challenge of functional connectomics. *Neuron* 74:970–4.

Allen NJ, Eroglu C (2017) Cell Biology of Astrocyte-Synapse Interactions. *Neuron* 96:697–708.

Allen NJ, Lyons DA (2018) Glia as architects of central nervous system formation and function. *Science* 362:181–185.

Amzica F, Neckelmann D (1999) Membrane Capacitance of Cortical Neurons and Glia During Sleep Oscillations and Spike-Wave Seizures. *Journal of Neurophysiology* 82:2731–2746.

Anderson JS, Carandini M, Ferster D (2000) Orientation Tuning of Input Conductance, Excitation, and Inhibition in Cat Primary Visual Cortex. *Journal of Neurophysiology* 84:909–926.

Andersson M, Blomstrand F, Hanse E (2007) Astrocytes play a critical role in transient heterosynaptic depression in the rat hippocampal CA1 region. *The Journal of Physiology* 585:843–852.

Andrade-Talavera Y, Duque-Feria P, Paulsen O, Rodríguez-Moreno A (2016) Presynaptic Spike Timing-Dependent Long-Term Depression in the Mouse Hippocampus. *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)* 26:3637–3654.

Araque A, Li N, Doyle RT, Haydon PG (2000) SNARE protein-dependent glutamate release from astrocytes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20:666–73.

Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG (1999) Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends in neurosciences* 22:208–15.

Araque A, Carmignoto G, Haydon PG (2001) Dynamic Signaling Between Astrocytes and Neurons. *Annual Review of Physiology* 63:795–813.

Araque A, Carmignoto G, Haydon PG, Oliet SHR, Robitaille R, Volterra A (2014) Gliotransmitters Travel in Time and Space. *Neuron* 81:728–739.

Arcuino G, Lin JHC, Takano T, Liu C, Jiang L, Gao Q, Kang J, Nedergaard M (2002) Intercellular calcium signaling mediated by point-source burst release of ATP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:9840–5.

Arenkiel BR, Peca J, Davison IG, Feliciano C, Deisseroth K, Augustine G, Ehlers MD, Feng G (2007) In Vivo Light-Induced Activation of Neural Circuitry in Transgenic Mice Expressing Channelrhodopsin-2. *Neuron* 54:205–218.

Armbruster BN, Li X, Pausch MH, Herlitze S, Roth BL (2007) Evolving the lock to fit the key to create a family of G protein-coupled receptors potently activated by an inert ligand. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104:5163–5168.

Armstrong CM, Hille B (1998) Voltage-gated ion channels and electrical excitability. *Neuron* 20:371–80.

Ascoli GA, Alonso-Nanclares L, Anderson SA, Barrionuevo G, Benavides-Piccione R, Burkhalter A, Buzsáki G, Cauli B, DeFelipe J, Fairén A, Feldmeyer D, Fishell G, Fregnac Y, Freund TF, Gardner D, Gardner EP, Goldberg JH, Helmstaedter M, Hestrin S, Karube F, Kisvárday ZF, Lambolez B, Lewis DA, Marin O, Markram H, Mũoz A, Packer A, Petersen CC, Rockland KS, Rossier J, Rudy B, Somogyi P, Staiger JF, Tamas G, Thomson AM, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, West DC, Yuste R (2008) Petilla terminology: Nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nature Reviews Neuroscience* 9:557–568.

Atallah BV, Scanziani M (2009) Instantaneous Modulation of Gamma Oscillation Frequency by Balancing Excitation with Inhibition. *Neuron* 62:566–577.

Atkin SD, Patel S, Kocharyan A, Holtzclaw LA, Weerth SH, Schram V, Pickel J, Russell JT (2009) Transgenic mice expressing a cameleon fluorescent Ca2+ indicator in astrocytes and Schwann cells allow study of glial cell Ca2+ signals in situ and in vivo. *Journal of Neuroscience Methods* 181:212–226.

Attwell D, Buchan AM, Charpak S, Lauritzen M, MacVicar BA, Newman EA (2010) Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature* 468:232–243.

Azevedo FA, Carvalho LR, Grinberg LT, Farfel JM, Ferretti RE, Leite RE, Filho WJ, Lent R, Herculano-Houzel S (2009) Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *The Journal of Comparative Neurology* 513:532–541.

Bang J, Kim HY, Lee H (2016) Optogenetic and Chemogenetic Approaches for Studying Astrocytes and Gliotransmitters. *Experimental neurobiology* 25:205–221.

Barres BA (2008) The Mystery and Magic of Glia: A Perspective on Their Roles in Health and Disease. *Neuron* 60:430–440.

Barthó P, Hirase H, Monconduit L, Zugaro M, Harris KD, Buzsáki G (2004) Characterization of Neocortical Principal Cells and Interneurons by Network Interactions and Extracellular Features. *Journal of Neurophysiology* 92:600–608.

Bazargani N, Attwell D (2016) Astrocyte calcium signaling: the third wave. *Nature Neuroscience* 19:182–189.

Bedwell SA, Billett EE, Crofts JJ, Tinsley CJ (2014) The topology of connections between rat prefrontal, motor and sensory cortices. *Frontiers in systems neuroscience* 8:177.

Bekar LK, He W, Nedergaard M (2008) Locus Coeruleus α-Adrenergic–Mediated Activation of Cortical Astrocytes In Vivo. *Cerebral Cortex* 18:2789–2795.

Beltramo R, Scanziani M (2019) A collicular visual cortex: Neocortical space for an ancient midbrain visual structure. *Science* 363:64–69.

Bender D, Holschbach M, Stöcklin G (1994) Synthesis of n.c.a. carbon-11 labelled clozapine and its major metabolite clozapine-N-oxide and comparison of their biodistribution in mice. *Nuclear medicine and biology* 21:921–5.

Bender F, Korotkova T, Ponomarenko A (2018) Optogenetic Entrainment of Hippocampal Theta Oscillations in Behaving Mice. *Journal of Visualized Experiments* p. e57349.

Bennett MVL, Contreras JE, Bukauskas FF, Sáez JC (2003) New roles for astrocytes: gap junction hemichannels have something to communicate. *Trends in neurosciences* 26:610–7.

Bennett MV, Garré JM, Orellana JA, Bukauskas FF, Nedergaard M, Giaume C, Sáez JC (2012) Connexin and pannexin hemichannels in inflammatory responses of glia and neurons. *Brain Research* 1487:3–15.

Beppu K, Sasaki T, Tanaka K, Yamanaka A, Fukazawa Y, Shigemoto R, Matsui K (2014) Optogenetic Countering of Glial Acidosis Suppresses Glial Glutamate Release and Ischemic Brain Damage. *Neuron* 81:314–320.

Bessman SP, Rossen J, Layne EC (1953) Gamma-Aminobutyric acid-glutamic acid transamination in brain. *The Journal of biological chemistry* 201:385–91.

Bezaire MJ, Soltesz I (2013) Quantitative assessment of CA1 local circuits: Knowledge base for interneuron-pyramidal cell connectivity. *Hippocampus* 23:751–785.

Bezzi P, Gundersen V, Galbete JL, Seifert G, Steinhäuser C, Pilati E, Volterra A (2004) Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. *Nature Neuroscience* 7:613–620.

Bicks LK, Koike H, Akbarian S, Morishita H (2015) Prefrontal Cortex and Social Cognition in Mouse and Man. *Frontiers in Psychology* 6:1805.

Bindocci E, Savtchouk I, Liaudet N, Becker D, Carriero G, Volterra A (2017) Three-dimensional Ca2+ imaging advances understanding of astrocyte biology. *Science (New York, N.Y.)* 356:eaai8185.

Bliss TVP, Lømo T (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of Physiology* 232:331–356.

Bliss T (1979) Synaptic plasticity in the hippocampus. *Trends in Neurosciences* 2:42–45.

Blomqvist A, Broman J (1988) Light and electron microscopic immunohistochemical demonstration of GABA-immunoreactive astrocytes in the brain stem of the rat. *Journal of neurocytology* 17:629–37.

Boddum K, Jensen TP, Magloire V, Kristiansen U, Rusakov DA, Pavlov I, Walker MC (2016) Astrocytic GABA transporter activity modulates excitatory neurotransmission. *Nature Communications* 7:13572.

Boisvert MM, Erikson GA, Shokhirev MN, Correspondence NJA (2018) The Aging Astrocyte Transcriptome from Multiple Regions of the Mouse Brain Data and Software Availability GSE99791. *Cell Reports* .

Bonder DE, McCarthy KD (2014) Astrocytic Gq-GPCR-Linked IP3R-Dependent Ca2+ Signaling Does Not Mediate Neurovascular Coupling in Mouse Visual Cortex In Vivo. *Journal of Neuroscience* 34:13139–13150.

Bosman C, Schoffelen JM, Brunet N, Oostenveld R, Bastos A, Womelsdorf T, Rubehn B, Stieglitz T, De Weerd P, Fries P (2012) Attentional Stimulus Selection through Selective Synchronization between Monkey Visual Areas. *Neuron* 75:875–888.

Boué-Grabot E, Pankratov Y (2017) Modulation of Central Synapses by Astrocyte-Released ATP and Postsynaptic P2X Receptors. *Neural Plasticity* 2017:1–11.

Bouzier-Sore AK, Pellerin L (2013) Unraveling the complex metabolic nature of astrocytes. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 7:179.

Bowery NG (1993) GABA _BReceptor Pharmacology. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 33:109–147.

Bowser DN, Khakh BS (2007) Two forms of single-vesicle astrocyte exocytosis imaged with total internal reflection fluorescence microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:4212–7.

Bradley SJ, Challiss RJ (2012) G protein-coupled receptor signalling in astrocytes in health and disease: A focus on metabotropic glutamate receptors. *Biochemical Pharmacology* 84:249–259.

Bragin A, Jandó G, Nádasdy Z, Hetke J, Wise K, Buzsáki G (1995) Gamma (40-100 Hz) oscillation in the hippocampus of the behaving rat. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 15:47–60.

Brancaccio M, Patton AP, Chesham JE, Maywood ES, Hastings MH (2017) Astrocytes Control Circadian Timekeeping in the Suprachiasmatic Nucleus via Glutamatergic Signaling. *Neuron* 93:1420–1435.

Brockett AT, Kane GA, Monari PK, Briones BA, Vigneron PA, Barber GA, Bermudez A, Dieffenbach U, Kloth AD, Buschman TJ, Gould E (2018) Evidence supporting a role for astrocytes in the regulation of cognitive flexibility and neuronal oscillations through the Ca2+ binding protein S100β. *PloS one* 13:e0195726.

Brown RG, Pluck G (2000) Negative symptoms: the 'pathology' of motivation and goal-directed behaviour. *Trends in neurosciences* 23:412–7.

Brown RE, Basheer R, McKenna JT, Strecker RE, McCarley RW (2012) Control of Sleep and Wakefulness. *Physiological Reviews* 92:1087–1187.

Buhl EH, Han ZS, Lorinczi Z, Stezhka VV, Karnup SV, Somogyi P (1994) Physiological properties of anatomically identified axo-axonic cells in the rat hippocampus. *Journal of Neurophysiology* 71:1289–1307.

Bull C, Freitas KCC, Zou S, Poland RS, Syed WA, Urban DJ, Minter SC, Shelton KL, Hauser KF, Negus SS, Knapp PE, Bowers MS (2014) Rat nucleus accumbens core astrocytes modulate reward and the motivation to self-administer ethanol after abstinence. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 39:2835–45.

Bullock TH, Bennett MVL, Johnston D, Josephson R, Marder E, Fields RD (2005) The Neuron Doctrine, Redux. *Science* 310:791–793.

Bushong EA, Martone ME, Jones YZ, Ellisman MH (2002) Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22:183–92.

Buzsaki G, Draguhn A (2004) Neuronal Oscillations in Cortical Networks. *Science* 304:1926–1929.

Buzsáki G (2002) Theta Oscillations in the Hippocampus. *Neuron* 33:325–340.

Buzsáki G (2009) *Rhythms of the Brain*.

Buzsáki G, Anastassiou CA, Koch C (2012) The origin of extracellular fields and currents — EEG, ECoG, LFP and spikes. *Nature Reviews Neuroscience* 13:407–420.

Buzsáki G, Lai-Wo S. L, Vanderwolf CH (1983) Cellular bases of hippocampal EEG in the behaving rat. *Brain Research Reviews* 6:139–171.

Buzsáki G, Moser EI (2013) Memory, navigation and theta rhythm in the hippocampal-entorhinal system. *Nature Neuroscience* 16:130–138.

Buzsáki G, Wang XJ (2012) Mechanisms of Gamma Oscillations. *Annual Review of Neuroscience* 35:203–225.

Canolty RT, Knight RT (2010) The functional role of cross-frequency coupling. *Trends in Cognitive Sciences* 14:506–515.

Cardin JA (2016) Snapshots of the Brain in Action: Local Circuit Operations through the Lens of γ Oscillations. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 36:10496–10504.

Cardin JA, Carlén M, Meletis K, Knoblich U, Zhang F, Deisseroth K, Tsai LH, Moore CI (2009) Driving fast-spiking cells induces gamma rhythm and controls sensory responses. *Nature* 459:663–667.

Carlén M, Meletis K, Siegle JH, Cardin JA, Futai K, Vierling-Claassen D, Rühlmann C, Jones SR, Deisseroth K, Sheng M, Moore CI, Tsai LH (2012) A critical role for NMDA receptors in parvalbumin interneurons for gamma rhythm induction and behavior. *Molecular Psychiatry* 17:537–548.

Carr M, Karlsson M, Frank L (2012) Transient Slow Gamma Synchrony Underlies Hippocampal Memory Replay. *Neuron* 75:700–713.

Carter ME, de Lecea L (2011) Optogenetic investigation of neural circuits in vivo. *Trends in Molecular Medicine* 17:197–206.

Carus-Cadavieco M, Gorbati M, Ye L, Bender F, van der Veldt S, Kosse C, Börgers C, Lee SY, Ramakrishnan C, Hu Y, Denisova N, Ramm F, Volitaki E, Burdakov D, Deisseroth K, Ponomarenko A, Korotkova T (2017) Gamma oscillations organize top-down signalling to hypothalamus and enable food seeking. *Nature* 542:232–236.

Chai H, Diaz-Castro B, Shigetomi E, Monte E, Octeau JC, Yu X, Cohn W, Rajendran PS, Vondriska TM, Whitelegge JP, Coppola G, Khakh BS (2017) Neural Circuit-Specialized Astrocytes: Transcriptomic, Proteomic, Morphological, and Functional Evidence. *Neuron* 95:531–549.

Chalifoux JR, Carter AG (2011) GABAB Receptor Modulation of Voltage-Sensitive Calcium Channels in Spines and Dendrites. *Journal of Neuroscience* 31:4221–4232.

Charles AC, Merrill JE, Dirksen ER, Sanderson MJ (1991) Intercellular signaling in glial cells: calcium waves and oscillations in response to mechanical stimulation and glutamate. *Neuron* 6:983–92.

Charles AC, Naus CC, Zhu D, Kidder GM, Dirksen ER, Sanderson MJ (1992) Intercellular calcium signaling via gap junctions in glioma cells. *The Journal of cell biology* 118:195–201.

Chen J, Tan Z, Zeng L, Zhang X, He Y, Gao W, Wu X, Li Y, Bu B, Wang W, Duan S (2013) Heterosynaptic long-term depression mediated by ATP released from astrocytes. *Glia* 61:178–191.

Chen N, Sugihara H, Sharma J, Perea G, Petravicz J, Le C, Sur M (2012) Nucleus basalis-enabled stimulus-specific plasticity in the visual cortex is mediated by astrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109:E2832–E2841.

Chen Y, Liu X, Li S, Wan H (2018) Decoding Pigeon Behavior Outcomes Using Functional Connections among Local Field Potentials. *Computational Intelligence and Neuroscience* 2018:1–13.

Cho K, Hoch R, Lee A, Patel T, Rubenstein J, Sohal V (2015) Gamma Rhythms Link Prefrontal Interneuron Dysfunction with Cognitive Inflexibility in Dlx5/6+/- Mice. *Neuron* 85:1332–1343.

Cho WH, Barcelon E, Lee SJ (2016) Optogenetic Glia Manipulation: Possibilities and Future Prospects. *Experimental neurobiology* 25:197–204.

Chung WS, Allen NJ, Eroglu C (2015) Astrocytes Control Synapse Formation, Function, and Elimination. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 7:a020370.

Churchwell JC, Lopez-Larson M, Yurgelun-Todd DA (2010) Altered frontal cortical volume and decision making in adolescent cannabis users. *Frontiers in psychology* 1:225.

Citri A, Malenka RC (2008) Synaptic Plasticity: Multiple Forms, Functions, and Mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 33:18–41.

Clapham DE (2007) Calcium signaling. *Cell* 131:1047–58.

Clements JD (1990) A statistical test for demonstrating a presynaptic site of action for a modulator of synaptic amplitude. *Journal of neuroscience methods* 31:75–88.

Cohen EAK (2014) Multi-wavelet coherence for point processes on the real line In *2014 IEEE International Conference on Acoustics, Speech and Signal Processing (ICASSP)*, pp. 2649–2653. IEEE.

Cohen MX, Axmacher N, Lenartz D, Elger CE, Sturm V, Schlaepfer TE (2009) Good Vibrations: Cross-frequency Coupling in the Human Nucleus Accumbens during Reward Processing. *Journal of Cognitive Neuroscience* 21:875–889.

Colgin LL, Denninger T, Fyhn M, Hafting T, Bonnevie T, Jensen O, Moser MB, Moser EI (2009) Frequency of gamma oscillations routes flow of information in the hippocampus. *Nature* 462:353–357.

Contreras D, Steriade M (1995) Cellular basis of EEG slow rhythms: a study of dynamic corticothalamic relationships. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 15:604–22.

Cornell-Bell AH, Finkbeiner SM, Cooper MS, Smith SJ (1990) Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science (New York, N.Y.)* 247:470–3.

Cossell L, Iacaruso MF, Muir DR, Houlton R, Sader EN, Ko H, Hofer SB, Mrsic-Flogel TD (2015) Functional organization of excitatory synaptic strength in primary visual cortex. *Nature* 518:399–403.

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

Covelo A, Araque A (2016) Lateral regulation of synaptic transmission by astrocytes. *Neuroscience* 323:62–66.

Covelo A, Araque A (2018) Neuronal activity determines distinct gliotransmitter release from a single astrocyte. *eLife* 7.

Craik KJW (1947) THEORY OF THE HUMAN OPERATOR IN CONTROL SYSTEMS1. *British Journal of Psychology. General Section* 38:56–61.

Csicsvari J, Jamieson B, Wise KD, Buzsáki G (2003) Mechanisms of gamma oscillations in the hippocampus of the behaving rat. *Neuron* 37.

da Cunha Franceschi R, Nardin P, Machado CV, Tortorelli LS, Martinez-Pereira MA, Zanotto C, Gonçalves CA, Zancan DM (2017) Enteric glial reactivity to systemic LPS administration: Changes in GFAP and S100B protein. *Neuroscience Research* 119:15–23.

Dallérac G, Rouach N (2016) Astrocytes as new targets to improve cognitive functions. *Progress in Neurobiology* 144:48–67.

Dallérac G, Zapata J, Rouach N (2018) Versatile control of synaptic circuits by astrocytes: where, when and how? *Nature Reviews Neuroscience* 19:729–743.

D'Ascenzo M, Fellin T, Terunuma M, Revilla-Sanchez R, Meaney DF, Auberson YP, Moss SJ, Haydon PG (2007) mGluR5 stimulates gliotransmission in the nucleus accumbens. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104:1995–2000.

Deemyad T, Lüthi J, Spruston N (2018) Astrocytes integrate and drive action potential firing in inhibitory subnetworks. *Nature Communications* 9:4336.

DeFelipe J *Cajal's neuronal forest : science and art.*

DeFelipe J, López-Cruz PL, Benavides-Piccione R, Bielza C, Larrañaga P, Anderson S, Burkhalter A, Cauli B, Fairén A, Feldmeyer D, Fishell G, Fitzpatrick D, Freund TF, González-Burgos G, Hestrin S, Hill S, Hof PR, Huang J, Jones EG, Kawaguchi Y, Kisvárday Z, Kubota Y, Lewis DA, Marín O, Markram H, McBain CJ, Meyer HS, Monyer H, Nelson SB, Rockland K, Rossier J, Rubenstein JLR, Rudy B, Scanziani M, Shepherd GM, Sherwood CC, Staiger JF, Tamás G, Thomson A, Wang Y, Yuste R, Ascoli GA (2013) New insights into the classification and nomenclature of cortical GABAergic interneurons. *Nature Reviews Neuroscience* 14:202–216.

Deisseroth K (2010) Optogenetics - Method of the Year. *Nature methods* pp. 1–4.

Deisseroth K (2015) Optogenetics: 10 years of microbial opsins in neuroscience. *Nature Neuroscience* 18:1213–1225.

Deisseroth K, Hegemann P (2017) The form and function of channelrhodopsin. *Science* 357:eaan5544.

D'Esposito M, Postle BR (2015) The Cognitive Neuroscience of Working Memory. *Annual Review of Psychology* 66:115–142.

Destexhe A, Sejnowski TJ (2003) Interactions Between Membrane Conductances Underlying Thalamocortical Slow-Wave Oscillations. *Physiological Reviews* 83:1401–1453.

Devaraju St Jude P, Sun MY, Fiacco TA (2013) Astrocytic group I mGluR-dependent potentiation of astrocytic glutamate and potassium uptake. *Article in Journal of Neurophysiology* .

Di Castro MA, Chuquet J, Liaudet N, Bhaukaurally K, Santello M, Bouvier D, Tiret P, Volterra A (2011) Local Ca2+ detection and modulation of synaptic release by astrocytes. *Nature Neuroscience* 14:1276–1284.

Dichter MA, Ayala GF (1987) Cellular mechanisms of epilepsy: a status report. *Science (New York, N.Y.)* 237:157–64.

Dima AA, Elliott JT, Filliben JJ, Halter M, Peskin A, Bernal J, Kociolek M, Brady MC, Tang HC, Plant AL (2011) Comparison of segmentation algorithms for fluorescence microscopy images of cells. *Cytometry Part A* 79A:545–559.

Dix SL, Aggleton JP (1999) Extending the spontaneous preference test of recognition: evidence of object-location and object-context recognition. *Behavioural brain research* 99:191–200.

Do MTH, Kang SH, Xue T, Zhong H, Liao HW, Bergles DE, Yau KW (2009) Photon capture and signalling by melanopsin retinal ganglion cells. *Nature* 457:281–287.

Doengi M, Hirnet D, Coulon P, Pape HC, Deitmer JW, Lohr C (2009) GABA uptake-dependent Ca(2+) signaling in developing olfactory bulb astrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:17570–5.

Dosher BA, Jeter P, Liu J, Lu ZL (2013) An integrated reweighting theory of perceptual learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110:13678–13683.

Duan S, Anderson CM, Keung EC, Chen Y, Chen Y, Swanson RA (2003) P2X7 receptor-mediated release of excitatory amino acids from astrocytes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23:1320–8.

Dupret D, O'Neill J, Pleydell-Bouverie B, Csicsvari J (2010) The reorganization and reactivation of hippocampal maps predict spatial memory performance. *Nature Neuroscience* 13:995–1002.

Durkee CA, Covelo A, Lines J, Kofuji P, Aguilar J, Araque A (2019) G _{i/o}protein-coupled receptors inhibit neurons but activate astrocytes and stimulate gliotransmission. *Glia* 67:1076–1093.

Egawa K, Fukuda A (2013) Pathophysiological power of improper tonic GABA(A) conductances in mature and immature models. *Frontiers in neural circuits* 7:170.

Eriksen J, Chang R, McGregor M, Silm K, Suzuki T, Edwards R (2016) Protons Regulate Vesicular Glutamate Transporters through an Allosteric Mechanism. *Neuron* 90:768–780.

Ernst M, Fudge JL (2009) A developmental neurobiological model of motivated behavior: Anatomy, connectivity and ontogeny of the triadic nodes. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 33:367–382.

Ernst M, Nelson EE, McClure EB, Monk CS, Munson S, Eshel N, Zarahn E, Leibenluft E, Zametkin A, Towbin K, Blair J, Charney D, Pine DS (2004) Choice selection and reward anticipation: an fMRI study. *Neuropsychologia* 42:1585–1597.

Ernst M, Paulus MP (2005) Neurobiology of decision making: A selective review from a neurocognitive and clinical perspective. *Biological Psychiatry* 58:597–604.

Ernst OP, Lodowski DT, Elstner M, Hegemann P, Brown LS, Kandori H (2014) Microbial and Animal Rhodopsins: Structures, Functions, and Molecular Mechanisms. *Chemical Reviews* 114:126–163.

Eroglu C, Barres BA (2010) Regulation of synaptic connectivity by glia. *Nature* 468:223–31.

Evanko DS, Zhang Q, Zorec R, Haydon PG (2004) Defining pathways of loss and secretion of chemical messengers from astrocytes. *Glia* 47:233–240.

Faber DS, Kornt H Applicability of the coefficient of variation method for analyzing synaptic plasticity Technical report.

Fellin T, Pascual O, Gobbo S, Pozzan T, Haydon PG, Carmignoto G (2004) Neuronal Synchrony Mediated by Astrocytic Glutamate through Activation of Extrasynaptic NMDA Receptors. *Neuron* 43:729–743.

Fellows LK (2004) The Cognitive Neuroscience of Human Decision Making: A Review and Conceptual Framework. *Behavioral and Cognitive Neuroscience Reviews* 3:159–172.

Fernández de Sevilla D, Cabezas C, de Prada ANO, Sánchez-Jiménez A, Buño W (2002) Selective muscarinic regulation of functional glutamatergic Schaffer collateral synapses in rat CA1 pyramidal neurons. *The Journal of physiology* 545:51–63.

Ferris HA, Perry RJ, Moreira GV, Shulman GI, Horton JD, Kahn CR (2017) Loss of astrocyte cholesterol synthesis disrupts neuronal function and alters whole-body metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114:1189–1194.

Fiacco TA, McCarthy KD (2004) Intracellular Astrocyte Calcium Waves In Situ Increase the Frequency of Spontaneous AMPA Receptor Currents in CA1 Pyramidal Neurons. *Journal of Neuroscience* 24:722–732.

Fiacco TA, McCarthy KD (2018) Multiple Lines of Evidence Indicate That Gliotransmission Does Not Occur under Physiological Conditions. *The Journal of Neuroscience* 38:3–13.

Fields RD, Araque A, Johansen-Berg H, Lim SS, Lynch G, Nave KA, Nedergaard M, Perez R, Sejnowski T, Wake H (2014) Glial biology in learning and cognition. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 20:426–31.

Fields RD, Stevens-Graham B (2002) New insights into neuron-glia communication. *Science (New York, N.Y.)* 298:556–62.

Figueiredo M, Lane S, Stout RF, Liu B, Parpura V, Teschemacher AG, Kasparov S, Kasparov S (2014) Comparative analysis of optogenetic actuators in cultured astrocytes. *Cell calcium* 56:208–14.

Fine I, Jacobs RA (2002) Comparing perceptual learning across tasks: A review. *Journal of Vision* 2:5–5.

Fitoussi A, Renault P, Le Moine C, Coutureau E, Cador M, Dellu-Hagedorn F (2018) Inter-individual differences in decision-making, flexible and goal-directed behaviors: novel insights within the prefronto-striatal networks. *Brain Structure and Function* 223:897–912.

Florian C, Vecsey CG, Halassa MM, Haydon PG, Abel T (2011) Astrocyte-Derived Adenosine and A1 Receptor Activity Contribute to Sleep Loss-Induced Deficits in Hippocampal Synaptic Plasticity and Memory in Mice. *Journal of Neuroscience* 31:6956–6962.

Freeman M, Rowitch D (2013) Evolving Concepts of Gliogenesis: A Look Way Back and Ahead to the Next 25 Years. *Neuron* 80:613–623.

Freund T, Buzsáki G (1998) Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6:347–470.

Fries P (2015) Rhythms for Cognition: Communication through Coherence. *Neuron* 88:220–35.

Fries P, Nikolić D, Singer W (2007) The gamma cycle. *Trends in Neurosciences* 30:309–316.

Fuente-Martin E, Garcia-Caceres C, Morselli E, Clegg DJ, Chowen JA, Finan B, Brinton RD, Tschöp MH (2013) Estrogen, astrocytes and the neuroendocrine control of metabolism. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* 14:331–338.

Fujisawa S, Amarasingham A, Harrison MT, Buzsáki G (2008) Behavior-dependent short-term assembly dynamics in the medial prefrontal cortex. *Nature neuroscience* 11:823–33.

Gaffan D, Parker A (1996) Interaction of perirhinal cortex with the fornix-fimbria: memory for objects and "object-in-place" memory. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16:5864–9.

Gajardo-Gómez R, Labra VC, Maturana CJ, Shoji KF, Santibañez CA, Sáez JC, Giaume C, Orellana JA (2017) Cannabinoids prevent the amyloid β-induced activation of astroglial hemichannels: A neuroprotective mechanism. *Glia* 65:122–137.

Gao R, Peterson EJ, Voytek B (2017) Inferring synaptic excitation/inhibition balance from field potentials. *NeuroImage* 158:70–78.

García-Cáceres C, Quarta C, Varela L, Gö Tz M, Horvath TL, Tschö MH, García-Cá Ceres C, Gao Y, Gruber T, Legutko B, Jastroch M, Johansson P, Ninkovic J, Yi CX, Le Thuc O, Szigeti-Buck K, Cai W, Meyer CW, Pfluger PT, Fernandez AM, Luquet S, Woods SC, Torres-Alemá I, Kahn CR, Gö M (2016) Astrocytic Insulin Signaling Couples Brain Glucose Uptake with Nutrient Availability Article Astrocytic Insulin Signaling Couples Brain Glucose Uptake with Nutrient Availability. *Cell* 166:867–880.

Gazzaniga MS, Ivry RB, Mangun GRGR *Cognitive neuroscience : the biology of the mind.*

Geisler JC, Corbin KL, Li Q, Feranchak AP, Nunemaker CS, Li C (2013) Vesicular Nucleotide Transporter-Mediated ATP Release Regulates Insulin Secretion. *Endocrinology* 154:675–684.

Geschwind DH, Konopka G (2009) Neuroscience in the era of functional genomics and systems biology. *Nature* 461:908–15.

Giaume C, McCarthy KD (1996) Control of gap-junctional communication in astrocytic networks. *Trends in neurosciences* 19:319–25.

Giaume C, Koulakoff A, Roux L, Holcman D, Rouach N (2010) Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions. *Nature Reviews Neuroscience* 11:87–99.

Gilbert CD, Sigman M, Crist RE (2001) The neural basis of perceptual learning. *Neuron* 31:681–97.

Gloveli T, Dugladze T, Saha S, Monyer H, Heinemann U, Traub RD, Whittington MA, Buhl EH (2005) Differential involvement of oriens/pyramidale interneurones in hippocampal network oscillations in vitro. *The Journal of Physiology* 562:131.

Goh GY, Huang H, Ullman J, Borre L, Hnasko TS, Trussell LO, Edwards RH (2011) Presynaptic regulation of quantal size: K+/H+ exchange stimulates vesicular glutamate transport. *Nature Neuroscience* 14:1285–1292.

Gold JI, Shadlen MN (2007) The Neural Basis of Decision Making. *Annual Review of Neuroscience* 30:535–574.

Goldstein SAN, Bockenhauer D, O'Kelly I, Zilberberg N (2001) Potassium leak channels and the KCNK family of two-p-domain subunits. *Nature Reviews Neuroscience* 2:175–184.

Gómez-Gonzalo M, Navarrete M, Perea G, Covelo A, Martín-Fernández M, Shigemoto R, Luján R, Araque A (2015) Endocannabinoids Induce Lateral Long-Term Potentiation of Transmitter Release by Stimulation of Gliotransmission. *Cerebral Cortex* 25:3699–3712.

Gómez-Gonzalo M, Zehnder T, Requie LM, Bezzi P, Carmignoto G (2018) Insights into the release mechanism of astrocytic glutamate evoking in neurons NMDA receptor-mediated slow depolarizing inward currents. *Glia* 66:2188–2199.

Gourine AV, Kasymov V, Marina N, Tang F, Figueiredo MF, Lane S, Teschemacher AG, Spyer KM, Deisseroth K, Kasparov S (2010) Astrocytes Control Breathing Through pH-Dependent Release of ATP. *Science* 329:571–575.

Gradinaru V, Mogri M, Thompson KR, Henderson JM, Deisseroth K (2009) Optical deconstruction of parkinsonian neural circuitry. *Science (New York, N.Y.)* 324:354–9.

Granger AJ, Nicoll RA (2013) Expression mechanisms underlying long-term potentiation: a postsynaptic view, 10 years on. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 369:20130136–20130136.

Gray CM, Singer W (1989) Stimulus-specific neuronal oscillations in orientation columns of cat visual cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86:1698–1702.

Gregoriou GG, Rossi AF, Ungerleider LG, Desimone R (2014) Lesions of prefrontal cortex reduce attentional modulation of neuronal responses and synchrony in V4. *Nature Neuroscience* 17:1003–1011.

Griffiths KR, Morris RW, Balleine BW (2014) Translational studies of goal-directed action as a framework for classifying deficits across psychiatric disorders. *Frontiers in Systems Neuroscience* 8:101.

Grosche J, Matyash V, Möller T, Verkhratsky A, Reichenbach A, Kettenmann H (1999) Microdomains for neuron–glia interaction: parallel fiber signaling to Bergmann glial cells. *Nature Neuroscience* 2:139–143.

Guettier JM, Gautam D, Scarselli M, Ruiz de Azua I, Li JH, Rosemond E, Ma X, Gonzalez FJ, Armbruster BN, Lu H, Roth BL, Wess J (2009) A chemical-genetic approach to study G protein regulation of beta cell function in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:19197–202.

Haider B, Duque A, Hasenstaub AR, McCormick DA (2006) Neocortical Network Activity In Vivo Is Generated through a Dynamic Balance of Excitation and Inhibition. *Journal of Neuroscience* 26:4535–4545.

Haider B, Krause MR, Duque A, Yu Y, Touryan J, Mazer JA, McCormick DA (2010) Synaptic and Network Mechanisms of Sparse and Reliable Visual Cortical Activity during Nonclassical Receptive Field Stimulation. *Neuron* 65:107–121.

Halassa MM, Fellin T, Haydon PG (2007) The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends in Molecular Medicine* 13:54–63.

Halasy K, Somogyi P (1993) Subdivisions in the multiple GABAergic innervation of granule cells in the dentate gyrus of the rat hippocampus. *The European journal of neuroscience* 5:411–29.

Haller C, Casanova E, Müller M, Vacher CM, Vigot R, Doll T, Barbieri S, Gassmann M, Bettler B (2004) Floxed allele for conditional inactivation of the GABA _{B(1)}gene. *genesis* 40:125–130.

Halnes G, Østby I, Pettersen KH, Omholt SW, Einevoll GT (2013) Electrodiffusive Model for Astrocytic and Neuronal Ion Concentration Dynamics. *PLoS Computational Biology* 9:e1003386.

Hamilton NB, Attwell D (2010) Do astrocytes really exocytose neurotransmitters? *Nature Reviews Neuroscience* 11:227–238.

Harris KD, Henze DA, Csicsvari J, Hirase H, Buzsáki G (2000) Accuracy of Tetrode Spike Separation as Determined by Simultaneous Intracellular and Extracellular Measurements. *Journal of Neurophysiology* 84:401–414.

Harris KD, Shepherd GMG (2015) The neocortical circuit: themes and variations. *Nature Neuroscience* 18:170–181.

Harz H, Hegemann P (1991) Rhodopsin-regulated calcium currents in Chlamydomonas. *Nature* 351:489–491.

Hasenstaub A, Shu Y, Haider B, Kraushaar U, Duque A, McCormick DA (2005) Inhibitory Postsynaptic Potentials Carry Synchronized Frequency Information in Active Cortical Networks. *Neuron* 47:423–435.

Hatori M, Panda S (2010) The emerging roles of melanopsin in behavioral adaptation to light. *Trends in Molecular Medicine* 16:435–446.

Hattar S, Liao HW, Takao M, Berson DM, Yau KW (2002) Melanopsin-Containing Retinal Ganglion Cells: Architecture, Projections, and Intrinsic Photosensitivity. *Science* 295:1065–1070.

Hatten ME, Mason CA (1990) Mechanisms of glial-guided neuronal migration in vitro and in vivo. *Experientia* 46:907–16.

Haustein M, Kracun S, Lu XH, Shih T, Jackson-Weaver O, Tong X, Xu J, Yang X, O'Dell T, Marvin J, Ellisman M, Bushong E, Looger L, Khakh B (2014) Conditions and Constraints for Astrocyte Calcium Signaling in the Hippocampal Mossy Fiber Pathway. *Neuron* 82:413–429.

Haydon PG, Carmignoto G (2006) Astrocyte Control of Synaptic Transmission and Neurovascular Coupling. *Physiological Reviews* 86:1009–1031.

Hazan L, Zugaro M, Buzsáki G (2006) Klusters, NeuroScope, NDManager: A free software suite for neurophysiological data processing and visualization. *Journal of Neuroscience Methods* 155:207–216.

Hebb D (1950) Organization of behavior. *Journal of Clinical Psychology* 6:307–307.

Hegemann P, Oesterbelt D, Steiner M (1985) The photocycle of the chloride pump halorhodopsin. I: Azide-catalyzed deprotonation of the chromophore is a side reaction of photocycle intermediates inactivating the pump. *The EMBO journal* 4:2347–50.

Henneberger C, Papouin T, Oliet SHR, Rusakov DA (2010) Long-term potentiation depends on release of d-serine from astrocytes. *Nature* 463:232–236.

Herculano-Houzel S (2014) The glia/neuron ratio: How it varies uniformly across brain structures and species and what that means for brain physiology and evolution. *Glia* 62:1377–1391.

Hertz L (2013) The Glutamate–Glutamine (GABA) Cycle: Importance of Late Postnatal Development and Potential Reciprocal Interactions between Biosynthesis and Degradation. *Frontiers in Endocrinology* 4:59.

Hines PJ (2017) Astrocytes regulating synaptogenesis. *Science* 358:6–760.

Holtzclaw LA, Pandhit S, Bare DJ, Mignery GA, Russell JT (2002) Astrocytes in adult rat brain express type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Glia* 39:69–84.

Houades V, Koulakoff A, Ezan P, Seif I, Giaume C (2008) Gap Junction-Mediated Astrocytic Networks in the Mouse Barrel Cortex. *Journal of Neuroscience* 28:5207–5217.

Hu H, Gan J, Jonas P (2014) Fast-spiking, parvalbumin+ GABAergic interneurons: From cellular design to microcircuit function. *Science* 345:1255263–1255263.

Hua X, Malarkey EB, Sunjara V, Rosenwald SE, Li Wh, Parpura V (2004) Ca2+-dependent glutamate release involves two classes of endoplasmic reticulum Ca2+ stores in astrocytes. *Journal of Neuroscience Research* 76:86–97.

Hubbard JA, Binder DK *Astrocytes and epilepsy.*

Hubel DH, Wiesel TN (1962) Receptive fields, binocular interaction and functional architecture in the cat's visual cortex. *The Journal of physiology* 160:106–54.

Hutcheon B, Yarom Y (2000) Resonance, oscillation and the intrinsic frequency preferences of neurons. *Trends in Neurosciences* 23.

Hyman JM, Ma L, Balaguer-Ballester E, Durstewitz D, Seamans JK (2012) Contextual encoding by ensembles of medial prefrontal cortex neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109:5086–5091.

Isaacson JS, Solís JM, Nicoll RA (1993) Local and diffuse synaptic actions of GABA in the hippocampus. *Neuron* 10:165–75.

Isaacson J, Scanziani M (2011) How Inhibition Shapes Cortical Activity. *Neuron* 72:231–243.

Isomura Y, Harukuni R, Takekawa T, Aizawa H, Fukai T (2009) Microcircuitry coordination of cortical motor information in self-initiation of voluntary movements. *Nature Neuroscience* 12:1586–1593.

Jahn R, Lang T, Südhof TC (2003) Membrane fusion. *Cell* 112:519–33.

Jain AK, Dubes RC (1988) *Algorithms for clustering data* Prentice Hall.

Jäkel S, Dimou L (2017) Glial Cells and Their Function in the Adult Brain: A Journey through the History of Their Ablation. *Frontiers in cellular neuroscience* 11:24.

Jarrard LE (1993) On the role of the hippocampus in learning and memory in the rat. *Behavioral and neural biology* 60:9–26.

Jennings A, Tyurikova O, Bard L, Zheng K, Semyanov A, Henneberger C, Rusakov DA (2017) Dopamine elevates and lowers astroglial Ca2+ through distinct pathways depending on local synaptic circuitry. *Glia* 65:447–459.

Jensen O, Kaiser J, Lachaux JP (2007) Human gamma-frequency oscillations associated with attention and memory. *Trends in Neurosciences* 30:317–324.

Jiang X, Wang G, Lee AJ, Stornetta RL, Zhu JJ (2013) The organization of two new cortical interneuronal circuits. *Nature Neuroscience* 16:210–218.

Jiménez-González C, Pirttimaki T, Cope DW, Parri HR (2011) Non-neuronal, slow GABA signalling in the ventrobasal thalamus targets δ-subunit-containing GABA(A) receptors. *The European journal of neuroscience* 33:1471–82.

Johnson KO (2000) Neural Coding. *Neuron* 26:563–566.

Johnston D, Williams S, Jaffe D, Gray R (1992) NMDA-Receptor-Independent Long-Term Potentiation. *Annual Review of Physiology* 54:489–505.

Jourdain P, Bergersen LH, Bhaukaurally K, Bezzi P, Santello M, Domercq M, Matute C, Tonello F, Gundersen V, Volterra A (2007) Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength. *Nature Neuroscience* 10:331–339.

Jun JJ, Steinmetz NA, Siegle JH, Denman DJ, Bauza M, Barbarits B, Lee AK, Anastassiou CA, Andrei A, Aydın Barbic M, Blanche TJ, Bonin V, Couto J, Dutta B, Gratiy SL, Gutnisky DA, Häusser M, Karsh B, Ledochowitsch P, Lopez CM, Mitelut C, Musa S, Okun M, Pachitariu M, Putzeys J, Rich PD, Rossant C, Sun Wl, Svoboda K, Carandini M, Harris KD, Koch C, O'Keefe J, Harris TD (2017) Fully integrated silicon probes for high-density recording of neural activity. *Nature* 551:232–236.

Kaas JH (2011) Neocortex in early mammals and its subsequent variations. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1225:28–36.

Kahana MJ, Seelig D, Madsen JR (2001) Theta returns. *Current opinion in neurobiology* 11:739–44.

Kandel ER (2001) The Molecular Biology of Memory Storage: A Dialogue Between Genes and Synapses. *Science* 294:1030–1038.

Kandel ER, Spencer WA (1961) ELECTROPHYSIOLOGY OF HIPPOCAMPAL NEURONS: II. AFTER-POTENTIALS AND REPETITIVE FIRING. *Journal of Neurophysiology* 24:243–259.

Kandel ER, Spencer WA, Brinley FJ (1960) Transient and long-lasting electrical responses to direct hippocampal stimulation. *American Journal of Physiology-Legacy Content* 198:687–692.

Kang J, Jiang L, Goldman SA, Nedergaard M (1998) Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nature Neuroscience* 1:683–692.

Kano M (2014) Control of synaptic function by endocannabinoid-mediated retrograde signaling. *Proceedings of the Japan Academy, Series B* 90:235–250.

Kano M, Ohno-Shosaku T, Hashimotodani Y, Uchigashima M, Watanabe M (2009) Endocannabinoid-Mediated Control of Synaptic Transmission. *Physiological Reviews* 89:309–380.

Karpuk N, Burkovetskaya M, Fritz T, Angle A, Kielian T (2011) Neuroinflammation leads to region-dependent alterations in astrocyte gap junction communication and hemichannel activity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31:414–25.

Kastanenka KV, Moreno-Bote R, De Pittà M, Perea G, Eraso-Pichot A, Masgrau R, Poskanzer KE, Galea E (2019) A roadmap to integrate astrocytes into Systems Neuroscience. *Glia* p. glia.23632.

Katz B (1969) *The release of neural transmitter substances* Thomas, Springfield Ill.

Kawaguchi Y (1997) GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cerebral Cortex* 7:476–486.

Kawamoto EM, Vivar C, Camandola S (2012) Physiology and pathology of calcium signaling in the brain. *Frontiers in pharmacology* 3:61.

Keenan WT, Fernandez DC, Shumway LJ, Zhao H, Hattar S (2017) Eye-Drops for Activation of DREADDs. *Frontiers in neural circuits* 11:93.

Kepecs A, Fishell G (2014) Interneuron cell types are fit to function. *Nature* 505:318–326.

Khakh BS, Sofroniew MV (2015) Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits. *Nature Neuroscience* 18:942–952.

Kim H, Ährlund-Richter S, Wang X, Deisseroth K, Carlén M (2016) Prefrontal Parvalbumin Neurons in Control of Attention. *Cell* 164:208–218.

Kim JG, Suyama S, Koch M, Jin S, Argente-Arizon P, Argente J, Liu ZW, Zimmer MR, Jeong JK, Szigeti-Buck K, Gao Y, Garcia-Caceres C, Yi CX, Salmaso N, Vaccarino FM, Chowen J, Diano S, Dietrich MO, Tschöp MH, Horvath TL (2014) Leptin signaling in astrocytes regulates hypothalamic neuronal circuits and feeding. *Nature Neuroscience* 17:908–910.

Knoche A, Yokoyama H, Ponomarenko A, Frisch C, Huston J, Haas H (2003) High-frequency oscillation in the hippocampus of the behaving rat and its modulation by the histaminergic system. *Hippocampus* 13:273–280.

Ko H, Hofer SB, Pichler B, Buchanan KA, Sjöström PJ, Mrsic-Flogel TD (2011) Functional specificity of local synaptic connections in neocortical networks. *Nature* 473:87–91.

Ko J (2017) Neuroanatomical Substrates of Rodent Social Behavior: The Medial Prefrontal Cortex and Its Projection Patterns. *Frontiers in Neural Circuits* 11:41.

Korotkova T, Fuchs EC, Ponomarenko A, von Engelhardt J, Monyer H (2010) NMDA Receptor Ablation on Parvalbumin-Positive Interneurons Impairs Hippocampal Synchrony, Spatial Representations, and Working Memory. *Neuron* 68:557–569.

Kosaka T, Hama K (1986) Three-dimensional structure of astrocytes in the rat dentate gyrus. *The Journal of Comparative Neurology* 249:242–260.

Kosaka T, Katsumaru H, Hama K, Wu JY, Heizmann CW (1987) GABAergic neurons containing the Ca2+-binding protein parvalbumin in the rat hippocampus and dentate gyrus. *Brain Research* 419:119–130.

Kovács A, Pál B (2017) Astrocyte-Dependent Slow Inward Currents (SICs) Participate in Neuromodulatory Mechanisms in the Pedunculopontine Nucleus (PPN). *Frontiers in Cellular Neuroscience* 11.

Krubitzer L (1995) The organization of neocortex in mammals: are species differences really so different? *Trends in Neurosciences* 18:408–417.

Kumar P, Foufoula-Georgiou E (1997) Wavelet analysis for geophysical applications. *Reviews of Geophysics* 35:385–412.

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

Lalo U, Palygin O, Verkhratsky A, Grant SGN, Pankratov Y (2016) ATP from synaptic terminals and astrocytes regulates NMDA receptors and synaptic plasticity through PSD-95 multi-protein complex. *Scientific Reports* 6:33609.

Lalo U, Palygin O, Rasooli-Nejad S, Andrew J, Haydon PG, Pankratov Y (2014) Exocytosis of ATP From Astrocytes Modulates Phasic and Tonic Inhibition in the Neocortex. *PLoS Biology* 12:e1001747.

Lasztóczi B, Klausberger T (2016) Hippocampal Place Cells Couple to Three Different Gamma Oscillations during Place Field Traversal. *Neuron* 91:34–40.

Laurent G (2002) Olfactory network dynamics and the coding of multidimensional signals. *Nature Reviews Neuroscience* 3:884–895.

Lee D, Seo H, Jung MW (2012) Neural Basis of Reinforcement Learning and Decision Making. *Annual Review of Neuroscience* 35:287–308.

Lee E, Rhim I, Lee JW, Ghim JW, Lee S, Kim E, Jung MW (2016) Enhanced Neuronal Activity in the Medial Prefrontal Cortex during Social Approach Behavior. *Journal of Neuroscience* 36:6926–6936.

Lee HS, Ghetti A, Pinto-Duarte A, Wang X, Dziewczapolski G, Galimi F, Huitron-Resendiz S, Pina-Crespo JC, Roberts AJ, Verma IM, Sejnowski TJ, Heinemann SF (2014) Astrocytes contribute to gamma oscillations and recognition memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111:E3343–E3352.

Lee S, Yoon BE, Berglund K, Oh SJ, Park H, Shin HS, Augustine GJ, Lee CJ (2010) Channel-Mediated Tonic GABA Release from Glia. *Science* 330:790–796.

Letellier M, Park YK, Chater TE, Chipman PH, Gautam SG, Oshima-Takago T, Goda Y (2016) Astrocytes regulate heterogeneity of presynaptic strengths in hippocampal networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113:E2685–E2694.

Lewis DA, Curley AA, Glausier JR, Volk DW (2012) Cortical parvalbumin interneurons and cognitive dysfunction in schizophrenia. *Trends in Neurosciences* 35:57–67.

Li D, Agulhon C, Schmidt E, Oheim M, Ropert N (2013) New tools for investigating astrocyte-to-neuron communication. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 7:193.

Li RW, Levi DM, Klein SA (2004) Perceptual learning improves efficiency by re-tuning the decision 'template' for position discrimination. *Nature Neuroscience* 7:178–183.

Li X, Gutierrez DV, Hanson MG, Han J, Mark MD, Chiel H, Hegemann P, Landmesser LT, Herlitze S (2005) Fast noninvasive activation and inhibition of neural and network activity by vertebrate rhodopsin and green algae channelrhodopsin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:17816–21.

Liebe S, Hoerzer GM, Logothetis NK, Rainer G (2012) Theta coupling between V4 and prefrontal cortex predicts visual short-term memory performance. *Nature Neuroscience* 15:456–462.

Lin JY (2011) A User's Guide to Channelrhodopsin Variants: Features, Limitations and Future Developments. *Experimental physiology* 96:19.

Lisman J, Jensen O (2013) The Theta-Gamma Neural Code. *Neuron* 77:1002–1016.

Liu Qs, Xu Q, Arcuino G, Kang J, Nedergaard M (2004) From The Cover: Astrocyte-mediated activation of neuronal kainate receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101:3172–3177.

Liu X, Zhao K, Wang D, Ping Y, Wan H (2018) Goal-directed behavior elevates gamma oscillations in nidopallium caudolaterale of pigeon. *Brain Research Bulletin* 137:10–16.

Liu X, Ramirez S, Pang PT, Puryear CB, Govindarajan A, Deisseroth K, Tonegawa S (2012) Optogenetic stimulation of a hippocampal engram activates fear memory recall. *Nature* 484:381–385.

Llinas R (1988) The intrinsic electrophysiological properties of mammalian neurons: insights into central nervous system function. *Science* 242:1654–1664.

Lunden JW, Durens M, Phillips AW, Nestor MW (2019) Cortical interneuron function in autism spectrum condition. *Pediatric Research* 85:146–154.

Lustig C, Kozak R, Sarter M, Young J, Robbins T (2013) CNTRICS final animal model task selection: Control of attention. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 37:2099–2110.

Macvicar BA, Tse FWY, Crichton SA, Kettenmann2 H (1989) GABA-Activated Cl-Channels in Astrocytes of Hippocampal Slices Technical report.

Marín O (2012) Interneuron dysfunction in psychiatric disorders. *Nature Reviews Neuroscience* 13:107–120.

Mariotti L, Losi G, Lia A, Melone M, Chiavegato A, Gómez-Gonzalo M, Sessolo M, Bovetti S, Forli A, Zonta M, Requie LM, Marcon I, Pugliese A, Viollet C, Bettler B, Fellin T, Conti F, Carmignoto G (2018) Interneuron-specific signaling evokes distinctive somatostatin-mediated responses in adult cortical astrocytes. *Nature Communications* 9:82.

Mariotti L, Losi G, Sessolo M, Marcon I, Carmignoto G (2016a) The inhibitory neurotransmitter GABA evokes long-lasting Ca ²⁺oscillations in cortical astrocytes. *Glia* 64:363–373.

Mariotti L, Losi G, Sessolo M, Marcon I, Carmignoto G (2016b) The inhibitory neurotransmitter GABA evokes long-lasting Ca ²⁺oscillations in cortical astrocytes. *Glia* 64:363–373.

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

Martens S, McMahon HT (2008) Mechanisms of membrane fusion: disparate players and common principles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9:543–556.

Martin AR (1966) Quantal Nature of Synaptic Transmission. *Physiological Reviews* 46:51–66.

Martin R, Bajo-Graneras R, Moratalla R, Perea G, Araque A (2015) Circuit-specific signaling in astrocyte-neuron networks in basal ganglia pathways. *Science* 349:730–734.

Martin SJ, Grimwood PD, Morris RGM (2000) Synaptic Plasticity and Memory: An Evaluation of the Hypothesis. *Annual Review of Neuroscience* 23:649–711.

Martin-Fernandez M, Jamison S, Robin LM, Zhao Z, Martin ED, Aguilar J, Benneyworth MA, Marsicano G, Araque A (2017) Synapse-specific astrocyte gating of amygdala-related behavior. *Nature Neuroscience* 20:1540–1548.

Martínez-Rodríguez R, Tonda A, Gragera RR, Paz-Doel R, García-Cordovilla R, Fernández-Fernández E, Fernández AM, González-Romero F, López-Bravo A (1993) Synaptic and non-synaptic immunolocalization of GABA and glutamate acid decarboxylase (GAD) in cerebellar cortex of rat. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)* 39:115–23.

Matos M, Bosson A, Riebe I, Reynell C, Vallée J, Laplante I, Panatier A, Robitaille R, Lacaille JC (2018) Astrocytes detect and upregulate transmission at inhibitory synapses of somatostatin interneurons onto pyramidal cells. *Nature Communications* 9:4254.

Matos M, Shen HY, Augusto E, Wang Y, Wei CJ, Wang YT, Agostinho P, Boison D, Cunha RA, Chen JF (2015) Deletion of Adenosine A2A Receptors From Astrocytes Disrupts Glutamate Homeostasis Leading to Psychomotor and Cognitive Impairment: Relevance to Schizophrenia. *Biological Psychiatry* 78:763–774.

Matsuno-Yagi A, Mukohata Y (1977) Two possible roles of bacteriorhodopsin; a comparative study of strains of Halobacterium halobium differing in pigmentation. *Biochemical and biophysical research communications* 78:237–43.

McBain CJ, Fisahn A (2001) Interneurons unbound. *Nature Reviews Neuroscience* 2:11–23.

McGregor KM, Bécamel C, Marin P, Andrade R (2016) Using melanopsin to study G protein signaling in cortical neurons. *Journal of Neurophysiology* 116:1082–1092.

McLachlan EM (1978) The statistics of transmitter release at chemical synapses. *International review of physiology* 17:49–117.

Mederos S, González-Arias C, Perea G (2018) Astrocyte–Neuron Networks: A Multilane Highway of Signaling for Homeostatic Brain Function. *Frontiers in Synaptic Neuroscience* 10:45.

Mederos S, Hernández-Vivanco A, Ramírez-Franco J, Martín-Fernández M, Navarrete M, Yang A, Boyden ES, Perea G (2019) Melanopsin for precise optogenetic activation of astrocyte-neuron networks. *Glia* 67:915–934.

Mederos S, Perea G (2019) GABAergic-astrocyte signaling: A refinement of inhibitory brain networks. *Glia* p. glia.23644.

Mehring C, Rickert J, Vaadia E, de Oliveira SC, Aertsen A, Rotter S (2003) Inference of hand movements from local field potentials in monkey motor cortex. *Nature Neuroscience* 6:1253–1254.

Meier SD, Kafitz KW, Rose CR (2008) Developmental profile and mechanisms of GABA-induced calcium signaling in hippocampal astrocytes. *Glia* 56:1127–1137.

Min R, Nevian T (2012) Astrocyte signaling controls spike timing–dependent depression at neocortical synapses. *Nature Neuroscience* 15:746–753.

Miyawaki A, Llopis J, Heim R, McCaffery JM, Adams JA, Ikura M, Tsien RY (1997) Fluorescent indicators for Ca2+based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* 388:882–887.

Moldavan M, Cravetchi O, Allen CN (2017) GABA transporters regulate tonic and synaptic GABA _Areceptor-mediated currents in the suprachiasmatic nucleus neurons. *Journal of Neurophysiology* 118:3092–3106.

Morquette P, Verdier D, Kadala A, Féthière J, Philippe AG, Robitaille R, Kolta A (2015) An astrocyte-dependent mechanism for neuronal rhythmogenesis. *Nature Neuroscience* 18:844–854.

Moser EI, Roudi Y, Witter MP, Kentros C, Bonhoeffer T, Moser MB (2014) Grid cells and cortical representation. *Nature Reviews Neuroscience* 15:466–481.

Müller T, Fritschy JM, Grosche J, Pratt GD, Möhler H, Kettenmann H (1994) Developmental regulation of voltage-gated K+ channel and GABAA receptor expression in Bergmann glial cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 14:2503–14.

Mure L, Hatori M, Zhu Q, Demas J, Kim I, Nayak S, Panda S (2016) Melanopsin-Encoded Response Properties of Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cells. *Neuron* 90:1016–1027.

Murugan M, Jang HJ, Park M, Miller EM, Cox J, Taliaferro JP, Parker NF, Bhave V, Hur H, Liang Y, Nectow AR, Pillow JW, Witten IB (2017) Combined Social and Spatial Coding in a Descending Projection from the Prefrontal Cortex. *Cell* 171:1663–1677.

Nadel L, MacDonald L (1980) Hippocampus: cognitive map or working memory? *Behavioral and neural biology* 29:405–9.

Nagai J, Rajbhandari AK, Gangwani MR, Hachisuka A, Coppola G, Masmanidis SC, Fanselow MS, Khakh BS (2019) Hyperactivity with Disrupted Attention by Activation of an Astrocyte Synaptogenic Cue. *Cell* 177:1280–1292.

Nagai T, Sawano A, Park ES, Miyawaki A (2001) Circularly permuted green fluorescent proteins engineered to sense Ca2+. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:3197–202.

Nagel G, Ollig D, Fuhrmann M, Kateriya S, Musti AM, Bamberg E, Hegemann P (2002) Channelrhodopsin-1: A Light-Gated Proton Channel in Green Algae. *Science* 296:2395–2398.

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

Nash MS, Young KW, John Challiss RA, Nahorski SR (2001) Receptor-specific messenger oscillations. *Nature* 413:381–382.

Navarrete M, Araque A (2008) Endocannabinoids Mediate Neuron-Astrocyte Communication. *Neuron* 57:883–893.

Navarrete M, Araque A (2010) Endocannabinoids Potentiate Synaptic Transmission through Stimulation of Astrocytes. *Neuron* 68:113–126.

Navarrete M, Perea G, de Sevilla DF, Gómez-Gonzalo M, Núñez A, Martín ED, Araque A (2012) Astrocytes Mediate In Vivo Cholinergic-Induced Synaptic Plasticity. *PLoS Biology* 10:e1001259.

Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA (2003) New roles for astrocytes: Redefining the functional architecture of the brain. *Trends in Neurosciences* 26:523–530.

Neves G, Cooke SF, Bliss TVP (2008) Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nature Reviews Neuroscience* 9:65–75.

Nixdorf-Bergweiler BE, Albrecht D, Heinemann U (1994) Developmental changes in the number, size, and orientation of GFAP-positive cells in the CA1 region of rat hippocampus. *Glia* 12:180–95.

Octeau JC, Gangwani MR, Allam SL, Tran D, Huang S, Hoang-Trong TM, Golshani P, Rumbell TH, Kozloski JR, Khakh BS (2019) Transient, Consequential Increases in Extracellular Potassium Ions Accompany Channelrhodopsin2 Excitation. *Cell Reports* 27:2249–2261.

Oesterhelt D, Stoeckenius W (1973) Functions of a New Photoreceptor Membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 70:2853–2857.

Oesterhelt D, Stoeckenius W (1971) Rhodopsin-like Protein from the Purple Membrane of Halobacterium halobium. *Nature New Biology* 233:149–152.

O'Keefe J, Nadel L (1978) *The hippocampus as a cognitive map* Clarendon Press.

Okun M, Lampl I (2008) Instantaneous correlation of excitation and inhibition during ongoing and sensory-evoked activities. *Nature Neuroscience* 11:535–537.

Oliveira JF, Sardinha VM, Guerra-Gomes S, Araque A, Sousa N (2015) Do stars govern our actions? Astrocyte involvement in rodent behavior. *Trends in Neurosciences* 38:535–549.

Orkand RK, Nicholls JG, Kuffler SW (1966) Effect of nerve impulses on the membrane potential of glial cells in the central nervous system of amphibia. *Journal of Neurophysiology* 29:788–806.

Orthmann-Murphy JL, Abrams CK, Scherer SS (2008) Gap junctions couple astrocytes and oligodendrocytes. *Journal of molecular neuroscience : MN* 35:101–16.

Osipova D, Hermes D, Jensen O (2008) Gamma Power Is Phase-Locked to Posterior Alpha Activity. *PLoS ONE* 3:e3990.

Oya M, Kitaguchi T, Yanagihara Y, Numano R, Kakeyama M, Ikematsu K, Tsuboi T (2013) Vesicular nucleotide transporter is involved in ATP storage of secretory lysosomes in astrocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 438:145–151.

Packer AM, Yuste R (2011) Dense, unspecific connectivity of neocortical parvalbumin-positive interneurons: a canonical microcircuit for inhibition? *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31:13260–71.

Palva S, Kulashekhar S, Hamalainen M, Palva JM (2011) Localization of Cortical Phase and Amplitude Dynamics during Visual Working Memory Encoding and Retention. *Journal of Neuroscience* 31:5013–5025.

Panatier A, Vallée J, Haber M, Murai K, Lacaille JC, Robitaille R (2011) Astrocytes Are Endogenous Regulators of Basal Transmission at Central Synapses. *Cell* 146:785–798.

Panda S, Nayak SK, Campo B, Walker JR, Hogenesch JB, Jegla T (2005) Illumination of the Melanopsin Signaling Pathway. *Science* 307:600–604.

Pankratov Y, Lalo U, Verkhratsky A, North RA (2007) Quantal Release of ATP in Mouse Cortex. *The Journal of General Physiology* 129:257–265.

Pannasch U, Vargova L, Reingruber J, Ezan P, Holcman D, Giaume C, Sykova E, Rouach N (2011) Astroglial networks scale synaptic activity and plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108:8467–8472.

Papouin T, Dunphy JM, Tolman M, Dineley KT, Haydon PG (2017) Septal Cholinergic Neuromodulation Tunes the Astrocyte-Dependent Gating of Hippocampal NMDA Receptors to Wakefulness. *Neuron* 94:840–854.

Parpura V, Grubišić V, Verkhratsky A (2011) Ca2+ sources for the exocytotic release of glutamate from astrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1813:984–991.

Parpura V, Zorec R (2010) Gliotransmission: Exocytotic release from astrocytes. *Brain Research Reviews* 63:83–92.

Pascual O, Casper KB, Kubera C, Zhang J, Revilla-Sanchez R, Sul JY, Takano H, Moss SJ, McCarthy K, Haydon PG (2005) Astrocytic Purinergic Signaling Coordinates Synaptic Networks. *Science* 310:113–116.

Paukert M, Agarwal A, Cha J, Doze VAA, Kang JUU, Bergles DEE (2014) Norepinephrine controls astroglial responsiveness to local circuit activity. *Neuron* 82.

Paxinos G, Franklin KBJ (2012) *Paxinos and Franklin's The mouse brain in stereotaxic coordinates.*

Peinado G, Osorno T, Gomez MdP, Nasi E (2015) Calcium activates the light-dependent conductance in melanopsin-expressing photoreceptors of amphioxus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112:7845–7850.

Pelluru D, Konadhode RR, Bhat NR, Shiromani PJ (2016) Optogenetic stimulation of astrocytes in the posterior hypothalamus increases sleep at night in C57BL/6J mice. *European Journal of Neuroscience* 43:1298–1306.

Penner MR, Mizumori SJ (2012) Neural systems analysis of decision making during goal-directed navigation. *Progress in Neurobiology* 96:96–135.

Perea G, Araque A (2007) Astrocytes Potentiate Transmitter Release at Single Hippocampal Synapses. *Science* 317:1083–1086.

Perea G, Araque A (2005a) Properties of Synaptically Evoked Astrocyte Calcium Signal Reveal Synaptic Information Processing by Astrocytes. *Journal of Neuroscience* 25:2192–2203.

Perea G, Araque A (2005b) Glial calcium signaling and neuron–glia communication. *Cell Calcium* 38:375–382.

Perea G, Gómez R, Mederos S, Covelo A, Ballesteros JJ, Schlosser L, Hernández-Vivanco A, Martín-Fernández M, Quintana R, Rayan A, Díez A, Fuenzalida M, Agarwal A, Bergles DE, Bettler B, Manahan-Vaughan D, Martín ED, Kirchhoff F, Araque A (2016) Activity-dependent switch of GABAergic inhibition into glutamatergic excitation in astrocyte-neuron networks. *eLife* 5.

Perea G, Sur M, Araque A (2014) Neuron-glia networks: integral gear of brain function. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8:378.

Perea G, Yang A, Boyden ES, Sur M (2014) Optogenetic astrocyte activation modulates response selectivity of visual cortex neurons in vivo. *Nature Communications* 5:3262.

Pérez-Garci E, Gassmann M, Bettler B, Larkum ME (2006) The GABAB1b Isoform Mediates Long-Lasting Inhibition of Dendritic Ca2+ Spikes in Layer 5 Somatosensory Pyramidal Neurons. *Neuron* 50:603–616.

Pérez Koldenkova V, Nagai T (2013) Genetically encoded Ca2 + indicators: Properties and evaluation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1833:1787–1797.

Pevzner A, Izadi A, Lee DJ, Shahlaie K, Gurkoff GG (2016) Making Waves in the Brain: What Are Oscillations, and Why Modulating Them Makes Sense for Brain Injury. *Frontiers in Systems Neuroscience* 10:30.

Pezzulo G (2014) Goals reconfigure cognition by modulating predictive processes in the brain. *Behavioral and Brain Sciences* 37:154–155.

Pezzulo G, van der Meer MA, Lansink CS, Pennartz CM (2014a) Internally generated sequences in learning and executing goal-directed behavior. *Trends in Cognitive Sciences* 18:647–657.

Pezzulo G, Verschure PFMJ, Balkenius C, Pennartz CMA (2014b) The principles of goal-directed decision-making: from neural mechanisms to computation and robotics. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 369.

Pirttimaki T, Parri HR, Crunelli V (2013) Astrocytic GABA transporter GAT-1 dysfunction in experimental absence seizures. *The Journal of physiology* 591:823–33.

Plog BA, Nedergaard M (2018) The Glymphatic System in Central Nervous System Health and Disease: Past, Present, and Future. *Annual review of pathology* 13:379–394.

Polikar R (2006) The wavelet tutorial: why wavelet transform? Technical report.

Poo C, Isaacson JS (2009) Odor Representations in Olfactory Cortex: "Sparse" Coding, Global Inhibition, and Oscillations. *Neuron* 62:850–861.

Porter JT, McCarthy KD (1997) Astrocytic neurotransmitter receptors in situ and in vivo. *Progress in neurobiology* 51:439–55.

Poskanzer KE, Yuste R (2011) Astrocytic regulation of cortical UP states. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108:18453–18458.

Poskanzer KE, Molofsky AV (2018) Dynamism of an Astrocyte In Vivo: Perspectives on Identity and Function. *Annual Review of Physiology* 80:143–157.

Poskanzer KE, Yuste R (2016) Astrocytes regulate cortical state switching in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113:E2675–E2684.

Pougnet JT, Compans B, Martinez A, Choquet D, Hosy E, Boué-Grabot E (2016) P2X-mediated AMPA receptor internalization and synaptic depression is controlled by two CaMKII phosphorylation sites on GluA1 in hippocampal neurons. *Scientific Reports* 6:31836.

Pougnet JT, Toulme E, Martinez A, Choquet D, Hosy E, Boué-Grabot E (2014) ATP P2X Receptors Downregulate AMPA Receptor Trafficking and Postsynaptic Efficacy in Hippocampal Neurons. *Neuron* 83:417–430.

Pritchett DL, Siegle JH, Deister CA, Moore CI (2015) For things needing your attention: the role of neocortical gamma in sensory perception. *Current Opinion in Neurobiology* 31:254–263.

Ramón y Cajal S (1909) *Histologie du Systeme Nerveux de l'homme et des Vertebres, Vol. 2* HACHETTE LIVRE - BNF.

Rash JE, Yasumura T, Dudek FE, Nagy JI (2001) Cell-specific expression of connexins and evidence of restricted gap junctional coupling between glial cells and between neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21:1983–2000.

Rasooli-Nejad S, Palygin O, Lalo U, Pankratov Y (2014) Cannabinoid receptors contribute to astroglial Ca-signalling and control of synaptic plasticity in the neocortex. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 369:20140077.

Ray S, Ni AM, Maunsell JHR (2013) Strength of Gamma Rhythm Depends on Normalization. *PLoS Biology* 11:e1001477.

Reyes A, Lee D, Graziani C, Tzeferacos P (2018) A New Class of High-Order Methods for Fluid Dynamics Simulations Using Gaussian Process Modeling: One-Dimensional Case. *Journal of Scientific Computing* 76:443–480.

Robbins TW (2011) Cognition: The Ultimate Brain Function. *Neuropsychopharmacology* 36:1–2.

Roberts E, Frankel S (1950) gamma-Aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid. *The Journal of biological chemistry* 187:55–63.

Robin LM, Oliveira Da Cruz JF, Langlais VC, Oliet HR, Correspondence GM (2018) Astroglial CB 1 Receptors Determine Synaptic D-Serine Availability to Enable Recognition Memory .

Roth BL (2016) DREADDs for Neuroscientists. *Neuron* 89:683–94.

Rouach N, Koulakoff A, Abudara V, Willecke K, Giaume C (2008) Astroglial Metabolic Networks Sustain Hippocampal Synaptic Transmission. *Science* 322:1551–1555.

Roux F, Wibral M, Mohr HM, Singer W, Uhlhaas PJ (2012) Gamma-Band Activity in Human Prefrontal Cortex Codes for the Number of Relevant Items Maintained in Working Memory. *Journal of Neuroscience* 32:12411–12420.

Roux L, Madar A, Lacroix MM, Yi C, Benchenane K, Giaume C (2015) Astroglial Connexin 43 Hemichannels Modulate Olfactory Bulb Slow Oscillations. *Journal of Neuroscience* 35:15339–15352.

Roux L, Buzsáki G (2015) Tasks for inhibitory interneurons in intact brain circuits. *Neuropharmacology* 88:10–23.

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

Rummell BP, Klee JL, Sigurdsson T (2016) Attenuation of Responses to Self-Generated Sounds in Auditory Cortical Neurons. *The Journal of Neuroscience* 36:12010–12026.

Rusakov DA (2015) Disentangling calcium-driven astrocyte physiology. *Nature Reviews Neuroscience* 16:226–233.

Rutecki PA (1992) Neuronal excitability: voltage-dependent currents and synaptic transmission. *Journal of clinical neurophysiology : official publication of the American Electroencephalographic Society* 9:195–211.

Sakamoto S, Miyaji T, Hiasa M, Ichikawa R, Uematsu A, Iwatsuki K, Shibata A, Uneyama H, Takayanagi R, Yamamoto A, Omote H, Nomura M, Moriyama Y (2015) Impairment of vesicular ATP release affects glucose metabolism and increases insulin sensitivity. *Scientific Reports* 4:6689.

Salinas E, Sejnowski TJ (2000) Impact of correlated synaptic input on output firing rate and variability in simple neuronal models. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20:6193–209.

Sánchez-Mendoza EH, Bellver-Landete V, Arce C, Doeppner TR, Hermann DM, Oset-Gasque MJ (2017) Vesicular glutamate transporters play a role in neuronal differentiation of cultured SVZ-derived neural precursor cells. *PLOS ONE* 12:e0177069.

Sandberg R, Yasuda R, Pankratz DG, Carter TA, Del Rio JA, Wodicka L, Mayford M, Lockhart DJ, Barlow C (2000) Regional and strain-specific gene expression mapping in the adult mouse brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97:11038–11043.

Sardinha VM, Guerra-Gomes S, Caetano I, Tavares G, Martins M, Reis JS, Correia JS, Teixeira-Castro A, Pinto L, Sousa N, Oliveira JF (2017) Astrocytic signaling supports hippocampal-prefrontal theta synchronization and cognitive function. *Glia* 65:1944–1960.

Sasaki T, Beppu K, Tanaka KF, Fukazawa Y, Shigemoto R, Matsui KK (2012) No Title 109.

Sasaki T, Ishikawa T, Abe R, Nakayama R, Asada A, Matsuki N, Ikegaya Y (2014) Astrocyte calcium signalling orchestrates neuronal synchronization in organotypic hippocampal slices. *The Journal of Physiology Neuroscience* 592:2771–2783.

Savtchouk I, Carriero G, Volterra A (2018) Studying Axon-Astrocyte Functional Interactions by 3D Two-Photon Ca2+ Imaging: A Practical Guide to Experiments and "Big Data" Analysis. *Frontiers in cellular neuroscience* 12:98.

Savtchouk I, Volterra A (2018) Gliotransmission: Beyond Black-and-White. *The Journal of Neuroscience* 38:14–25.

Scanziani M (2000) GABA spillover activates postsynaptic GABA(B) receptors to control rhythmic hippocampal activity. *Neuron* 25:673–81.

Scemes E, Giaume C (2006) Astrocyte calcium waves: what they are and what they do. *Glia* 54:716–25.

Schomburg EW, Anastassiou CA, Buzsáki G, Koch C (2012) The spiking component of oscillatory extracellular potentials in the rat hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32:11798–811.

Schwartzkroin PA (1975) Characteristics of CA1 neurons recorded intracellularly in the hippocampalin vitro slice preparation. *Brain Research* 85:423–436.

Schwarz Y, Zhao N, Kirchhoff F, Bruns D (2017) Astrocytes control synaptic strength by two distinct v-SNARE-dependent release pathways. *Nature Neuroscience* 20:1529–1539.

Scofield MD, Li H, Siemsen BM, Healey KL, Tran PK, Woronoff N, Boger HA, Kalivas PW, Reissner KJ (2016) Cocaine Self-Administration and Extinction Leads to Reduced Glial Fibrillary Acidic Protein Expression and Morphometric Features of Astrocytes in the Nucleus Accumbens Core. *Biological Psychiatry* 80:207–215.

Senkowski D, Gallinat J (2015) Dysfunctional Prefrontal Gamma-Band Oscillations Reflect Working Memory and Other Cognitive Deficits in Schizophrenia. *Biological Psychiatry* 77:1010–1019.

Senzai Y, Fernandez-Ruiz A, Buzsáki G (2019) Layer-Specific Physiological Features and Interlaminar Interactions in the Primary Visual Cortex of the Mouse. *Neuron* 101:500–513.

Serrano A, Haddjeri N, Lacaille JC, Robitaille R (2006) GABAergic Network Activation of Glial Cells Underlies Hippocampal Heterosynaptic Depression. *Journal of Neuroscience* 26:5370–5382.

Sexton T, Buhr E, Van Gelder RN (2012) Melanopsin and Mechanisms of Non-visual Ocular Photoreception. *Journal of Biological Chemistry* 287:1649–1656.

Shein-Idelson M, Ondracek JM, Liaw HP, Reiter S, Laurent G (2016) Slow waves, sharp waves, ripples, and REM in sleeping dragons. *Science* 352:590–595.

Shen W, Nikolic L, Meunier C, Pfrieger F, Audinat E (2017) An autocrine purinergic signaling controls astrocyte-induced neuronal excitation. *Scientific Reports* 7:11280.

Sherwood MW, Arizono M, Hisatsune C, Bannai H, Ebisui E, Sherwood JL, Panatier A, Oliet SHR, Mikoshiba K (2017) Astrocytic IP ₃Rs: Contribution to Ca ²⁺signalling and hippocampal LTP. *Glia* 65:502–513.

Shigetomi E, Bowser DN, Sofroniew MV, Khakh BS (2008) Two Forms of Astrocyte Calcium Excitability Have Distinct Effects on NMDA Receptor-Mediated Slow Inward Currents in Pyramidal Neurons. *Journal of Neuroscience* 28:6659–6663.

Shigetomi E, Bushong EA, Haustein MD, Tong X, Jackson-Weaver O, Kracun S, Xu J, Sofroniew MV, Ellisman MH, Khakh BS (2013) Imaging calcium microdomains within entire astrocyte territories and endfeet with GCaMPs expressed using adeno-associated viruses. *The Journal of general physiology* 141:633–47.

Shigetomi E, Kracun S, Sofroniew MV, Khakh BS (2010) A genetically targeted optical sensor to monitor calcium signals in astrocyte processes. *Nature Neuroscience* 13:759–766.

Shigetomi E, Tong X, Kwan KY, Corey DP, Khakh BS (2012) TRPA1 channels regulate astrocyte resting calcium and inhibitory synapse efficacy through GAT-3. *Nature Neuroscience* 15:70–80.

Siegle JH, Pritchett DL, Moore CI (2014) Gamma-range synchronization of fast-spiking interneurons can enhance detection of tactile stimuli. *Nature Neuroscience* 17:1371–1379.

Simonov PV Consciousness and the brain. *Neuroscience and behavioral physiology* 24:234–8.

Sirota A, Montgomery S, Fujisawa S, Isomura Y, Zugaro M, Buzsáki G (2008) Entrainment of Neocortical Neurons and Gamma Oscillations by the Hippocampal Theta Rhythm. *Neuron* 60:683–697.

Sivilotti L, Nistri A (1991) GABA receptor mechanisms in the central nervous system. *Progress in neurobiology* 36:35–92.

Smith KS, Bucci DJ, Luikart BW, Mahler SV (2016) DREADDS: Use and application in behavioral neuroscience. *Behavioral neuroscience* 130:137–55.

Sohal VS (2016) How Close Are We to Understanding What (if Anything) γ Oscillations Do in Cortical Circuits? *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 36:10489–10495.

Sohal VS, Zhang F, Yizhar O, Deisseroth K (2009) Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. *Nature* 459:698–702.

Soltesz I, Staley K (2006) High times for memory: cannabis disrupts temporal coordination among hippocampal neurons. *Nature Neuroscience* 9:1461–1463.

Somogyi P, Tamás G, Lujan R, Buhl EH (1998) Salient features of synaptic organisation in the cerebral cortex. *Brain research. Brain research reviews* 26:113–35.

Somogyi P, Klausberger T (2005) Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus. *The Journal of Physiology* 562:9–26.

Song I, Volynski K, Brenner T, Ushkaryov Y, Walker M, Semyanov A (2013) Different transporter systems regulate extracellular GABA from vesicular and non-vesicular sources. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 7.

Sontheimer H, Fernandez-Marques E, Ullrich N, Pappas CA, Waxman SG (1994) Astrocyte Na+ channels are required for maintenance of Na+/K(+)-ATPase activity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 14:2464–75.

Srinivasan R, Huang BS, Venugopal S, Johnston AD, Chai H, Zeng H, Golshani P, Khakh BS (2015) Ca2+ signaling in astrocytes from Ip3r2-/- mice in brain slices and during startle responses in vivo. *Nature Neuroscience* 18:708–717.

Stachniak T, Ghosh A, Sternson S (2014) Chemogenetic Synaptic Silencing of Neural Circuits Localizes a HypothalamusMidbrain Pathway for Feeding Behavior. *Neuron* 82:797–808.

Steimer T (2011) Animal models of anxiety disorders in rats and mice: some conceptual issues. *Dialogues in clinical neuroscience* 13:495–506.

Steinmetz NA, Koch C, Harris KD, Carandini M (2018) Challenges and opportunities for large-scale electrophysiology with Neuropixels probes. *Current Opinion in Neurobiology* 50:92–100.

Stobart JL, Ferrari KD, Barrett MJ, Glück C, Stobart MJ, Zuend M, Weber B (2018) Cortical Circuit Activity Evokes Rapid Astrocyte Calcium Signals on a Similar Timescale to Neurons. *Neuron* 98:726–735.

Stosiek C, Garaschuk O, Holthoff K, Konnerth A (2003) In vivo two-photon calcium imaging of neuronal networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:7319–24.

Strader CD, Fong TM, Graziano MP, Tota MR (1995) The family of G-protein-coupled receptors. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 9:745–54.

Suadicani SO, Flores CE, Urban-Maldonado M, Beelitz M, Scemes E (2004) Gap junction channels coordinate the propagation of intercellular Ca2+ signals generated by P2Y receptor activation. *Glia* 48:217–29.

Südhof T (2013) Neurotransmitter Release: The Last Millisecond in the Life of a Synaptic Vesicle. *Neuron* 80:675–690.

Szentágothai J (1975) The 'module-concept' in cerebral cortex architecture. *Brain Research* 95:475–496.

Takata N, Mishima T, Hisatsune C, Nagai T, Ebisui E, Mikoshiba K, Hirase H (2011) Astrocyte Calcium Signaling Transforms Cholinergic Modulation to Cortical Plasticity In Vivo. *Journal of Neuroscience* 31:18155–18165.

Takeuchi T, Duszkiewicz AJ, Morris RGM (2014) The synaptic plasticity and memory hypothesis: encoding, storage and persistence. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 369:20130288.

Tan Z, Liu Y, Xi W, Lou Hf, Zhu L, Guo Z, Mei L, Duan S (2017) Glia-derived ATP inversely regulates excitability of pyramidal and CCK-positive neurons. *Nature Communications* 8:13772.

Tang F, Lane S, Korsak A, Paton JFR, Gourine AV, Kasparov S, Teschemacher AG (2014) Lactate-mediated glia-neuronal signalling in the mammalian brain. *Nature Communications* 5:3284.

Tay TL, Savage JC, Hui CW, Bisht K, Tremblay M2017) Microglia across the lifespan: from origin to function in brain development, plasticity and cognition. *The Journal of Physiology* 595:1929–1945.

Thiagarajan TC, Lindskog M, Malgaroli A, Tsien RW (2007) LTP and adaptation to inactivity: Overlapping mechanisms and implications for metaplasticity. *Neuropharmacology* 52:156–175.

Tian L, Hires SA, Looger LL (2012) Imaging neuronal activity with genetically encoded calcium indicators. *Cold Spring Harbor protocols* 2012:647–56.

Tippens AL, Pare JF, Langwieser N, Moosmang S, Milner TA, Smith Y, Lee A (2008) Ultrastructural evidence for pre- and postsynaptic localization of Cav1.2 L-type Ca2+ channels in the rat hippocampus. *The Journal of Comparative Neurology* 506:569–583.

Tonegawa S, Pignatelli M, Roy DS, Ryan TJ (2015) Memory engram storage and retrieval. *Current Opinion in Neurobiology* 35:101–109.

Tort ABL, Komorowski RW, Manns JR, Kopell NJ, Eichenbaum H (2009) Theta-gamma coupling increases during the learning of item-context associations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106:20942–20947.

Tort ABL, Kramer MA, Thorn C, Gibson DJ, Kubota Y, Graybiel AM, Kopell NJ (2008) Dynamic cross-frequency couplings of local field potential oscillations in rat striatum and hippocampus during performance of a T-maze task. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105:20517–20522.

Tremblay R, Lee S, Rudy B (2016) GABAergic Interneurons in the Neocortex: From Cellular Properties to Circuits. *Neuron* 91:260–292.

Tsien JZ, Huerta PT, Tonegawa S (1996) The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell* 87:1327–38.

Turrigiano G (2011) Too Many Cooks? Intrinsic and Synaptic Homeostatic Mechanisms in Cortical Circuit Refinement. *Annual Review of Neuroscience* 34:89–103.

Tye KM, Deisseroth K (2012) Optogenetic investigation of neural circuits underlying brain disease in animal models. *Nature Reviews Neuroscience* 13:251–266.

Ullian EM, Sapperstein SK, Christopherson KS, Barres BA (2001) Control of synapse number by glia. *Science (New York, N.Y.)* 291:657–61.

Ulrich D, Bettler B (2007) GABAB receptors: synaptic functions and mechanisms of diversity. *Current Opinion in Neurobiology* 17:298–303.

Ung K, Arenkiel BR (2012) Fiber-optic Implantation for Chronic Optogenetic Stimulation of Brain Tissue. *Journal of Visualized Experiments* p. e50004.

Urban DJ, Roth BL (2015) DREADDs (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs): Chemogenetic Tools with Therapeutic Utility. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 55:399–417.

Vandecasteele M, M. S, Royer S, Belluscio M, Berényi A, Diba K, Fujisawa S, Grosmark A, Mao D, Mizuseki K, Patel J, Stark E, Sullivan D, Watson B, Buzsáki G (2012) Large-scale Recording of Neurons by Movable Silicon Probes in Behaving Rodents. *Journal of Visualized Experiments* p. e3568.

Varela F, Lachaux JP, Rodriguez E, Martinerie J (2001) The brainweb: Phase synchronization and large-scale integration. *Nature Reviews Neuroscience* 2:229–239.

Ventura R, Harris KM (1999) Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19:6897–906.

Verkhratsky A, Matteoli M, Parpura V, Mothet JP, Zorec R (2016) Astrocytes as secretory cells of the central nervous system: idiosyncrasies of vesicular secretion. *The EMBO journal* 35:239–57.

Vernadakis A (1996) No Title 49:185–214.

Virchow R (1858) Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische and pathologische Gewebelehre. *Verlag von August Hirschfeld, Berlin.* p. 1858.

Volianskis A, France G, Jensen MS, Bortolotto ZA, Jane DE, Collingridge GL (2015) Long-term potentiation and the role of N-methyl-D-aspartate receptors. *Brain research* 1621:5–16.

Volterra A, Liaudet N, Savtchouk I (2014) Astrocyte Ca2+ signalling: an unexpected complexity. *Nature Reviews Neuroscience* 15:327–335.

Volterra A, Meldolesi J (2005) Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nature Reviews Neuroscience* 6:626–640.

Wallraff A, Köhling R, Heinemann U, Theis M, Willecke K, Steinhäuser C (2006) The Impact of Astrocytic Gap Junctional Coupling on Potassium Buffering in the Hippocampus. *Journal of Neuroscience* 26:5438–5447.

Walz W, Wuttke WA (1989) Resistance of astrocyte electrical membrane properties to acidosis changes in the presence of lactate. *Brain research* 504:82–6.

Wang J, Tu J, Cao B, Mu L, Yang X, Cong M, Ramkrishnan AS, Chan RH, Wang L, Li Y (2017) Astrocytic l -Lactate Signaling Facilitates Amygdala-Anterior Cingulate Cortex Synchrony and Decision Making in Rats. *Cell Reports* 21:2407–2418.

Wehr M, Zador AM (2003) Balanced inhibition underlies tuning and sharpens spike timing in auditory cortex. *Nature* 426:442–446.

Welchman AE, Kourtzi Z (2013) Linking brain imaging signals to visual perception. *Visual Neuroscience* 30:229–241.

Wess J, Nakajima K, Jain S (2013) Novel designer receptors to probe GPCR signaling and physiology. *Trends in pharmacological sciences* 34:385–92.

Whissell PD, Tohyama S, Martin LJ (2016) The Use of DREADDs to Deconstruct Behavior. *Frontiers in genetics* 7:70.

Wilent WB, Contreras D (2004) Synaptic Responses to Whisker Deflections in Rat Barrel Cortex as a Function of Cortical Layer and Stimulus Intensity. *Journal of Neuroscience* 24:3985–3998.

Womelsdorf T, Schoffelen JM, Oostenveld R, Singer W, Desimone R, Engel AK, Fries P (2007) Modulation of Neuronal Interactions Through Neuronal Synchronization. *Science* 316:1609–1612.

Womelsdorf T, Fries P, Mitra PP, Desimone R (2006) Gamma-band synchronization in visual cortex predicts speed of change detection. *Nature* 439:733–736.

Woo D, Han KS, Shim J, Yoon BE, Kim E, Bae J, Oh SJ, Hwang E, Marmorstein A, Bae Y, Park JY, Lee C (2012) TREK-1 and Best1 Channels Mediate Fast and Slow Glutamate Release in Astrocytes upon GPCR Activation. *Cell* 151:25–40.

Wulff P, Ponomarenko AA, Bartos M, Korotkova TM, Fuchs EC, Bähner F, Both M, Tort ABL, Kopell NJ, Wisden W, Monyer H (2009) Hippocampal theta rhythm and its coupling with gamma oscillations require fast inhibition onto parvalbumin-positive interneurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:3561–6.

Xie AX, Petravicz J, McCarthy KD (2015) Molecular approaches for manipulating astrocytic signaling in vivo. *Frontiers in cellular neuroscience* 9:144.

Xiong W, Cao X, Zeng Y, Qin X, Zhu M, Ren J, Wu Z, Huang Q, Zhang Y, Wang M, Chen L, Turecki G, Mechawar N, Chen W, Yi G, Zhu X (2019) Astrocytic Epoxyeicosatrienoic Acid Signaling in the Medial Prefrontal Cortex Modulates Depressive-like Behaviors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 39:4606–4623.

Yamamoto J, Suh J, Takeuchi D, Tonegawa S (2014) Successful Execution of Working Memory Linked to Synchronized High-Frequency Gamma Oscillations. *Cell* 157:845–857.

Yamashita A, Hamada A, Suhara Y, Kawabe R, Yanase M, Kuzumaki N, Narita M, Matsui R, Okano H, Narita M (2014) Astrocytic activation in the anterior cingulate cortex is critical for sleep disorder under neuropathic pain. *Synapse* 68:235–247.

Yang L, Qi Y, Yang Y (2015) Astrocytes Control Food Intake by Inhibiting AGRP Neuron Activity via Adenosine A1 Receptors. *Cell Reports* 11:798–807.

Yizhar O (2012) Optogenetic Insights into Social Behavior Function. *Biological Psychiatry* 71:1075–1080.

Yizhar O, Fenno LE, Prigge M, Schneider F, Davidson TJ, O'Shea DJ, Sohal VS, Goshen I, Finkelstein J, Paz JT, Stehfest K, Fudim R, Ramakrishnan C, Huguenard JR, Hegemann P, Deisseroth K (2011a) Neocortical excitation/inhibition balance in information processing and social dysfunction. *Nature* 477:171–178.

Yizhar O, Fenno L, Davidson T, Mogri M, Deisseroth K (2011b) Optogenetics in Neural Systems. *Neuron* 71:9–34.

Zhang F, Gradinaru V, Adamantidis AR, Durand R, Airan RD, de Lecea L, Deisseroth K (2010) Optogenetic interrogation of neural circuits: technology for probing mammalian brain structures. *Nature Protocols* 5:439–456.

Zhang F, Vierock J, Yizhar O, Fenno LE, Tsunoda S, Kianianmomeni A, Prigge M, Berndt A, Cushman J, Polle J, Magnuson J, Hegemann P, Deisseroth K (2011) The Microbial Opsin Family of Optogenetic Tools. *Cell* 147:1446–1457.

Zhang Jm, Wang Hk, Ye Cq, Ge W, Chen Y, Jiang Zl, Wu Cp, Poo Mm, Duan S (2003a) ATP released by astrocytes mediates glutamatergic activity-dependent heterosynaptic suppression. *Neuron* 40:971–82.

Zhang LI, Tan AYY, Schreiner CE, Merzenich MM (2003b) Topography and synaptic shaping of direction selectivity in primary auditory cortex. *Nature* 424:201–205.

Zhang Y, Barres BA (2010) Astrocyte heterogeneity: an underappreciated topic in neurobiology. *Current Opinion in Neurobiology* 20:588–594.

Zhang Y, Sloan S, Clarke L, Caneda C, Plaza C, Blumenthal P, Vogel H, Steinberg G, Edwards M, Li G, Duncan J, Cheshier S, Shuer L, Chang E, Grant G, Gephart M, Barres B (2016) Purification and Characterization of Progenitor and Mature Human Astrocytes Reveals Transcriptional and Functional Differences with Mouse. *Neuron* 89:37–53.

Zorec R, Araque A, Carmignoto G, Haydon PG, Verkhratsky A, Parpura V (2012) Astroglial Excitability and Gliotransmission: An Appraisal of Ca ²⁺as a Signalling Route. *ASN Neuro* 4:AN20110061.

Zur Nieden R, Deitmer JW (2006) The Role of Metabotropic Glutamate Receptors for the Generation of Calcium Oscillations in Rat Hippocampal Astrocytes In Situ. *Cerebral Cortex* 16:676–687.

A | Publicaciones

A.0.1. Melanopsin for precise optogenetic activation of astrocyte-neuron networks

Received: 10 September 2018 | Revised: 28 November 2018 | Accepted: 30 November 2018
DOI: 10.1002/glia.23580

GLIA
WILEY

RESEARCH ARTICLE

Melanopsin for precise optogenetic activation of astrocyte-neuron networks

Sara Mederos[1] | Alicia Hernández-Vivanco[1] | Jorge Ramírez-Franco[1] | Mario Martín-Fernández[2] | Marta Navarrete[3] | Aimei Yang[4] | Edward S. Boyden[4,5] | Gertrudis Perea[1]

[1]Department of Functional and Systems Neurobiology, Instituto Cajal, CSIC, Madrid, Spain

[2]Department of Neuroscience, University of Minnesota, Minneapolis, Minnesota

[3]Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM), Madrid, Spain

[4]Media Lab, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Massachusetts

[5]McGovern Institute, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Massachusetts

Correspondence
Dr. Gertrudis Perea, Instituto Cajal, CSIC, Avda. Doctor Arce, 37, Madrid 28002, Spain.
Email: gperea@cajal.csic.es

Funding information
Ministerio de Economía y Competitividad, Grant/Award Number: BES-2014-067594BFU2013-47265RBFU2016-75107-PIntramural 201620I017

Abstract

Optogenetics has been widely expanded to enhance or suppress neuronal activity and it has been recently applied to glial cells. Here, we have used a new approach based on selective expression of melanopsin, a G-protein-coupled photopigment, in astrocytes to trigger Ca^{2+} signaling. Using the genetically encoded Ca^{2+} indicator GCaMP6f and two-photon imaging, we show that melanopsin is both competent to stimulate robust IP3-dependent Ca^{2+} signals in astrocyte fine processes, and to evoke an ATP/Adenosine-dependent transient boost of hippocampal excitatory synaptic transmission. Additionally, under low-frequency light stimulation conditions, melanopsin-transfected astrocytes can trigger long-term synaptic changes. In vivo, melanopsin-astrocyte activation enhances episodic-like memory, suggesting melanopsin as an optical tool that could recapitulate the wide range of regulatory actions of astrocytes on neuronal networks in behaving animals. These results describe a novel approach using melanopsin as a precise trigger for astrocytes that mimics their endogenous G-protein signaling pathways, and present melanopsin as a valuable optical tool for neuron–glia studies.

Main points: Melanopsin, a mammalian G-protein-coupled photopigment, engages endogenous the IP3 pathway and intracellular Ca^{2+} signaling in astrocytes.

By releasing ATP/Ado, melanopsin-astrocytes differently impact synaptic plasticity enhance cognitive functions.

KEYWORDS

astrocytes, optogenetics, melanopsin, neuron–glia interactions, synaptic plasticity

1 | INTRODUCTION

The outbreak practice of optical tools to enhance or suppress neuronal activity and to decipher the organization of brain circuits and their behavioral outputs has transformed Neuroscience (Bernstein & Boyden, 2011). Some recent studies have applied these approaches to glial cells, particularly to astrocytes, to unmask the consequences of astrocyte signaling on particular brain functions. Photostimulation with channelrhodopsin-2 (ChR2; Gourine et al., 2010; Masamoto et al., 2015; Pelluru, Konadhode, Bhat, & Shiromani, 2016; Perea, Yang, Boyden, & Sur, 2014; Sasaki et al., 2012; Yamashita et al., 2014), a nonspecific cation channel, and Archaerhodopsin (Arch; Letellier et al., 2016; Poskanzer & Yuste, 2016), a light-driven proton pump, have being frequently used to manipulate intracellular Ca^{2+} signals in astrocytes and determine their role in specific brain functions. However, whether the intracellular astrocyte Ca^{2+} signaling triggered by these opsins recapitulates physiologically Ca^{2+} signaling, which is mostly mediated by G-protein coupled receptor (GPCR) activation, is under debate (Xie, Petravicz, & McCarthy, 2015). Alternatively, the engineered G-protein coupled receptors activated by inert drug-like small molecules (DREADDs) have been also applied for astrocyte-neuron studies revealing the impact of astrocyte signaling in food intake (Chen et al., 2016; Yang, Qi, & Yang, 2015), fear responses (Martin-Fernandez et al., 2017), memory recall (Adamsky et al., 2018),

Sara Mederos and Alicia Hernández-Vivanco contributed equally to this work.

 © 2018 Wiley Periodicals, Inc.

and autonomic nervous system responses (Agulhon et al., 2013) (for a review see [Bang, Kim, & Lee, 2016]). However, those effects rely on a sustained activation of DREADDs by its exogenous ligand, misplacing the temporal features of astrocyte signaling engaged by neuronal activity. Therefore, refined and reliable approaches involving endogenous astrocyte Ca^{2+} signaling in a time-controlled manner are still required.

In order to expand the available tools allowing a fast control of astrocyte signaling, we focused on melanopsin, a G-protein-coupled photopigment expressed by a small subset of mammalian retinal ganglion cells, with an absorption peak around 470–480 nm (Hatori & Panda, 2010; Hattar, Liao, Takao, Berson, & Yau, 2002; Sexton, Buhr, & Van Gelder, 2012). In contrast to the algae-derived opsins[20], melanopsin couples to $G\alpha_{q\text{-}11}$ to activate PLCβ, leading to the IP3 signaling and the elevation of intracellular Ca^{2+} levels (Panda et al., 2005). The similarities of melanopsin with other $G\alpha_{q\text{-}11}$-coupled GPCRs for neurotransmitters, including α1-adrenergic, cholinergic M1 and mGluR group 1 receptors, make it an appropriate optical tool for astrocytes. We designed a new construct fusing *gfap* promoter with melanopsin (*Opn4*-human melanospin) using viral strategy to target astrocytes and evaluate whether melanopsin was competent to both stimulate Ca^{2+} activity in astrocytes, measured by the expression of genetically encoded Ca^{2+} indicators (GCaMP6f), and to induce astrocyte-to-neuron signaling. Our results reveal that blue light-evoked substantial Ca^{2+} responses at small regions of astrocyte processes and short-term EPSCs changes in CA1 hippocampal neurons. We found that melanopsin engaged endogenous G-protein and IP3 signaling pathways in astrocytes and could stimulate the release of ATP/Adenosine, which mediated the synaptic enhancement; and glutamate, responsible of the NMDA-dependent slow inward currents in CA1 neurons. In contrast to melanopsin, astrocyte Ca^{2+} signals induced by ChR2 stimulation were noticed after longer light pulses, which resulted in sustained synaptic modifications. Low-frequency stimulation of melanopsin-expressing astrocytes triggered long-term synaptic plasticity (LTP). Finally, to evaluate the impact of astrocyte signaling in cognitive performance, in vivo activation of melanopsin-astrocytes was performed. Our data indicated that melanopsin-transfected mice showed an enhanced ability to discriminate object location, suggesting an improved memory performance. These data show that astrocytes could modulate their functional impact on neuronal networks depending on different patterns of synaptic activity, which can be mimicked by melanopsin stimulation. Overall, this study describes melanopsin as previously unidentified tool for optical activation of astrocytes, which is revealed as a meaningful G-protein signaling mechanism and a valuable approach for in vivo neuron–glia studies.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Mice

All the procedures for handling and sacrificing animals followed the European Commission guidelines for the welfare of experimental animals (2010/63/EU). Animals of both genders were used, and were housed in standard laboratory cages with ad libitum access to food and water, under a 12:12 hr dark–light cycle in temperature-controlled rooms. C57BL/6 wild-type mice and *Ip3r2*$^{-/-}$ (RRID: MGI:3640970) mice were used. *Ip3r2*$^{-/-}$ mice were generously donated by Dr. J. Chen (University of California San Diego, CA; X. Li, Zima, Sheikh, Blatter, & Chen, 2005).

2.2 | Viral injection

The following constructs were used: ChR2 (AAV2/5-GFAP104-ChR2-mCherry; UNC Vector Core; viral titer 3.9×10^{12}), GCaMP6f (AAV2/5-Gfap-Lck-GCaMP6f; PENN Vector Core; viral titer 6.4×10^{13}), vector (AAV2/5-Gfap-mCherry; UNC Vector Core; viral titer 3.9×10^{12}). Melanopsin (*Opn4*-human melanopsin, AAI13559.1) was fused to mCherry and cloned into AAV particles (serotype 5; UNC Vector Core) using the GFAP promoter short version GFAP104 (AAV2/5-GFAP104-melanopsin-mCherry; viral titer 2.8×10^{12}). Neonatal wild-type and *Ip3r2*$^{-/-}$ mice (P5-8) were anesthetized with isoflurane 2% in oxygen and place in a custom adapted stereotaxic apparatus. The target coordinates were displaced from Bregma by 2 mm posterior, 1.4 mm lateral and 1.2–1.4 mm dorsoventral. A volume of 0.3 μL of the virus at 30 nL/min was injected. After injection, the pipette was held in place for 5 min prior to retraction to prevent leakage and then removed and skin sutured. The animal was allowed to recover from anesthesia with the help of heating pads and was returned to the cage once it showed regular breathing and locomotion. The overall duration of this procedure was kept under 20 min so as to maximize the survival rate of the pups. For a subset of experiments cytoGCaMP6f (AAV2/5-Gfap-cyto-GCaMP6f; PENN Vector Core; viral titer 6.13×10^{13}) was transfected in hippocampal astrocytes. After 2 weeks of viral injection, specific astrocytes expression of constructs was confirmed by immunostaining (Figure 1b and Supporting Information Figures S1 and S2). In core regions of transfection, GFAP staining and mCherry expression colocalized in astrocytes, while no colocalization was observed in NeuN labeled neurons. For Ca^{2+} imaging experiments, lck-GCaMP6f or cytoGCaMP6f was co-injected with melanopsin, ChR2 or vector (1:1 ratio).

2.3 | Hippocampal slice preparation

Imaging and electrophysiological experiments were performed on hippocampal slices from P20–P30 mice. The brain was rapidly removed and placed in ice-cold artificial cerebrospinal fluid (ACSF). Slices (350 μm) obtained with a vibratome (Leica Vibratome VT1200S, Germany) were incubated during >1 hr at room temperature (22–24°C) in ACSF containing [in mM]: NaCl 124, KCl 2.69, KH_2PO_4 1.25, $MgSO_4$ 2, $NaHCO_3$ 26, $CaCl_2$ 2, and glucose 10, and was gassed with 95% O_2/5% CO_2 (pH = 7.3). Slices were then transferred to an immersion recording chamber and perfused with gassed ACSF. Cells were visualized with an Olympus BX50WI or Nikon Eclipse FN1 microscope coupled with a 40× water immersion lens and infrared-DIC optics.

2.4 | Electrophysiology

Two weeks after viral injection, electrophysiological recordings from CA1 pyramidal neurons and astrocytes were made using the whole-cell configuration of the patch-clamp technique. Patch electrodes had

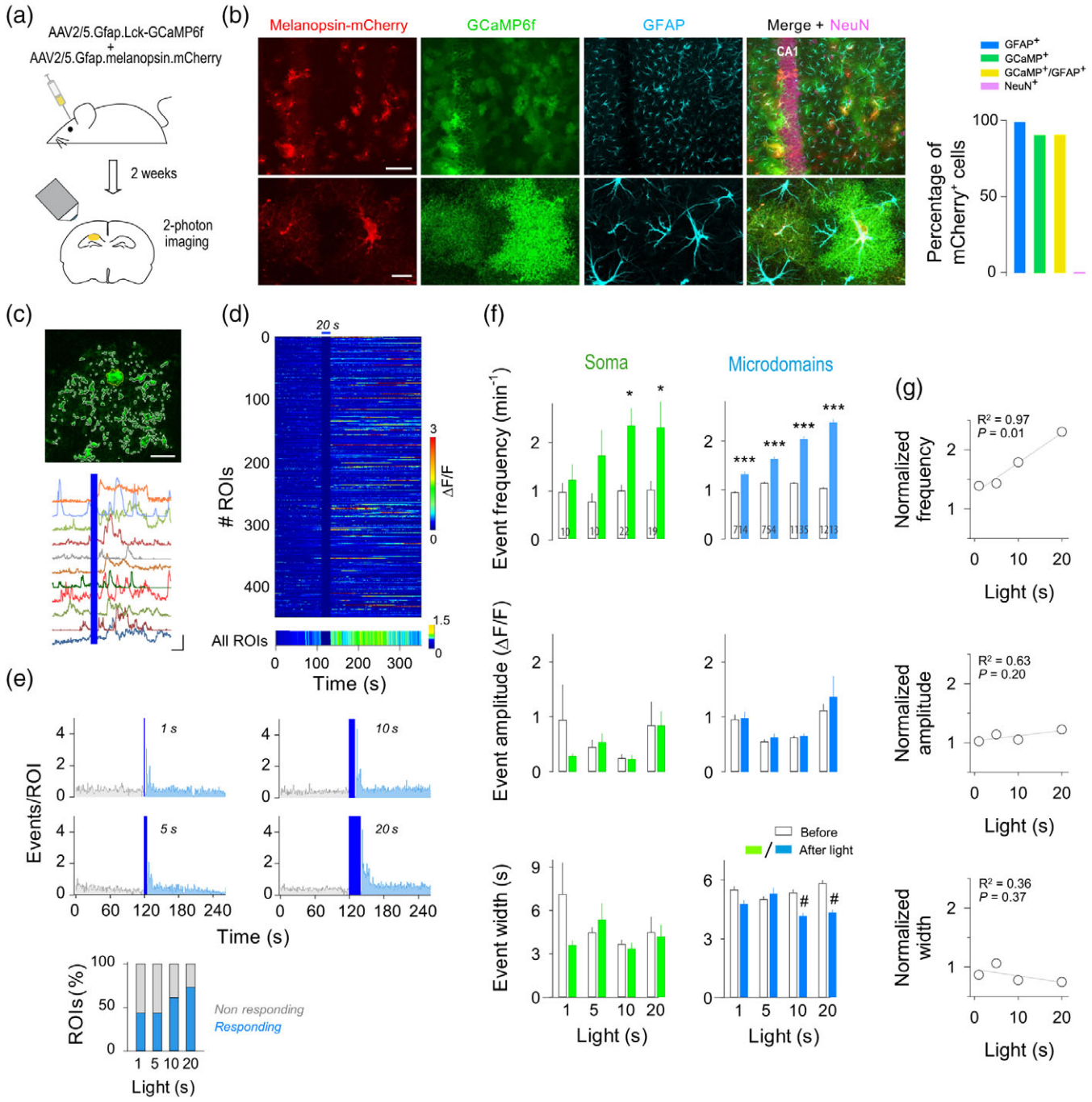


FIGURE 1 Selective expression of melanopsin in astrocytes stimulates Ca^{2+} signaling. (a) Scheme of the experimental approach. *Top*, viral transfection of AAV2/5-Gfap-Lck.GCaMP6f and AAV2/5-Gfap-melanopsin-mCherry in hippocampus. *Bottom:* hippocampal slice under two-photon imaging after 2 weeks of transfection. (b) *Top*: Immunocytochemical localization of melanopsin-mCherry, GCaMP6f, and GFAP in hippocampal slices; *bottom*: a detailed image of labeled astrocytes. *Merge* includes NeuN labeling (pink). Scale bar, 50 μm; inset, 10 μm. *Right*: percentage of GFAP (98.72 ± 0.88%), GCaMP6f (90.42 ± 3.23%) and NeuN-positive cells (0%) out of mCherry positive cells (n = 138; 12 fields of view; two mice), showing the selective expression of mCherry reporter for melanopsin in astrocytes. (c) *Top*: image of GCaMP6f-melanopsin astrocyte (top) and selected microdomains identified by GECIquant on ImageJ mask generator (bottom). *Bottom*: representative intensity Ca^{2+} signals versus time evoked by melanopsin light stimulation (20 s; blue bar). Scale bar = 15 μm; 3 $\Delta F/F$, 50 s. (d) Representative raster plot of ROIs activity, color coded according to fluorescence change (top, n = 450), and average microdomain population activity versus time before and after 20 s light (bottom, n = 1,213). (e) *Top*: histogram of ROIs event frequency versus time for each condition (1 s, n = 714; 5 s, n = 757; 10 s, n = 1,135; 20 s, n = 1,213; 41 slices from nine mice). *Bottom*, percentage of ROIs showing an event during the first 20 s after light stimulation (Responding ROI) (1 s n = 313; 5 s n = 331; 10 s n = 697; 20 s n = 891). (f) *Left*: analysis of somatic Ca^{2+} fluctuation properties, measured in Lck-GCaMP6f, showing mean responses for event frequency, amplitude and width (1 s: n = 10; 5 s: n = 10; 10 s: n = 22; 20 s: n = 19; 41 slices from nine mice). Resting versus light 10 s, p = 0.034; 20 s, p = 0.043; two-way ANOVA analysis, post hoc comparison with Tukey–Kramer test. *Right*: analysis of microdomain Ca^{2+} event properties (1 s, n = 714 out of 877 (81.42%); 5 s, n = 757 out 939 (80.62%); 10 s, n = 1,135 out of 1,326 (85.60%); 20 s, n = 1,213 out of 1,333 (90.99%); 41 slices from nine mice). *p < 0.05, ** p < 0.01, ***, # p < 0.001; two-way ANOVA, post hoc comparison with Tukey–Kramer test. (g) Normalized changes in frequency, amplitude and width of microdomain events to resting conditions. Linear fitting between different stimuli conditions, R^2 is shown for each graph. Data are shown as mean ± *SEM*

resistances of 3–5 MΩ when filled with the internal solution that contained for neurons (in mM): KGluconate 135, KCl 10, HEPES 10, $MgCl_2$ 1, ATP-Na_2 2, titrated with KOH to pH 7.3; and for astrocytes (in mM): potassium methanesulfonate 100, KCl 50, HEPES-K 10, ATP-Na_2 2 (pH = 7.3 adjusted with KOH; osmolality 280–290 mOsm/L). Recordings were obtained with PC-ONE amplifier (Dagan Corporation, Minneapolis, MN). Series and input resistances were monitored throughout the experiment using a −5 mV pulse. Mean input resistance was 3.90 ± 0.26 MΩ and mean amplitude of background noise was 0.27 ± 0.09 pA (peak to peak mean amplitude of 4.47 ± 0.79 pA from a representative sample of 15 recorded cells). Recordings were rejected when the access resistance increased >20% during the experiment. Signals were fed to a Pentium-based PC through a DigiData 1,440 interface board (Molecular Devices, San Jose, CA). The pCLAMP 10.2 software (Molecular Devices) was used for data display, acquisition, and storage. Experiments were performed at room temperature (21–24°C). Cells were voltage-clamped at −70 mV. ACSF included picrotoxin (50 μM) and CGP 55845 (5 μM) for EPSC recordings, and TTX (1 μM) for mEPSCs. Synaptic stimulation was achieved using theta capillaries (2–5 μm tip diameter) filled with ACSF, and placed in the *stratum radiatum* to stimulate Schaffer collateral fibers. Paired pulses (250 μs duration; 75 ms interval) were delivered at 0.33 Hz by stimulator S-900 (Dagan Corporation). Baseline of synaptic activity was measured 3–5 min before astrocyte stimulation. Neurons showing *z*-score > 2 standard deviation (*SD*) of baseline EPSC amplitude (pA) during the first 5 min after stimulation were considered responding to light (Figures 2a, 3e, 5c, and 7d). To estimate the EPSC variance modifications after light stimuli, neurons that showed *z*-score > 2 were selected for the analysis of the noise-free coefficient of variation (CV_{NF}) of synaptic responses for the case of melanopsin or ChR2 transfected slices (1, 10, and 30 min after stimulus, as indicated in the figures). $CV_{NF} = \sqrt{(SD\ EPSC^2 - SD\ noise^2)}/m$; SD $EPSC^2$ and SD $noise^2$ are the variance of the peak EPSC and baseline, respectively, and *m* is the mean EPSC peak amplitude. The ratio of CV was obtained for each neuron in control and light conditions as CV_{NF} after light/CV_{NF} control (Fernandez de Sevilla, Cabezas, de Prada, Sanchez-Jimenez, & Buno, 2002). Plots comparing variation in Normalized EPSC amplitude (mean peak amplitude after light stimulus/mean peak amplitude in control conditions) against (CV^{-2}) in each cell were represented. CV_{NF} is commonly used to detect changes in presynaptic transmitter release (Faber & Korn, 1991). For the case of vector-transfected astrocytes, nontransfected astrocytes and *Ip3r2*$^{-/-}$ mice CV_{NF} was analyzed for all the recorded neurons. Changes in the holding current after light stimulation were monitored by analyzing the Holding current index: [holding current (*i*) - holding current (baseline)]/ absolute value [holding current (*i*) + holding current (baseline)]. *i* = holding current values at different time after light stimulus. Experiments designed to optimize NMDAR activation and recording slow inward currents (SIC) were done in a modified Mg^{2+}-free ACSF (Mg^{2+} was equimolarly substituted by Ca^{2+}) plus TTX (1 μM). Drugs were bath applied (for indicated experiments drugs were applied for at least 15 min before recordings). Slow inward currents both spontaneous and opsin-induced were discriminated from standard miniature EPSCs (mEPSCs) based on their time courses, that is, rise and decay time (Figure 6c; cf. [Perea & Araque, 2005; Shigetomi, Bowser, Sofroniew, & Khakh, 2008]). One neuron per slice and 4–5 slices per mouse were recorded. Control experiments were performed in hippocampal slices transfected with viral vector (AAV2/5-GFAP-mCherry) or nontransfected slices stimulated with light. For astrocyte network loading, the holding potential was −70 mV. Intracellular solution containing GDPβS (20 mM), Evans Blue (5 μM), BAPTA (40 mM) and biocytin (0.1%) was used for astrocyte filling for 20–30 min ([in mM]: BAPTA-K_4 40, NaCl, 8, $MgCl_2$ 1, HEPES 10, GTP-tris salt 0.4, ATP-Na_2 2; pH = 7.3, with KOH). Slices were then fixed and biocytin was revealed by Alexa488-Streptavidin (Figure 4a), showing the wide area covered by the intracellular biocytin-loading, and confirming the broad downregulation of Ca^{2+} signals by BAPTA intracellular filling astrocytes (*cf.* Navarrete et al., 2012; Serrano, Haddjeri, Lacaille, & Robitaille, 2006).

2.5 | Calcium imaging

Microinjection of AAV2/5 in vivo resulted in reliable, high, and mosaic expression of membrane-tethered Lck-GCaMP6f within astrocytes throughout the hippocampus (Figure 1(b), cf.[Shigetomi et al., 2013]). Lck-GCaMP6f revealed the highly branched nature of astrocytes, labeling fine processes, termed microdomains, but less efficacy for proximal processes and cell soma, being revealed in a limited number of cells (*cf.* Haustein et al., 2014; Poskanzer & Yuste, 2016). Hence, in this study, the analysis of Ca^{2+} events in Lck-GCaMP6f astrocytes was mainly focused at microdomain levels (identified as functional microdomains; Agarwal et al., 2017; Mariotti et al., 2018; Srinivasan et al., 2015), including proximal processes when applicable. Imaging of Lck-GCaMP6f-astrocytes was performed with a two-photon laser scanning microscope (AxioImager M, LSM510, Zeiss Oberkochen, Germany) equipped with a pulsed red laser tuned at 900 nm (1.80 W, 1% of power; Spectra Physics Mai-Tai, Prairie Technologies, Sioux Falls, SD) for excitation of Lck-GCaMP6f. mCherry signal was acquired in a confocal laser scanning mode at 543 nm with a HeNe laser. Imaging was performed through a water immersion lens 40×/1.0 W Plan-Apochromat (Zeiss), with a field of view between 354 × 354 μm (for colocalization image), and 295 × 295 μm for acquisition at 1 Hz frame rate. Astrocyte imaging sessions consisted of 250–420 frames. Full-field photostimulation consisted in 1, 5, 10, and 20 s light pulses and low-frequency stimulation (LFS; 5 s @ 0.06 Hz, 1 min; λ = 473 nm) delivered by an external laser. Minor drift in the XY plane of image stacks was post hoc corrected using TurboReg (ImageJ plugin). In a subset of experiments, cyto-GCaMP6f was used to monitor Ca^{2+} signals in proximal processes and soma of the astrocytes using the acquisition parameters indicated above. ACFS was perfused with TTX (1 μM) for calcium imaging. Astrocytes showing both mCherry and GCaMP6f positive labeling were selected for analysis, and regions of interest (ROI) were selected from the GCaMP6f image. Detection of ROIs was performed with ImageJ in a semi-automated manner using the GECIquant program (Srinivasan et al., 2015) coming as an open source plugin. The mean ROI area was 11.06 ± 0.024 μm^2 (from 1 to 122 μm^2; included proximal processes when applicable). We identify ROIs corresponding to the soma (> 30 μm^2), and to processes (between 1 and 122 μm^2). The resulting detection was visually checked in every case. Custom-written software in MATLAB

(MATLAB R2016; Mathworks, Natick, MA) was used for computation of fluorescence (F) of each ROI. All pixels within each ROI were averaged to give a single time course $F[t]$. To compare relative changes in fluorescence between different ROIs, Ca^{2+} signal was analyzed as $\Delta F/F_0 = (F(t) - F_0)/(F_0)$, from now on termed $\Delta F/F$. F_0 represented baseline fluorescence of each ROI and defined as the average minimum fluorescence across prestimulus frames. ROIs with no Ca^{2+} signal changes during the entire recording (signals above five times SD of baseline) were discarded (14.67% for melanopsin, 19.34% for ChR2, and 21.15% for vector-transfected astrocytes; $p = 0.701$; one-way ANOVA, post hoc comparison with Dunn's test). For the case of *Ip3r2*$^{-/-}$ melanopsin-astrocytes, 51.82% of ROIs did not show activity and were discarded (wt-astrocytes vs. *Ip3r2*$^{-/-}$ astrocytes, $p = 0.012$; one-way ANOVA, post hoc comparison with Dunn's test; *cf*. Agarwal et al., 2017; Srinivasan et al., 2015). A Ca^{2+} event was defined as a signal that showed maximum values above three times SD of mean values of prestimulus frames, and for those superimposed events, maximum values above two times SD of the previous steady signal. Events with duration <2 frames were excluded. For each ROI, four parameters were analyzed: the frequency of events, amplitude, width, and onset. Onset was defined as the last point in the ΔF/F time course below 1 *SD* before a significant peak occurred. Width value was measured as the half prominence of each peak. Values were averaged across all astrocytes. From the onset histogram of Ca^{2+} events (Figure 1e), the "responding" ROIs were defined as those that showed at least one Ca^{2+} event in the first 20 s after light stimulation. All the Ca^{2+} traces were visually inspected to exclude the ROIs dominated by noise. Given the heterogeneity found in the amplitude of Ca^{2+} events, group segmentation was done using k-means MATLAB code. Hence, amplitude values were clustered in three mutually exclusive clusters in an unbiased mode based on feature similarity. ROIs showing at least one event in the first 60 s after stimulus, termed "active" ROIs, were analyzed (72.96% for melanopsin, and 58.22% for ChR2-transfected astrocytes; Supporting Information Figures S3 and S9). Frames with light artifacts were removed from the analysis.

For a particular set of experiments, astrocyte Ca^{2+} responses were evaluated by local application of DHPG (1 mM, 5 s), an agonist of group I metabotropic glutamate receptors, before and after intracellular loading of with GDPβS (20 mM). Experiments were performed in the presence of TTX (1 μM) and PPADS (30 μM), a nonselective P2 purinergic antagonist.

2.6 | Optogenetic stimulation

Full-field photostimulation was achieved through a diode-pumped solid-state blue laser with analog intensity control (473 nm, MBL-III-473, OptoEngine, LLC, Midvale, UT) coupled via SMA terminal to a 200 μm fiber (ThorLabs, Newton, NJ). In some experiments, photostimulation through the light path of the microscope objective was performed. Blue light pulses (7 mW/mm^2) at 10 Hz (50 ms light pulses) or continuous stimulation at variable durations (1, 5, 10, and 20 s) were delivered for two-photon Ca^{2+} experiments. No differences were found by light train or continuous stimulation and data were pooled together. Synaptic responses were evaluated by continuous light stimulation (1, 3, 5, 10, 20, and 60 s at 7 mW/mm^2), and by 10 Hz (50 ms light pulses) for 60 s. ChR2, melanopsin, and vector-transfected astrocytes were stimulated using the same light intensity (7 mW/mm^2), only for a subset of experiments showing in Figure 2g and Supporting Information Figure S5d, light intensity was changed.

2.7 | Immunohistochemistry

C57BL/6 wild-type mice or *Ip3r2*$^{-/-}$ mice transfected with viral vectors and C57BL/6 naïve mice were euthanized with sodium pentobarbital and transcardially perfused with PBS followed by ice-cold 4% paraformaldehyde in PBS. Brains were removed and postfixed overnight (o/n) at 4°C in the same fixative solution. Coronal brain slices of 50 μm were obtained in a VT1000S vibratome (Leica), collected as floating sections, and blocked for 1.5 hr at room temperature (RT) in a solution containing 0.3% Triton X-100 and 5% NGS in PBS. After blocking, sections were incubated (o/n; 4°C) with the following primary antibodies in a solution containing 0.3% Triton X-100 and 1% NGS in PBS: mouse anti-GFAP (1:500, Sigma, St. Louis, MO, RRID: AB_477010); rabbit anti-NeuN (1:500, Millipore, RRID:AB_2571567); mouse anti-NeuN (1:500, Millipore, Burlington, MA, RRID: AB_2298772); rabbit anti-s100 (1:100, Abcam, Cambridge, UK; RRID: AB_306716); rabbit anti-Iba1 (1:500, Wako, Huntley, IL, RRID: AB_839504). After three washes of 15 min. Each in PBS containing 0.3% Triton X-100, the floating sections were incubated with the specific Alexa conjugated antibodies in a PBS solution containing 0.3% Triton X-100 and 1% NGS for 2 hr at RT. The following antibodies were used: Alexa Fluor 488 Goat anti-mouse (1:200, Bioss Inc., Woburn, MA, RRID:AB_10892893); Pacific Blue Goat anti-rabbit (1:200, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, RRID:AB_2539814); Alexa Fluor 647 Goat anti-rabbit (1:200, Thermo Fisher Scientific, RRID:AB_2535813); Alexa Fluor 488 Goat anti-rabbit (1:200, Thermo Fisher Scientific, RRID:AB_143165) and Alexa Fluor 405 Goat anti-rabbit (1:200, Thermo Fisher Scientific, RRID:AB_10680407). Before incubation with DAPI (1.5 μg/mL, Sigma-Aldrich) for 10 min, sections were washed (three times for 15 min each) in PBS containing 0.3% Triton X-100. Finally, sections were washed once in PBS and mounted in Vectashield antifading mounting medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA). In order to study the potential microgliosis due to light stimulation in acute slices, 350 μm sections were illuminated during 20 s with the diode-pumped solid-state blue laser (473 nm) or kept in the dark for an equivalent amount of time. Subsequently, sections were fixed with ice-cold 4% paraformaldehyde in PBS (15 min) and then blocked o/n at 4°C in a solution containing 0.5 Triton X-100 and 5% NGS. Afterward, sections were incubated (24 h; 4°C) with rabbit anti-Iba1 (1:500, Wako, RRID:AB_839504). After four washes of 15 min each in PBS containing 0.5% Triton X-100, sections were incubated with the secondary antibody Alexa Fluor 488 Goat anti-rabbit (1:200, Thermo Fisher Scientific, RRID: AB_143165). Sections were washed (three times of 15 min each), incubated with DAPI (1.5 μg/mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) for 10 min, and mounted in Vectashield antifading mounting medium (Vector Laboratories). Sections were then stored at 4°C, and images were acquired on a Leica SP5 (Leica, Wetzlar, Germany) laser scanning confocal microscope.

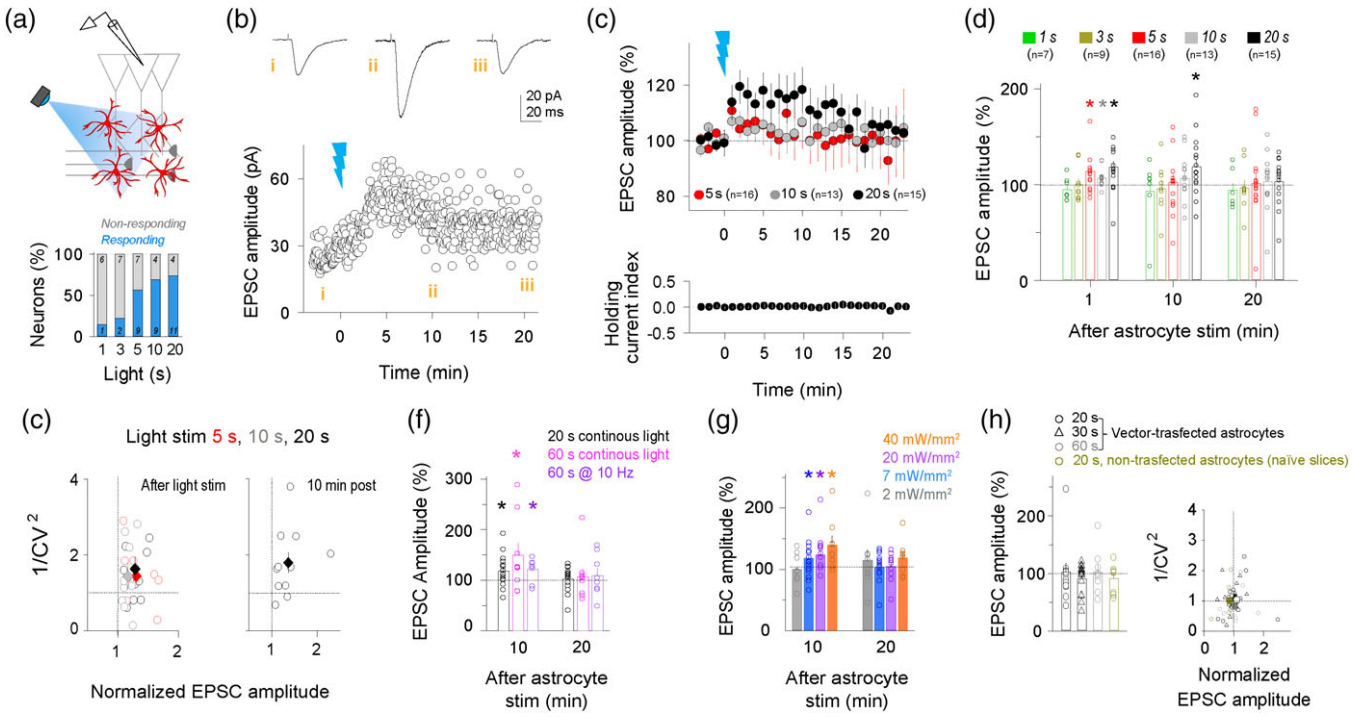


FIGURE 2 Light activation of melanopsin-transfected astrocytes induces enhancement of excitatory synaptic transmission in CA1 neurons. (a) *Top*: schematic drawing of the experimental design for synaptic recordings. *Bottom*: percentage of neurons showing synaptic changes after astrocyte light stimulation in blue. (b) Excitatory synaptic currents (EPSCs) before (i) and after (ii, iii), and a representative recording from CA1 neuron showing its EPSC amplitudes over time by 20 s of astrocyte light activation. Zero time indicates light pulse onset and astrocyte activation (blue beam denotes light stimulation). (c) *Top*: average of relative EPSC amplitude over time before and after astrocyte stimulation at different pulse durations. Zero time indicates light pulse (blue beam; 5 s, n = 16 neurons; 10 s, n = 13 neurons; 20 s, n = 15 neurons). *Bottom*: neuronal holding current index over time by 20 s of astrocyte photostimulation (n = 15 neurons). (d) Average of relative EPSC amplitude by light stimulation (1–20 s) at different time points of all recorded neurons. Values recorded at 10 min after 1 s (mean: 92.82%; SD: 36.36%; SEM: 13.74%; n = 7), 3 s (mean: 95.74%; SD: 26.26%; SEM: 8.75%; n = 9), 5 s (mean: 102.45%; SD: 31.83%; SEM: 7.96%; n = 16), 10 s (mean: 106.55%; SD: 23.79%; SEM: 6.59%; n = 13) and 20 s (mean: 118.52%; SD: 32.42%; SEM: 8.37%; n = 15); 5 s: 1 min (p = 0.013); 10 s: 1 min (p = 0.021); 20 s: 1 min (p = 0.020), 10 min (p = 0.044); paired t test. (e) Relative changes of the coefficient of variation (CV) after 1 min (5 s, n = 9; 10 s, n = 9; 20 s, n = 11) and 10 min of astrocyte stimulation (20 s, n = 11). (f) Relative changes of EPSC amplitude evoked by 20 s and longer pulses: continuous light stimulation for 60 s (n = 9; 10 min, p = 0.020), and 10 Hz for 60 s (n = 8; 10 min, p = 0.039). Note that longer pulses did not induce long-term synaptic changes, and no differences were found between 20 s versus longer light pulses. p = 0.515; one-way ANOVA, post hoc comparison with Dunn's test. *p < 0.05. (g) Quantification of the EPSC amplitude changes induced by 20 s light pulses at different intensities recorded at 10 and 20 min after stimuli (10 min: 2 mW/mm^2, n = 8, p = 0.912; 7 mW/mm^2, n = 15, p = 0.044; 20 mW/mm^2, n = 8, p = 0.035; 40 mW/mm^2, n = 9, p = 0.020; paired t test). Note that no significant differences were found for synaptic potentiation evoked from 7 mW/mm^2 to 40 mW/mm^2 (p = 0.354; one-way ANOVA, post hoc comparison with Dunn's test). *p < 0.05. (h) *Left*: relative changes of EPSC amplitude 10 min after light pulses induced by 20 s (n = 15), 30 s (n = 15), 60 s of light stimulation (n = 8) and nontransfected slices (n = 8 neurons). *Right*: Relative changes of the coefficient of variation (CV) measured at 10 min after of astrocyte stimulation. p > 0.05, paired t test. Data are shown as mean ± *SEM*

2.8 | Immunohistochemistry measurements and quantification

To study the colocalization of the mCherry reporter encoded in a viral vector with astrocytic and neuronal markers, both quantitative and qualitative measurements were carried out. Single optical sections (0.8 μm) obtained through a 63× 1.40 NA oil immersion objective were acquired, and the intensity correlation analysis (ICA) plugin of ImageJ was used for the quantitative colocalization analysis. Rolling ball background subtraction was applied before running the plugin, and the Pearson's correlation coefficient yielded by the software was considered for analysis. For qualitative colocalization analysis, *z*-stack images (10 μm thickness) obtained through a 40× 1.25NA oil immersion objective were collected for visual identification of mCherry positive astrocytes. Furthermore, s100 and NeuN were used as astrocytic and neuronal markers, respectively, in order to quantify the number of double-positive cells. To investigate the potential microgliosis elicited by light stimulation or viral transfection, Iba1 labeled sections were imaged. Maximal projections of z-stacks (10 μm thickness) obtained through a 40× 1.25NA oil immersion objective were made, and single Iba1$^+$ cells were unequivocally recognized by DAPI counterstaining. In order to examine the distribution of mCherry fluorescence along the astrocytic processes, we used single optical sections (0.8 μm) collected through a 63× 1.40 NA oil immersion objective. Line plots were drawn from perisomatic regions (defined by the outline of DAPI labeling) to the distal end of astrocytic processes. To quantify the fluorescence in somatic regions we employed the first

0.5 μm of each line plot. The region comprised between 10 and 20 μm was used to quantify the fluorescence in astrocytic processes. To estimate the fluorescence in astrocytic endfeet, we traced line plots along noticeable endfeet of astrocytic processes. For the analysis of mCherry expression levels yielded by the different AAV vectors, we used Maximal projections of z-stacks (8 μm thickness) obtained with a 63× 1.40 NA oil immersion objective (digital zoom = 2×). After thresholding the images, a binary mask was rendered. The mask was superimposed over background subtracted images and the fluorescence values were collected as mean gray values for different astrocytes transfected with each viral vector. Comparisons among the different treatments and conditions were made and the specific statistical test is indicated in figure legends. To study the potential astrogliosis induced by viral injections, GFAP labeled sections were imaged through a 40× 1.25NA oil immersion objective. Z-stack images (10 μm thickness) were thresholded and the binary mask was applied over the background subtracted images for quantifications.

2.9 | Behavioral experiments

Behavioral experiments were performed in the morning (before 3 p.m.). To evaluate cognitive performance without an intrinsic stress *Novel Object Location* (NOL) test was used. The memory test consisted of three phases: habituation, sample (acquisition), and test trials. Mice (6–8 weeks) were first habituated individually to an empty open-field box (L, W, H: 50 × 40 × 40 cm) for 30 min. Next day, a sample trial (object exposure) was performed consisting on placing the mouse into the box for 10 min. After a delay (retention period of 30 min), the mouse was back in the box for the test trial. Light protocol (LFS: 5 s light ON, 10 light OFF) was applied during 3 min during the sample trial. The test trial consisted of switching the location of one of the objects (novel location of the displaced object). A recognition index was calculated by dividing the total time spent exploring the displaced object by the total time exploring both objects during the test trial. The animals' behavior was scored by an observer blind to the treatment conditions.

2.10 | In vivo light protocol

To optogenetically activate astrocytes, blue light (473 nm) was bilaterally delivered through two 100 μm thick optic fibers ending in a ceramic ferrule (Thorlabs) that were implanted and attached to the patch cords. Light was delivered for 3 min (5 s light ON; 10 s light OFF cycles).

2.11 | Drugs and chemicals

D-(−)-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid (D-AP5), (S)-(+)-α-Amino-4-carboxy-2-methylbenzeneacetic acid (LY367385), MRS2179 tetrasodium salt (0900), Evans Blue tetrasodium salt (0845), SCH58261 (227010), (S)-3,5-dihydroxyphenylglycine (DHPG), and pyridoxal phosphate-6-azophenyl-2′,4′-disulfonic acid tetrasodium salt (PPADS; 0625) were purchased from Tocris Bioscience. Tetrodotoxin (TTX) was purchased from Alomone Labs (Jerusalem, Israel). GAP-26 was purchased from Apexbio (A1044). Light chain Tetanus toxin (TeTXLc) was purchased from List Biological Laboratories, Inc. (Campbell, CA). All other drugs, including Guanosine 5′-[β-thio]diphosphate (GDPβS trilithium salt; G7637), were purchased from Sigma-Aldrich.

2.12 | Statistical analysis

Data are expressed as the mean ± standard error of the mean (*SEM*). For Figures 2d, 3g, and 5h standard deviation (*SD*) was provided. Statistical analyses were performed using Sigmaplot 13.0 and MATLAB. Normality test was performed before applying statistical comparisons which were made using nonparametric Rank-sum test and parametric Student's *t* tests, one-way ANOVA or two-way ANOVA when appropriate, and followed by post hoc comparison with Tukey–Kramer or Dunn's tests as deemed appropriate. Two-tailed, unpaired or paired test was used for comparisons unless indicated. *p* value and test employed are reported in the text and/or figures legends. Statistical differences were established with $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), and $p < 0.001$ (***; #). Randomization was not employed. Sample size for whole-cell recording experiments was based on values previously found sufficient to detect significant changes in hippocampal synaptic strength in the past studies from the lab.

All relevant data or codes are available from the authors.

3 | RESULTS

3.1 | Melanopsin: A new optical tool to control astrocyte Ca^{2+} signaling

In order to investigate the ability of melanopsin to modulate astrocyte Ca^{2+} signaling, the gene for the opsin (*Opn4*-human melanopsin) was fused to the glial fibrillary acidic protein (*Gfap*) promoter and expressed in astrocytes following an adeno-associated virus (AAV)-based strategy (AAV2/5-Gfap-melanopsin-mCherry; Figure 1a and b). To monitor Ca^{2+} signals, the membrane-targeted genetically encoded Ca^{2+} indicator (GECI) Lck-GCaMP6f was selectively co-expressed with melanopsin in hippocampal astrocytes (Figure 1a–c; see Methods). Lck-GCaMP6f revealed the highly branched nature of astrocytes, labeling fine processes (Shigetomi et al., 2013), where the analysis of Ca^{2+} events was focused. Some key features of melanopsin transfection were analyzed (Supporting Information Figures S1 and S2), showing the specifically targeted expression in astrocytes, and the absence of measurable astrocyte reactivity caused by either viral transfection (Shigetomi et al., 2013) or melanopsin expression (Supporting Information Figure S1a,b). For Ca^{2+} imaging experiments, only astrocytes showing both mCherry-melanopsin and GCaMP6f labeling were considered for the analysis. After blue light (473 nm) stimulation, hippocampal astrocytes showed robust Ca^{2+} increases in fine processes and soma (Figure 1c–g). The analysis of Ca^{2+} signals indicated that light pulses of different durations (1, 5, 10, and 20 s) increased the frequency of Ca^{2+} events per region of interest (ROI) at the soma (Figure 1f) and microdomains (Figure 1c–e, g), without changing the amplitude of Ca^{2+} events in each ROI (Figure 1f–g). Additionally, the duration of Ca^{2+} events at microdomains was reduced after longer light stimuli (1 s: 4.76 ± 0.2 s; 20 s: 4.34 ± 0.12; $p < 0.001$;

Figure 1f). Considering the limited number of cells showing Lck-GCaMP6f expression at the soma (Haustein et al., 2014; Poskanzer & Yuste, 2016; Shigetomi et al., 2013), we focused on Ca^{2+} events at astrocytic branches. Although different light pulses evoked similar maximum response onset delay (~3 s after the end of stimulus; Figure 1e), we found that longer light stimuli increased the number of ROIs showing Ca^{2+} events (Figure 1e). In order to investigate the particular features of melanopsin-driven Ca^{2+} responses, we analyzed Ca^{2+} events occurring up to 60 s after light stimulus, based on the prestimulus amplitude values were classified in three groups (active ROIs, see Methods; Supporting Information Figure S3). ROIs with small Ca^{2+} event amplitude only showed further Ca^{2+} increases following 20 s light pulses, but they significantly increased their oscillation frequency at all tested light pulses. Additionally, a reduced Ca^{2+} event duration was observed by 10 and 20 s light pulses. Interestingly, ROIs with higher Ca^{2+} signals in resting conditions were insensitive to further increase in amplitude, and only longer light pulses evoked an increase in the event frequency related with a reduced duration of the events (Supporting Information Figure S3b). To confirm whether melanopsin could also stimulate Ca^{2+} signals at the soma levels, a subset of experiments was performed using cyto-GCaMP6f (AAV2/5-Gfap-cyto-GCaMP6f) that were co-transfected with melanopsin into astrocytes. A 20 s light stimulation evoked an increase in the frequency of somatic Ca^{2+} peaks, but no significant changes in the amplitude or duration of the Ca^{2+} events were found, similar to data found with Lck-GCaMP6f (Supporting Information Figure S3c).

Melanopsin activation was also monitored by whole-cell recordings from mCherry-expressing astrocytes showing weak outward currents in response to blue light (Supporting Information Figure S4a, b). It has been recently reported that melanopsin activates Ca^{2+}-dependent K^+ channels in cortical neurons (McGregor, Becamel, Marin, & Andrade, 2016). Consistent with these data, we found that light-induced astrocytic outward currents were reduced in presence of apamin (100 nM), a selective blocker of Ca^{2+}-dependent K^+ channels (Supporting Information Figure S4c). Altogether, these data show that the ectopic expression of melanopsin in hippocampal astrocytes was competent to trigger intracellular Ca^{2+} signals.

3.2 | Light activation of melanopsin-transfected astrocytes induces short-term potentiation of synaptic plasticity

Astrocyte activity has been found to influence synaptic physiology, including regulation of synaptic transmission and plasticity (Araque et al., 2014). Hence, we next investigated whether melanopsin-driven astrocyte Ca^{2+} signals had an impact on neuronal activity by recording excitatory postsynaptic currents (EPSCs) from pyramidal CA1 neurons (Figure 2a and b). Astrocyte Ca^{2+} signals were successfully induced at 1 s light stimulation (Figure 1g and Supporting Information Figure S3); however, no changes in synaptic transmission were found by short light pulses, that is, 1 and 3 s (Figure 2d). Only after ≥5 s light stimulation, a transient increase of synaptic strength was observed (Figure 2c and d). We found that longer light pulses (20 s) evoked transient EPSC potentiation that last over 10 min after astrocyte stimulation (118.52 ± 8.37% from baseline at 10 min after 20 s light stim; n = 15; p = 0.044; Figure 2b–d), without modifying the holding current (Figure 2c), discarding a depolarization of postsynaptic neuron. We further analyzed the synaptic locus of the short-term synaptic changes calculating the coefficient of variation (CV) of EPSCs, which measures the trial-to-trial variability of the synaptic responses (see Methods), and indicated presynaptic mechanisms underlying the melanopsin-driven short-term plasticity (Figure 2e). Accordingly, the miniature synaptic responses (mEPSCs) showed a transient increase in frequency, but no changes in mEPSC amplitude (Supporting Information Figure S5a and b). In addition, whole cell recordings in astrocytes were performed and the astrocytic glutamate transporter-dependent currents monitored (Devaraju, Sun, Myers, Lauderdale, & Fiacco, 2013), showing an increase in the amplitude of peak current after light stimulation (Supporting Information Figure S5c). Although a partial contribution of postsynaptic activity cannot be totally excluded given the reported actions of astrocyte signaling that increase the trafficking of AMPA receptors to the synapses (Boue-Grabot & Pankratov, 2017; Gordon et al., 2005; Lalo et al., 2014), our data suggest that glutamatergic synaptic transmission was mainly enhanced via presynaptic mechanisms after melanopsin-astrocyte stimulation.

To evaluate whether even longer light stimuli could further extend synaptic modulation, 60 s continuous light pulses and 10 Hz (50 ms light pulses) during 60 s were delivered to melanopsin-astrocytes. After those light protocols both the amplitude and duration of synaptic modulation were not further enhanced (Figure 2f). We next analyzed whether synaptic potentiation was tuned by different light intensities (range from 0.15 to 40 mW/mm^2). While the area of astrocytic melanopsin-evoked membrane currents displayed a linear increase with light intensity Supporting Information Figure S5d), the melanopsin-induced synaptic modulation was observed for intensities ≥7 mW/mm^2 (note that 7 mW/mm^2 were the reference intensity used in this study) (Figure 2g). Remarkably, no additional enhancement of EPSC potentiation was observed at higher intensities (7 mW/mm^2 vs. 40 mW/mm^2; p = 0.354; Figure 2g).

A reporter vector (AAV2/5-GFAP-mCherry) was expressed into astrocytes and analyzed. Light stimulation failed to induce both astrocyte Ca^{2+} transients and synaptic modulation in the reporter transfected animals (97.31 ± 11.64% from baseline after 20 s light stimulation; n = 15; p = 0.169), which excluded that viral transfection or blue light might per se contribute to the observed changes (Figure 2h, and Supporting Information Figure S6).

Nowadays ChR2 is the opsin commonly used for astrocyte activation (Gourine et al., 2010; Pelluru et al., 2016; Perea et al., 2014; Sasaki et al., 2012; Shen, Nikolic, Meunier, Pfrieger, & Audinat, 2017). Therefore, we analyzed the features and consequences of using ChR2 for astrocyte activation under similar light conditions applied to melanopsin. Analogous viral strategy was followed (AAV2/5-GFAP-ChR2-mCherry), and Ca^{2+} signals were monitored by selective expression of Lck-GCamp6f (Figure 3a). We found that light stimulation had a modest activation of Ca^{2+} signals at astrocytic processes (Figure 3b–d). The frequency of Ca^{2+} events per ROI was increased after 10 and 20 s light stimulation (Figure 3c; Supporting Information Figure S7a), but unchanged after short light pulses (1 and 5 s; Figure 3c). Additionally, no significant changes were found in the amplitude or width of the Ca^{2+} events at microdomains level (Supporting Information Figure S7b). In a

subset of experiments, somatic Ca^{2+} events were recorded by expression cyto-GCaMP6f in astrocytes, which showed a clear increase in their frequency, but no changes were found in the Ca^{2+} event amplitude (Supporting Information Figure S7c). Patch-clamp recordings showed that light stimulation evoked robust inward currents in transfected-astrocytes, confirming the functional expression of ChR2 (Lin, 2011; Supporting Information Figure S7d). Additionally, ChR2-astrocyte stimulation was competent to modulate synaptic transmission in CA1 neurons (Figure 3e, g). A brief transient synaptic boost was observed after 5 s light; however, higher and sustained synaptic modulation (at least 20 min post stim) was found by longer astrocyte stimuli (154.05 ± 12.99% from baseline for 20 s light pulse; $n = 13$; $p = 0.008$; Figure 3f, g), which showed presynaptic mechanisms of action (Supporting Information Figure S7f). The different sensitivity showed by melanopsin and ChR2 for Ca^{2+} signals were not due at least to diverse intensity patterns of reporter expression (Supporting Information Figure S7g, h), but it might be related to the capability of these opsins to engage intracellular Ca^{2+} signals. Indeed, melanopsin had a higher efficacy than ChR2 to stimulate Ca^{2+} signals both at the soma and microdomains, even at short pulses (Figure 3h, i). However, the impact on synaptic transmission by ChR2-astrocyte stimulation was present for longer periods (Figure 3j). Considering the weaker Ca^{2+} responses and the sustained synaptic changes evoked by ChR2-astrocytes, these data suggest a narrow window of ChR2 to precisely control astrocyte-to-neuron signaling.

3.3 | Melanopsin recruits astrocyte G-protein and Ca^{2+}-dependent pathways

Astrocyte neuromodulation by means of different substrates is based on Ca^{2+}-dependent and independent mechanisms (Bazargani & Attwell, 2016). In order to confirm the causal relationship between synaptic potentiation and melanopsin-induced astrocytic Ca^{2+}, the downregulation of Ca^{2+} signals was pursued. Based on the reported melanopsin G-protein activity (Panda et al., 2005), a competitive blocker of G-proteins GDPβS (20 mM) was intracellularly loaded into melanopsin-expressing astrocytes by the recording pipette and dialyzed into astrocyte network (Figure 4a). The efficacy of GDPβS action was confirmed by the absence of astrocyte Ca^{2+} responses to DHPG (1 mM), a selective agonist of group I metabotropic glutamate receptors (mGluRs; Supporting Information Figure S8). After 20–30 min of GDPβS-loading, light stimulation failed to induce synaptic enhancement (98.58 ± 9.20% from baseline; $n = 6$; $p = 0.820$; Figure 4b). Additionally, astrocyte Ca^{2+} was blocked by intracellular loading of the Ca^{2+} chelator BAPTA (40 mM) into the astrocyte syncytium. Under these conditions, astrocyte stimulation failed to evoke changes in EPSC strength (97.59 ± 9.99% from baseline; $n = 5$; $p = 0.885$; Figure 4b), confirming the contribution of the astrocyte G-protein and Ca^{2+}-dependent pathways to the observed synaptic potentiation.

To overcome limitations associated with pharmacological manipulations and considering that melanopsin activation induces Ca^{2+} release from IP3-sensitive intracellular stores in ganglion cells (Peinado, Osorno, Gomez Mdel, & Nasi, 2015), we evaluated melanopsin actions in the *Ip3r2*$^{-/-}$ mice (X. Li et al., 2005), which show a weakened Ca^{2+} signaling in astrocytes (Agarwal et al., 2017; Navarrete et al., 2012; Sherwood et al., 2017; Srinivasan et al., 2015). *Ip3r2*$^{-/-}$ mice were transfected with viral vectors containing melanopsin and Lck-GCaMP6f, and the spontaneous and light-evoked Ca^{2+} transients were evaluated (Figure 5a). In line with previous results (Agarwal et al., 2017; Haustein et al., 2014; Srinivasan et al., 2015), a downregulated Ca^{2+} signaling in resting conditions was observed in melanopsin-*Ip3r2*$^{-/-}$ astrocytes (Figure 5b–e). After light stimulation, melanopsin was unable to modify the Ca^{2+} event properties in the astrocyte processes at any light pulse tested (Figure 5c and d). To evaluate whether melanopsin could stimulate Ca^{2+} signals at the astrocyte soma, where IP3-sensitive stores play a major role, cyto-GCaMP6f was expressed in *Ip3r2*$^{-/-}$ astrocytes. However, light stimulation failed to evoke Ca^{2+} signals at the soma (Figure 5e), suggesting the specific IP3 signaling pathway engaged by melanopsin. Likewise, no EPSC changes were found after astrocyte stimulation (Figure 5f–i). Therefore, these data confirm that melanopsin-mediated synaptic enhancement was driven by the astrocytic boosting of intracellular IP3-dependent Ca^{2+} pathways.

3.4 | Melanopsin-evoked purinergic signaling triggers synaptic plasticity

We next evaluated the gliotransmitters and receptors involved in the synaptic responses evoked by melanopsin-astrocyte signaling. EPSC potentiation was present in the presence of LY367385 (100 μM), a selective blocker of mGluR1a subtype (Figure 6a and b; $n = 8$ neurons; $p = 0.046$), which has been related with astrocyte-evoked synaptic modulation in the hippocampus (Gomez-Gonzalo et al., 2015; Perea & Araque, 2007) and other brain areas (Martin, Bajo-Graneras, Moratalla, Perea, & Araque, 2015; Perea et al., 2014; Sasaki et al., 2012). Conversely, synaptic modulation was sensitive to purinergic signaling (Di Castro et al., 2011; Gourine et al., 2010; Lalo, Palygin, Verkhratsky, Grant, & Pankratov, 2016; Panatier et al., 2011; Pougnet et al., 2014; Tan et al., 2017), and was abolished by MRS2179 (10 μM; 96.40 ± 6.16% from baseline; $n = 12$ neurons; $p = 0.571$), the purinergic $P2Y_1$ receptor antagonist, SCH58261 (Figure 6a and b; 10 μM; 100.86 ± 10.51% from baseline; $n = 10$ neurons; $p = 0.695$), the adenosine $A2_A$ receptor antagonist, previously found to stimulate synaptic transmission; but synaptic enhancement was still present after blockage of P2X receptors with PPADS (Figure 6b; 10 μM; 143.57 ± 18.75% from baseline; $n = 10$ neurons; $p = 0.045$). Therefore, these data suggested that ATP/Adenosine (Ado) released by melanopsin-astrocytes were involved in the synaptic boost. On the other hand, the EPSC modulation evoked by ChR2-transfected astrocytes was abolished by LY 367385 ($n = 11$ neurons; $p = 0.899$) and MRS 2179 ($n = 8$ neurons; $p = 0.491$), but insensitive to the purinergic adenosine $A2_A$ receptor antagonist (Figure 6b; $n = 8$ neurons; $p = 0.013$). These results indicated that while melanopsin triggered a purinergic-mediated synaptic modulation, the ChR2-induced potentiation required the action of both glutamatergic and purinergic signaling. In order to confirm whether melanopsin might stimulate glutamate release, we analyzed the NMDA-dependent slow inward currents (SIC), which has been related to glutamate released from astrocytes (Perea & Araque, 2005; Shigetomi et al., 2008). Following melanopsin-astrocyte activation, CA1 neurons displayed a significant increase in

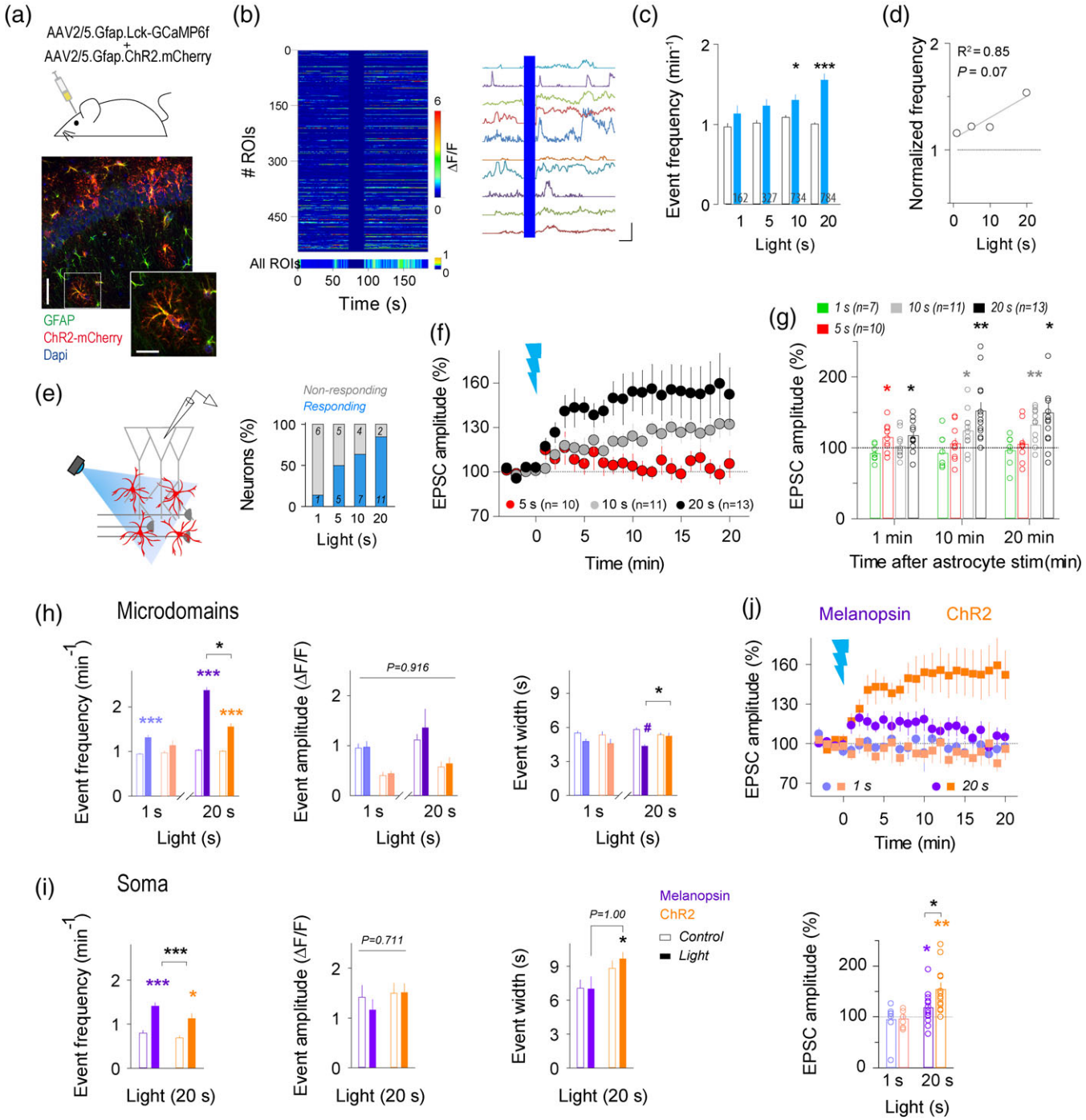


FIGURE 3 Selective ChR2 activation of hippocampal astrocytes stimulates Ca^{2+} signaling and synaptic changes. (a) *Top*: viral transfection of AAV2/5-Gfap-Lck.GCaMP6f and AAV2/5-Gfap-ChR2-mCherry in hippocampus. *Bottom*: immunocytochemical localization of ChR2-mCherry (red), GFAP (green), and DAPI nuclei (blue) in hippocampal slices. Inset of high magnification of representative astrocyte. Scale bar = 50 and 20 μm, respectively. (b) *Left*: representative raster plot of microdomain activity, color coded according to fluorescence change (top, n = 500), and average microdomain population activity versus time (bottom, n = 784). *Right*: representative intensity of Ca^{2+} signals versus time evoked by ChR2 light stimulation (20 s; blue bar). Scale bar = 1.5 $\Delta F/F$, 25 s. (c) Analysis of microdomain Ca^{2+} fluctuation properties showing mean responses for event frequency (1 s, n = 162 out of 237 (62.35%); 5 s, n = 327 out of 451 (72.50%); 10 s, n = 734 out of 851 (86.25%); 20 s, n = 784 out of 821 (95.49%); 25 slices from five mice). Resting versus light 10 s, p = 0.025; 20 s, p < 0.001. Two-way ANOVA analysis, post hoc comparison with Tukey–Kramer test; * p < 0.05; *** p < 0.001. (d) Normalized changes in frequency of microdomain events to resting conditions and linear fitting between different stimuli conditions. (e) Schematic drawing of experimental design for synaptic recordings and percentage of neurons showing synaptic changes after ChR2-astrocyte stimulation. (f) Average of relative changes of EPSC amplitude over time after astrocyte stimulation by different light conditions (1 s, n = 7; 5 s, n = 10; 10 s, n = 11; 20 s, n = 13). Zero time indicates light pulse (blue beam). (g) Relative changes of EPSC amplitude by ChR2 stimulation at different time points. Values recorded at 10 min after ChR2-light stim of 1 s (mean: 96.72%; SD: 24.21%; SEM: 9.15%; n = 7), 5 s (mean: 105.62%; SD: 24.53%; SEM: 7.76%; n = 10), 10 s (mean: 123.97%; SD: 28.09%; SEM: 8.47%; n = 11) and 20 s (mean: 151.95%; SD: 43.74%; SEM: 12.13%; n = 13). 5 s: 1 min (p = 0.039); 10 s: 10 min (p = 0.018), 20 min (p = 0.001); 20 s: 1 min (p = 0.012), 10 min (p = 0.001), 20 min (p = 0.008). *p < 0.05, **p < 0.01; paired t-test. (h) Analysis of Ca^{2+} fluctuation properties induced by

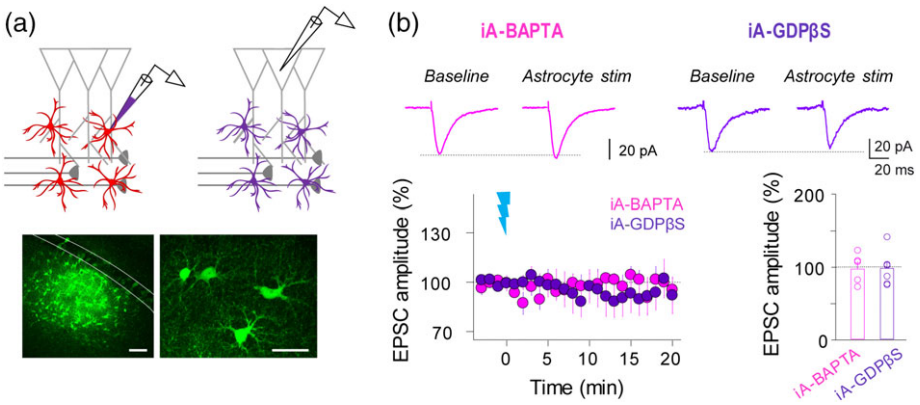


FIGURE 4 Melanopsin triggers G-protein-dependent Ca^{2+} signaling in astrocytes. (a) *Top*, schematic drawing of intracellular loading of astrocyte network with BAPTA or GDPβS by the recording pipette. *Bottom*, maximal projection confocal image of the astrocytic syncytium revealed by biocytin-loading via whole-cell astrocyte recording in the *stratum radiatum*, and high magnification of representative loaded astrocytes. Scale bar = 50 μm and 25 μm, respectively. (b) Representative EPSCs responses before and after 20 s of melanopsin-astrocyte stimulation in control and after astrocyte BAPTA or GDPβS-loading. Average of relative changes of EPSC amplitude over time (blue beam denotes 20 s light stimulation); and histograms of relative changes of EPSC amplitude recorded 10 min after astrocyte stimulation (BAPTA, 98.58 ± 9.20%; n = 5; p = 0.410; GDPβS, 97.59 ± 10.00%; n = 6; p = 0.443). p > 0.05; paired t-test. Data are shown as mean ± *SEM*

the SIC frequency (Figure 6c–e; 2.46 ± 0.77; n = 12; p = 0.007), indicating the ability of melanopsin to trigger the release of both transmitters glutamate and ATP/Adenosine.

Gliotransmission can be achieved by vesicular-dependent and independent mechanisms (Bazargani & Attwell, 2016), involving regulated exocytosis (Araque et al., 2014), and connexin/pannexin hemichannels (Bennett et al., 2012). Following the intracellular loading of astrocytes with Evans blue (5 μM), which blocks both the vesicular glutamate transporter (VGLUT) function (Eriksen et al., 2016; Goh et al., 2011; Sanchez-Mendoza et al., 2017), and the nucleotide transporters (VNUTs) that actively accumulate ATP into vesicles (Geisler et al., 2013; Oya et al., 2013; Sakamoto et al., 2014), light stimulation failed to induce astrocyte-mediated increase of SIC frequency (Figure 6e; 0.68 ± 0.31; n = 8; p = 0.677), as well as blocked the transient synaptic potentiation (Figure 6f, 99.96 ± 7.24%; n = 8 neurons; p = 0.996). Conversely, the blockage of connexin-hemichannels and gap junctions by bath application of the connexin 43 mimetic peptide Gap26 (100 μM; Karpuk, Burkovetskaya, Fritz, Angle, & Kielian, 2011; Roux et al., 2015) did not prevent both the increase of SIC frequency (Figure 6(e), 1.95 ± 0.52; n = 8; p = 0.016), and synaptic potentiation evoked by melanopsin-astrocyte stimulation (Figure 6f, 126.33 ± 14.73%; n = 8; p = 0.010). Additionally, the light chain of tetanus toxin (TeTxLC) that cleaves the vesicle-associated synaptobrevin-2 required for exocytosis was included into the astrocytic recording pipette, and synaptic responses were analyzed before and after light stimulation. The presence of TeTxLC (1 μM) into astrocytes blocked the melanopsin-induced synaptic potentiation in neighboring neurons (Figure 5f, 107.39 ± 30.09%; n = 8; p = 0.547). Altogether, these data support the contribution of vesicular-dependent pathways of gliotransmitter release (Henneberger, Papouin, Oliet, & Rusakov, 2010; Jourdain et al., 2007; Min & Nevian, 2012; Perea & Araque, 2007; Schwarz, Zhao, Kirchhoff, & Bruns, 2017) to the neuronal modulation triggered by melanopsin activation.

3.5 | Low-frequency light activation of melanopsin-astrocytes triggers hippocampal long-term plasticity and enhances memory performance in vivo

Astrocytes displayed low frequency spontaneous oscillatory activity that could be enhanced after melanopsin light activation (from 1.13 ± 0.024 in basal conditions to 1.78 ± 0.048 min^{-1} after 5 s light pulse; ~0.03 Hz; p < 0.001; Figure 1g). We then tested whether tuning astrocyte activity within this low-frequency range might engage different forms of Ca^{2+} signaling and synaptic plasticity. Astrocytes stimulated at low frequency (low-frequency stimulation protocol, LFS; 5 s light pulse @ 0.06 Hz, 1 min; Supporting Information Figure S9a and b) showed a robust enhancement of the Ca^{2+} signals located at the astrocytic microdomains (Figure 7a and b). Based on the prestimulus amplitude value of Ca^{2+} events (see Methods; Supporting Information Figure S9c), ROIs showed a systematic increase in the frequency

melanopsin (purple) and ChR2 (orange) in microdomains at 1 and 20 s light stimulation showing mean responses for event frequency, amplitude and width. Note that light stimulation of melanopsin at 1 s boosted the Ca^{2+} event frequency, while ChR2 failed to evoke changes; 20 s light pulse evoked higher mean frequency in melanopsin- than ChR2-transfected astrocytes (p = 0.021). Additionally, after 20 s light pulse melanopsin, but not ChR2, induced shorter Ca^{2+} events (p = 0.045). Two-way ANOVA, post hoc comparison with Tukey–Kramer test. (i) Somatic Ca^{2+} fluctuation properties of cyto-GCaMP6f-melanopsin (purple) and cyto-GCaMP6f-ChR2 (orange) expressing astrocytes induced by 20 s light pulse. Changes in event frequency were higher for melanopsin (p < 0.001) than ChR2-transfected (p = 0.01) astrocytes, while amplitude and width of Ca^{2+} events did not show differences (p = 0.711 and p = 1.00; respectively). Two-way ANOVA, post hoc comparison with Tukey–Kramer test. (j) *Top*: relative changes of EPSC amplitude over time by 1 and 20 s light stimulation of melanopsin-astrocytes and ChR2-astrocytes. Zero time indicates light pulse (blue beam). *Bottom*: mean values of EPSC amplitude at 10 min after light stimulation of melanopsin- and ChR2-astrocytes. Differences were found between 20 s light pulses. p = 0.014; unpaired t test. *p < 0.05; ***, #p < 0.001. Data are shown as mean ± *SEM*

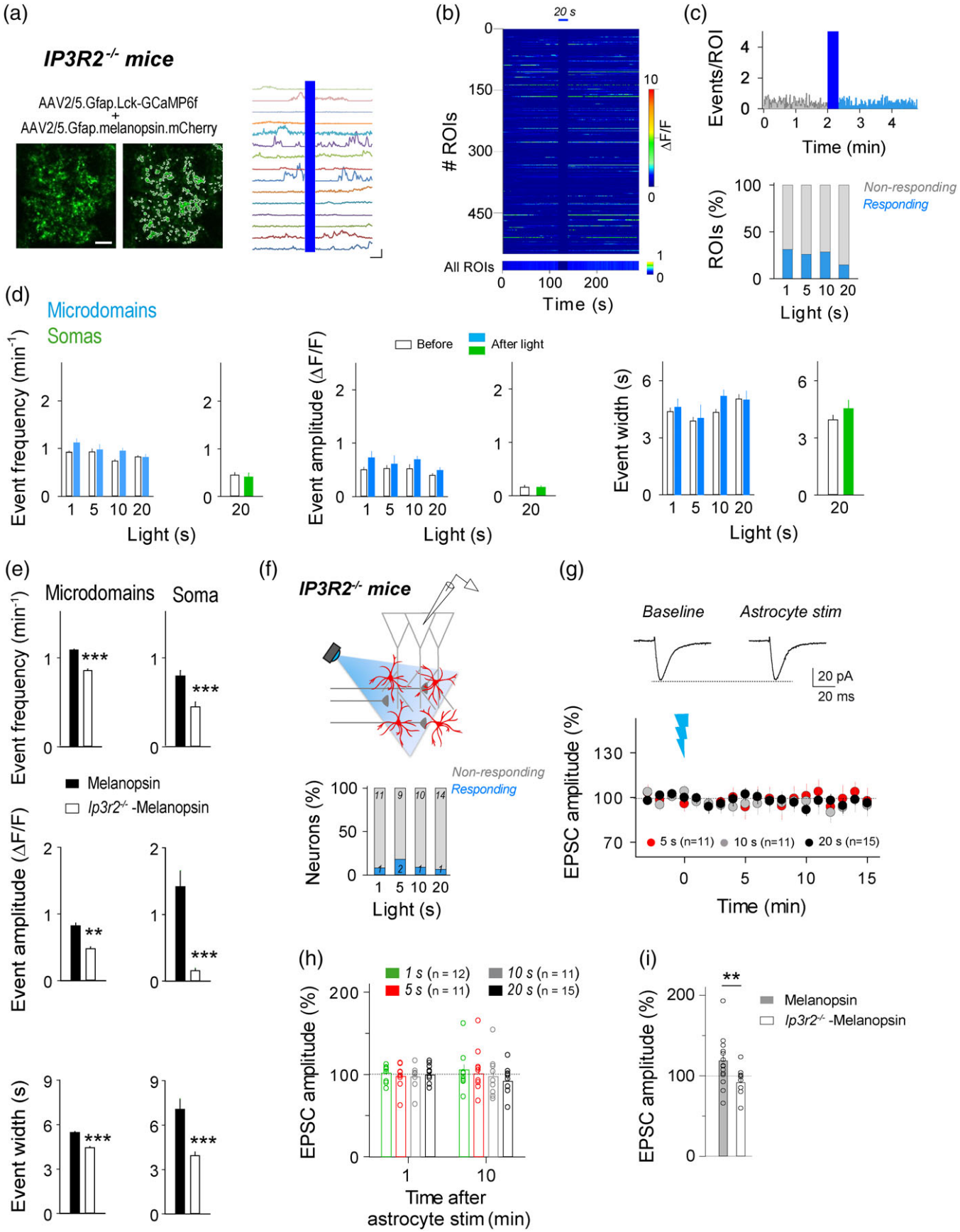


FIGURE 5 Melanopsin triggers IP3-dependent Ca^{2+} signals in astrocytes. (a) Image of an astrocyte from Gfap.Lck-GCaMP6f *Ip3r2*$^{-/-}$ mouse, and the same astrocyte showing the selected microdomains identified by GECIquant on ImageJ mask generator. *Right:* representative intensity Ca^{2+} signals versus time evoked by melanopsin light stimulation (20 s; blue bar) in *Ip3r2*$^{-/-}$ astrocytes. Scale bar, 10 μm; 3 Δ*F*/*F*, 25 s.

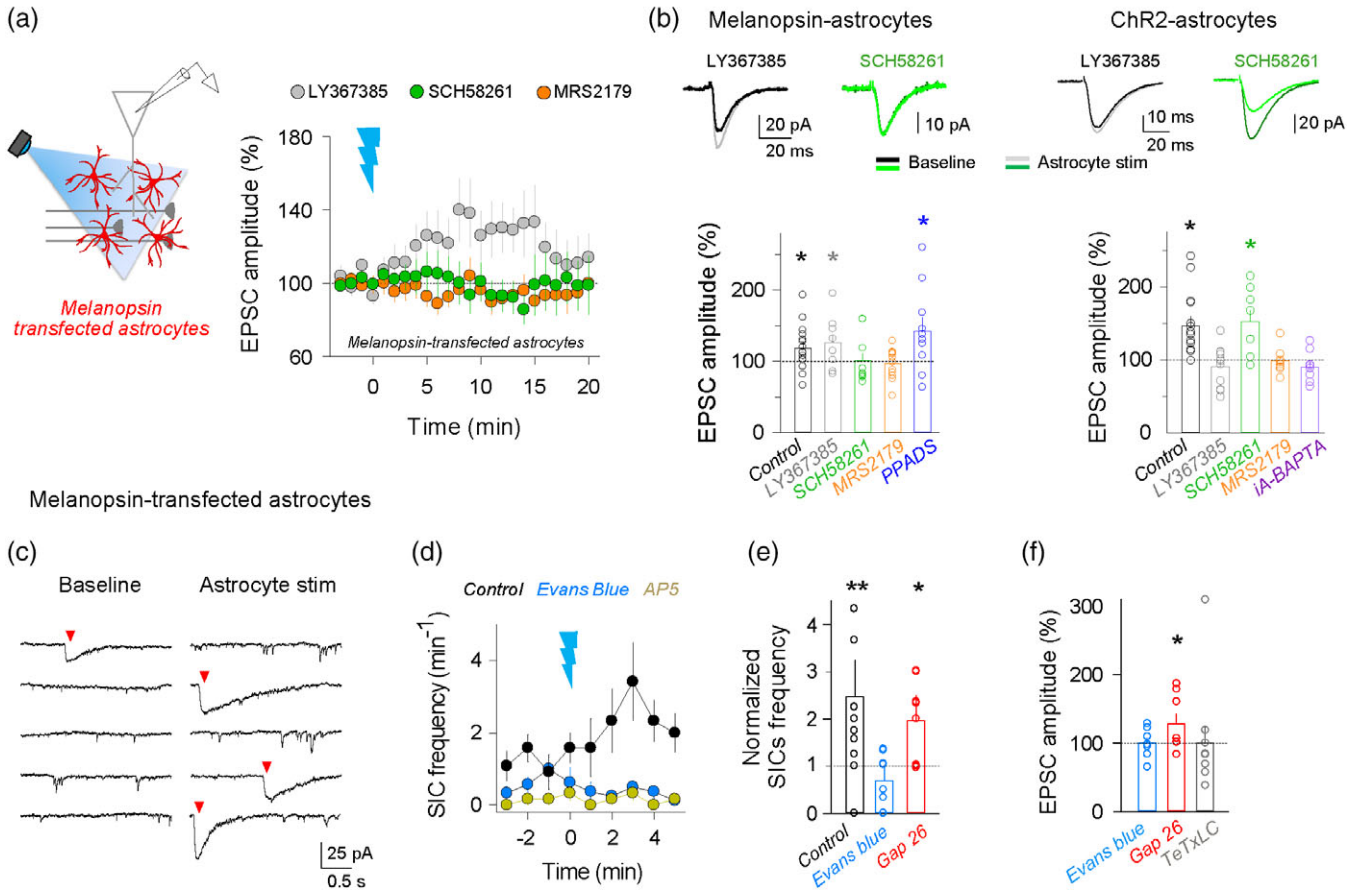


FIGURE 6 Melanopsin-driven purinergic and glutamatergic transmission triggers astrocyte-neuron signaling. (a) Schematic drawing of experimental design. Changes in relative EPSC amplitude over time before and after 20 s of melanopsin-astrocyte stimulation in presence of LY 367385 (100 μM), SCH 58261 (10 μM), and MRS 2179 (10 μM). Zero time indicates light pulse (blue beam). (b) *Top*: representative EPSC recordings before and after (10 min) astrocyte stimulation in presence of LY 367385 (in black/gray) and SCH 58261 (in green). *Bottom left*: average of relative changes of EPSC amplitude induced by melanopsin-astrocyte stimulation (20 s light) in the presence of LY 367385 (n = 8; p = 0.046), SCH 58261 (n = 10), MRS 2179 (n = 12), and PPADS (n = 10); *p < 0.05; paired t test. *Bottom right*: changes of EPSC amplitude evoked by ChR2-astrocyte stimulation (20 s light) in the presence of LY 367385 (n = 11), SCH 58261(n = 8; p = 0.013), MRS 2179 (n = 8), and after intracellular astrocyte loading with BAPTA (n = 8). *p < 0.05; paired t test. (c) Representative recordings showing the increase of SICs frequency (red triangles) after 20 s melanopsin-astrocyte activation. (d) Mean SIC frequency over time after melanopsin-stimulation in control conditions (n = 12), or after loading astrocytes with of Evans Blue (n = 8) or with perfusion of D-AP5 (50 μM, n = 6). (e) Relative changes of the SIC frequency in control (n = 12; p = 0.007), in presence of Evans Blue (5 μM, n = 8), and Gap 26 (100 μM, n = 9, p = 0.016; *p < 0.05; **p < 0.01; paired t test). (f) Average of relative changes of EPSC amplitude by melanopsin-stimulation after intracellular astrocyte loading with Evans Blue (n = 8), Gap 26 (n = 8; p = 0.010) and LcTeTx (1 μM, n = 8). *p < 0.05; paired t test. Data are shown as mean ± *SEM*

(b) *Top*: representative raster plot of microdomain activity in *Ip3r2*$^{-/-}$ mice (n = 500), color coded according to fluorescence change, and average microdomain population activity versus time after 20 s of light stimulation (bottom, n = 589). (c) *Top*: histogram of ROIs event frequency versus time (20 s, n = 589). *Bottom*: percentage of ROIs showing an event during the first 20 s after light stimulation (1 s, n = 75; 5 s, n = 28; 10 s, n = 103, 20 s, n = 86; 19 slices from 4 mice). (d) Analysis of microdomain Ca^{2+} fluctuation properties showing mean responses for event frequency, amplitude and width (1 s, n = 238 out of 531 (44.82%); 5 s, n = 105 out of 405 (25.93%); 10 s, n = 359 out of 759 (47.30%); 20 s, n = 589 out of 789 (74.65%); 19 slices; from four mice). p > 0.05; one-way ANOVA, post hoc comparison with Tukey–Kramer test. Somatic Ca^{2+} signals were monitored with cyto-GCaMP6f at 20 s light pulses (n = 39 astrocytes, 10 slices from three mice). p > 0.05; one-way ANOVA, post hoc comparison with Tukey–Kramer test. Note the absence of light effects on Ca^{2+} signals. (e) Analysis of resting microdomains Ca^{2+} fluctuation properties from Lck-GCaMP6f wild-type melanopsin-astrocytes (black; n = 3,816) and *Ip3r2*$^{-/-}$ melanopsin-astrocytes (white; n = 1,291). Analysis of resting soma Ca^{2+} fluctuation properties from cyto-GCaMP6f wild-type melanopsin-astrocytes (black; n = 44) and *Ip3r2*$^{-/-}$ melanopsin-astrocytes (white; n = 39). ** p = 0.001; *** p < 0.001, one-way ANOVA, post hoc comparison with Tukey–Kramer test. (f) Schematic drawing of an experimental design for synaptic recordings, and percentage of neurons from *Ip3r2*$^{-/-}$ mice showing synaptic changes after astrocyte light stimulation. (g) *Top*: representative EPSC recordings before and after 20 s of astrocyte optical activation in *Ip3r2*$^{-/-}$ mice. *Bottom*: average of relative EPSC amplitude over time after astrocyte stimulation. Zero time indicates light pulse (blue beam). (h) Relative changes of EPSC amplitude in *Ip3r2*$^{-/-}$ mice by light pulses at different time points (1 s, n = 12; 5 s, n = 11; 10 s, n = 11; 20 s, n = 15). Values recorded at 10 min after light activation of *Ip3r2*$^{-/-}$-astrocytes with 1 s (mean: 105.55%; *SD*: 22.04%; *SEM*: 6.36%; n = 12), 5 s (mean: 100.88%; *SD*: 27.22%; SEM: 8.21%; n = 11), 10 s (mean: 97.41%; *SD*: 23.27%; *SEM*: 7.02%; n = 11) and 20 s (mean: 91.57%; *SD*: 14.82%; *SEM*: 3.83%; n = 15). p > 0.05; paired t-test. (i) Comparative analysis of EPSC changes evoked after wild-type and *Ip3r2*$^{-/-}$-melanopsin-astrocyte light stimulation with 20 s light pulses (10 min after stim). Note that *Ip3r2*$^{-/-}$-melanopsin astrocytes did not evoke EPSC changes compared with control-melanopsin astrocytes (p = 0.003; one-way ANOVA, post hoc comparison with Tukey–Kramer test). ** p < 0.01. Data are shown as mean ± *SEM*

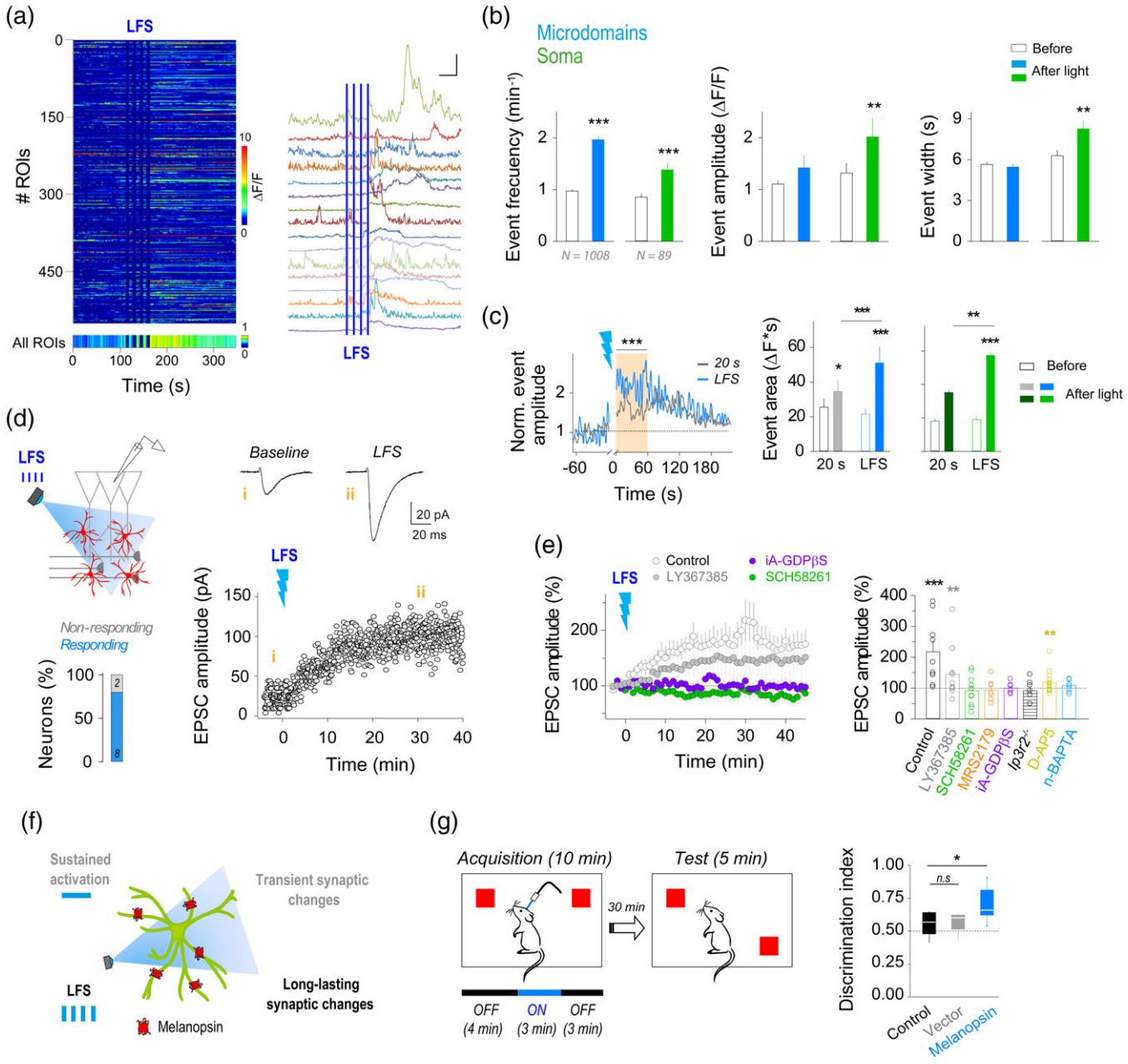


FIGURE 7 Low-frequency astrocyte activation drives hippocampal long-term synaptic plasticity and boosts memory performance. (a) *Left*: representative raster plot of microdomain activity, color coded according to fluorescence change (top, $n = 500$), and average microdomain population activity versus time (bottom, $n = 1{,}008$). *Right*: representative intensity of Ca^{2+} signals versus time evoked by melanopsin low-frequency stimulation (LFS; 5 s @ 0.06 Hz, 1 min; blue bars). Scale bar, 20 $\Delta F/F$, 35 s. (b) Blue bars, analysis of microdomain Ca^{2+} fluctuation properties showing mean responses for event amplitude, frequency ($p < 0.001$), and width (1,008 out of 1,182 events; 85.30%). $p = 0.005$ (**); $p < 0.001$ (***). Green bars, analysis of somatic Ca^{2+} fluctuation from cyto-GCaMPf6 viral expression showing mean responses for event amplitude ($p = 0.003$), frequency ($p < 0.001$), and width ($p = 0.001$; 18 slices from 3 mice). One-way ANOVA, post hoc comparison with Tukey–Kramer test. (c) *Left*: changes in the mean amplitude of Ca^{2+} event per active ROIs normalized to baseline over time, before and after 20 s light ($n = 951$) and LFS ($n = 809$; $p < 0.001$; one-way ANOVA, post hoc comparison with Dunns's test). *Right*: Ca^{2+} event area before and after 20 s light ($p = 0.016$) and LFS in astrocyte processes (gray and blue bars) and somas (green bars; $p < 0.001$; 20 s vs. LFS, $p < 0.001$). *$p < 0.05$; ***$p < 0.001$; two-way ANOVA, post hoc comparison with Dunn's test. (d) *Left*: schematic drawing of experimental design for synaptic recordings, and percentage of neurons showing synaptic changes after melanopsin LFS. *Right*: EPSC traces recorded before (i) and after (ii) astrocytic LFS, and EPSC amplitude over time from representative pyramidal cell. (e) *Left*: average of relative changes of EPSC amplitude over time after astrocyte LFS in control and in presence of LY 367385, astrocyte network-loading with GDPβS (iA-GDPβS), and SCH 58261. Zero time denotes light stimulation (blue beam). *Right*: relative mean values of EPSC amplitude after astrocyte LFS (mean value measured at 29–31 min) in control ($n = 10$, $p < 0.001$), and in the presence of LY 367385 ($n = 10$, $p = 0.006$), SCH 58261 ($n = 11$), MRS 2179 ($n = 7$), iA-GDPβS ($n = 7$), *Ip3r2*$^{-/-}$-melanopsin astrocytes ($n = 7$), D-AP5 ($n = 13$, $p = 0.006$), and intracellular BAPTA in neurons (n-BAPTA, $n = 8$). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, paired *t* test. Data are shown as mean ± *SEM*. (f) Scheme showing the ability of melanopsin-transfected astrocytes to decode duration and frequency of light protocols that originates modulatory synaptic responses with diverse temporal scales. (g) *Left*: Scheme of novel object location (NOL) test, indicating the timing of light protocol during the acquisition trial for both control (fiber-implanted nontransfected mice) and

of Ca^{2+} signals, but only events showing small Ca^{2+} amplitudes in resting conditions showed significant changes (Supporting Information Figure S9c). Using cyto-GCaMP6f, somatic Ca^{2+} events were also recorded and showed a robust increase after LFS stimulation (Figure 7b). Afterward, the efficacy to engage astrocyte Ca^{2+} signaling by 20 s light pulses and LFS was evaluated. The mean area of Ca^{2+} event amplitude was higher in both microdomains and soma after LFS (Figure 7c) indicating that melanopsin-activated astrocytes could discriminate light activity patterns driving different Ca^{2+} responses. In these conditions, recorded neurons displayed a robust EPSC potentiation after LFS that persisted after 30 min of recording (long-term potentiation, LTP) (80% of tested cells; 217.65 ± 37.51% from baseline; $n = 10$; $p < 0.001$; Figure 7d and e). The CV analysis indicated a presynaptic mechanism of action underlying LTP (Supporting Information Figure S9d). The astrocyte-mediated LTP was sensitive to the purinergic antagonist's SCH 58261 (91.39 ± 13.58% from baseline; $n = 11$; $p = 0.281$) and MRS 2179 (92.28 ± 12.54% from control; $n = 7$; $p = 0.396$; Figure 7e). The presence of mGluR1a antagonist LY 367385 failed to prevent synaptic potentiation (144.89 ± 15.36% from baseline; $n = 10$; $p = 0.006$; Figure 7e), although it was slightly reduced from control conditions ($p = 0.004$). The blockage of connexin-hemichannels and gap junctions with Gap26 (100 μM) did not prevent astrocyte-induced LTP (176.30 ± 22.79% from baseline; $n = 5$; $p < 0.001$; Supporting Information Figure S9e). However, LTP was abolished by intracellular loading of Evans blue (5 μM) into astrocyte network (91.08 ± 6.75% from baseline; $n = 7$; $p = 0.126$; Supporting Information Figure S9e). These data suggest a role for astrocytic ATP/Ado released by vesicular-dependent mechanisms in the melanopsin-induced synaptic plasticity. To establish the causal relationship between melanopsin-astrocyte Ca^{2+} signals and LTP, GDPβS was intracellularly loaded into the astrocytic network to downregulate G-protein signaling. After astrocyte GDPβS-loading, LFS failed to evoke LTP (100.12 ± 4.18% from baseline; $n = 6$; $p = 0.977$; Figure 7e). Likewise, stimulation of *Ip3r2*$^{-/-}$ melanopsin-transfected astrocytes (Supporting Information Figure S9b) failed to induce synaptic changes (91.76 ± 7.42% from baseline; $n = 7$; $p = 0.281$; Figure 7e); suggesting that astrocytic intracellular G-protein and IP3-dependent signaling were necessary and sufficient to induce LTP at hippocampal synapses.

NMDA receptors are broadly involved in LTP processes (Volianskis et al., 2015), and they have been related to particular forms of astrocyte-mediated synaptic plasticity (Adamsky et al., 2018; Henneberger et al., 2010; Min & Nevian, 2012). We found that in the presence of the NMDAR antagonist AP5 (50 μM), melanopsin-astrocyte stimulation still induced synaptic potentiation (118.68 ± 5.62% from baseline; $n = 13$; $p = 0.006$; Figure 7e and Supporting Information Figure S9d), but lesser extent than in control conditions ($p < 0.001$). Additionally, the contribution of postsynaptic activity was evaluated by intracellular loading of BAPTA into the recording neurons (nBAPTA; 20 mM). After nBAPTA-loading, astrocyte stimulation did not induce plasticity (108.60 ± 4.03% from baseline; $n = 8$; $p = 0.081$; Figure 7e and Supporting Information Figure S9d), suggesting that along with the presynaptic actions derived from optical astrocyte stimulation the postsynaptic neurons also contributed to the astrocyte-induced LTP. Interestingly, the analysis of former responses revealed a transient enhancement achieved during the first minutes after astrocytic LFS, similar to the short-term synaptic potentiation observed by acute melanopsin-astrocyte stimulation (Figure 2c). However, the activation of NMDARs and postsynaptic Ca^{2+} signaling were required for a sustained boost and LTP expression at hippocampal synapses (Volianskis et al., 2015; Supporting Information Figure S9d). Therefore, these data reveal the competence of astrocytes to directly trigger long-term plasticity in response to different patterns of activity (Figure 7f).

Because astrocyte activity has been related to cognitive performance (Florian, Vecsey, Halassa, Haydon, & Abel, 2011; Lee et al., 2014; Y. K. Li et al., 2012; Matos et al., 2015; Oliveira, Sardinha, Guerra-Gomes, Araque, & Sousa, 2015; Perea et al., 2014), we next investigated whether the synaptic changes induced by melanopsin-astrocytic activation might have an impact on animal behavior. Mice were injected bilaterally with AAV2/5-Gfap-melanopsin-mCherry to target hippocampal astrocytes. 3 weeks after surgery, memory performance was evaluated by testing Novel Object Location (NOL), in which mice were exposed to two objects for 10 min (acquisition trial), and 30 min later were re-introduced to the cage with one of the objects in a different location, during 5 min for exploration (Figure 7g). LFS light protocol was applied for 3 min during the acquisition trial. We have found that astrocyte activation resulted in a significant boost for the displaced object preference compared to control mice; that is, melanopsin-astrocyte activation enhanced discrimination index (0.57 ± 0.030 in control mice, fiber implanted, vs. 0.56 ± 0.041 in vector-transfected mice, $p = 0.868$; and 0.70 ± 0.037 in melanopsin-transfected mice, $p = 0.041$; $n = 5$, $n = 6$, and $n = 11$; respectively; Figure 7g). These data reveal the competence of astrocytes to improve memory performance (Adamsky et al., 2018), and the efficiency of melanopsin as an astrocytic optical tool for cognitive studies.

4 | DISCUSSION

Astrocytes have been shown to modulate neuronal activity by means of different mechanisms. Although its outcome is controversial (Bazargani & Attwell, 2016), the mechanisms related to intracellular Ca^{2+} signaling have received particular attention (Agulhon et al., 2013; Araque et al., 2014; Bindocci et al., 2017). Optogenetics appears as an ideal tool for accomplishing noninvasive, time-controlled, and cell-type specific perturbation in the brain. Thus, the specific manipulation of astrocytes by light could aid to uncover the astrocytic roles in brain function (Xie et al., 2015). Here, we have applied for the first time

melanopsin-transfected mice. Test trial was performed in the absence of light. *Right*: Whisker plot quantification of discrimination index of control (0.569 ± 0.030; $n = 5$, black), vector-transfected mice (0.560 ± 0.041; $n = 6$, gray; $p = 0.868$), and melanopsin-transfected mice (0.699 ± 0.037; $n = 11$, blue; $p = 0.041$, control vs. melanopsin) showing the enhancement of recognition index induced by astrocyte activation. *$p < 0.05$, one-way ANOVA, post hoc comparison with Tukey–Kramer test

melanopsin to astrocytes, a retinal G-protein-coupled photopigment, as an optical approach to precisely stimulate Ca^{2+} signals. A slow kinetics of melanopsin-driven light responses in retinal ganglion cells has been already described (Do et al., 2009; Mure et al., 2016), regulating cell excitability for several tens of seconds even after the light has been switched off, that allows an extended temporal integration frame in these neurons (Sexton et al., 2012). In this context, melanopsin features (high photosensitivity, regulation of intracellular Ca^{2+} dynamics, and slow kinetics) seem the ideal candidate to manipulate astrocyte physiology with optical tools. Our study reveals that light activation of melanopsin evoked reliable Ca^{2+} elevations at microdomain levels and membrane photocurrents related with Ca^{2+}-activated K^+ channels at a different range of light pulses. A correlation was found between Ca^{2+} event frequency and light pulse duration that might suggest the ability of astrocytes to adjust their excitability to different synaptic weights. Additionally, we found that Ca^{2+} events in astrocytic microdomains from *Ip3r2*$^{-/-}$ mice (Srinivasan et al., 2015) did not show further changes after light stimulation, confirming the ability of melanopsin to engage intracellular IP3 signaling in astrocytes. A new source of Ca^{2+} signaling in astrocytic microdomains has been recently described (Agarwal et al., 2017), where discrete Ca^{2+} events are mediated by transient openings of the mitochondrial transition pore, which can be also detected in the *Ip3r2*$^{-/-}$ mice (Agarwal et al., 2017). Whether this new mechanism can be recruited by melanopsin is still unresolved and would need further investigation. However, although light-evoked currents were still present in *Ip3r2*$^{-/-}$ astrocytes, which suggests that melanopsin might activate additional IP3R2-independent signals, no significant Ca^{2+} changes were found in both astrocytic microdomains and soma, and no synaptic changes were detected in neighboring neurons. Hence, these data support that the G-protein and IP3R2 signaling are the main intracellular pathways (Sherwood et al., 2017) involved in the melanopsin-driven astrocytic Ca^{2+} and synaptic responses. Considering that astrocytes express a wide repertory of G-protein-coupled receptors that are activated by synaptically released neurotransmitters, the use of melanopsin as optical tool represents a reliable approach to stimulate endogenous G-protein signaling pathways. Accordingly, synaptic plasticity was abolished by the presence of GDPβS and BAPTA into astrocyte network, confirming its dependence on intracellular G-protein and Ca^{2+} signaling.

Although light activation of OptoXRs, engineered chimeric receptors comprising the intracellular loops of adrenergic receptors fused to light-sensitive opsins (Airan, Thompson, Fenno, Bernstein, & Deisseroth, 2009), has been applied to astrocytes in culture and in situ (Figueiredo et al., 2014; Tang et al., 2014), and a recent paper comes out during the submission of this study showing their impact for hippocampal memory performance (Adamsky et al., 2018); the molecular pathways and subcellular features of the activation of light-sensitive G-protein have not been explored. Here, we provide a thorough characterization of the mechanisms of action of melanopsin on astrocyte Ca^{2+} physiology and synaptic transmission. While further studies will disclose the benefits and suitability of using OptoXRs or melanopsin, these data extend the existing optogenetic toolkit for astrocyte manipulation and neuron–glia studies both in situ and in vivo.

We reported that while glutamate-evoked NMDAR-dependent inward currents in CA1 neurons, ATP/Ado induced the synaptic enhancement by activation of $A2_ARs$ and $P2Y_1Rs$. The autocrine action of ATP has been previously shown in response to optoXRs (Figueiredo et al., 2014) and ChR2 stimulation (Shen et al., 2017) which might reconcile the responses driven by different receptors after melanopsin stimulation. As a result, optical astrocyte activation might stimulate ATP release that engaged surrounding astrocytes via $P2Y_1Rs$ stimulation, concluding with an excitatory synaptic enhancement driven by adenosine $A2_ARs$. Nevertheless, not all the melanopsin-induced Ca^{2+} signals were competent for gliotransmitter release and modulation of synaptic transmission, and EPSC potentiation was only observed after astrocyte activation above 5 s, suggesting the existence of a threshold for astrocyte neuromodulation.

Based on the present data light activation of melanopsin derived in glutamate and ATP/Ado release from astrocytes by Ca^{2+} and vesicular-dependent mechanisms (Henneberger et al., 2010; Jourdain et al., 2007; Min & Nevian, 2012; Perea & Araque, 2007; Schwarz et al., 2017); however, alternative and/or coexisting mechanisms could occur (Hamilton & Attwell, 2010). Potentially, additional effects induced by ATP signaling could take place simultaneously to the activation of P2Y1 and adenosine A2A receptors. That is, the purinergic signaling triggered by astrocytic P2Y1 would evoke glutamate release via TREK1 and Best1 channels activation, which are preferentially expressed at microdomains adjacent to glutamatergic synapses and engaged upon GPCR stimulation inducing NMDA-dependent to slow inward currents (Woo et al., 2012). Hence, a cooperative action between ATP and glutamatergic signaling would result in the recorded increase of SICs after melanopsin stimulation (Figure 6d and e). Additionally, ATP-derived excitatory currents via P2XRs could be considered as slow inward currents (SICs) (Lalo et al., 2014, 2016). D-serine release, along with glutamate, would be affected after blockage of vesicular-dependent pathways, which might derive in a reduction of the frequency of NMDA-dependent currents (Papouin, Henneberger, Rusakov, & Oliet, 2017; Rasooli-Nejad, Palygin, Lalo, & Pankratov, 2014).

Previous studies in hippocampal slices have shown that ATP released from astrocytes downregulates AMPA receptors at postsynaptic membranes via P2X receptor activation (Pougnet et al., 2014, 2016); however, the potentiation of EPSC amplitude observed in our study does not agree with the reported contribution of P2XR to hippocampal synaptic depression (Pougnet et al., 2014); and additionally, the synaptic enhancement was not abolished by PPADS, an antagonist of P2XR. Alternatively, ATP released by astrocytes can stimulate postsynaptic P2XRs activation and evoke purinergic synaptic currents that contribute to excitatory transmission (Lalo et al., 2016). Given the difficulties to monitor the purinergic component of fast EPSCs, low probability, and low amplitude events (Pankratov, Lalo, Verkhratsky, & North, 2007), we cannot totally exclude the contribution of P2XRs in the melanopsin-reported effects (Boue-Grabot & Pankratov, 2017); however, the magnitude of synaptic modulation observed under P2XRs blockage was similar to control conditions (p = 0.190; unpaired t test), which suggest that ATP released by astrocytes largely stimulates excitatory synaptic transmission via purinergic activation of P2Y1 and A2A receptors.

Optogenetic manipulation of astrocytes with ChR2 has been shown to modulate both intracellular Ca^{2+} signals and neuronal activity regulating neuronal firing rate (Gourine et al., 2010; Perea et al., 2014; Tan et al., 2017), as well as excitatory and inhibitory synaptic transmission (Perea et al., 2014; Sasaki et al., 2012) under robust light stimulation conditions; however, the consequences of shorter pulses have been less explored. In agreement with previous studies, we found that ChR2-evoked Ca^{2+} signals were triggered by long light pulses confirming the ability of ChR2 to stimulate astrocytes; but shorter stimuli showed a remarkably reduced control power on astrocyte Ca^{2+} signals. However, while different light stimuli of melanopsin-astrocytes triggered transient EPSC modulation (Figure 2), the impact of ChR2-astrocyte stimulation on synaptic transmission lasted longer (Figure 3), suggesting that, besides Ca^{2+} signaling, ChR2 activation might trigger additional mechanisms that restrict its ability to fine-tune synaptic transmission (Beppu et al., 2014). Therefore, this study shows that melanopsin and ChR2 display different capability to trigger astrocyte Ca^{2+} signals and to impact neuronal activity by releasing glutamate or ATP. Our data suggest that melanopsin and ChR2 modulate synaptic activity by different temporal scales, considering that compared with melanopsin, ChR2 significantly enhanced synaptic transmission, but displayed a limited capability to transiently perturb neuronal networks. Hence, to increase the available options for optical astrocytic stimulation, melanopsin offers wider conditions to induce either short or long-lasting synaptic changes. Furthermore, our data might indicate that the differences observed by using ChR2 and melanopsin, that is, magnitude and time course of synaptic changes, are evoked by different modes of gliotransmitter release, that is, diffuse or bulk gliotransmission triggered by ChR2 versus spot-like signaling between astrocytic processes and synapses triggered by melanopsin. Additionally, melanopsin-induced synaptic modulation shows similar temporal profile to the synaptic changes mediated by endocannabinoid and GABAergic endogenous activation of astrocytes (Martin et al., 2015; Perea et al., 2016), which suggests that melanopsin stimulation might recapitulate the astrocyte activation under physiological conditions.

The role of Ca^{2+} signals as the molecular code for astrocyte signaling is under debate (Araque et al., 2014; Bazargani & Attwell, 2016; Rusakov, 2015). While some studies based on the exogenous expression of Mas-related G-protein-coupled receptor A1 (MrgprA1) selectively in astrocytes (Agulhon, Fiacco, & McCarthy, 2010) have reported that MrgprA1 stimulation mobilized intracellular Ca^{2+} but failed to affect hippocampal synaptic transmission, recent studies have shown positive effects of specific MrgprA1 activation of astrocytes on glutamate transporter currents (Devaraju et al., 2013) and ATP-related animal behavior (Cao et al., 2013). Despite the controversy, our data suggest a key role of G-protein signaling and Ca^{2+}-dependent mechanisms for melanopsin-driven astrocyte-mediated synaptic modulation in synaptic transmission and animal behavior.

Yet more, considering that image acquisition used in this study is 1 Hz, it seems feasible that the frequency of Ca^{2+} events shown might be underestimated. Future studies using faster scanning or 3D recordings (Bindocci et al., 2017; Stobart et al., 2018) would monitor with better precision the melanopsin-induced Ca^{2+} dynamics in astrocytes.

Whether Ca^{2+} signaling can be regulated by local signals and neuronal demands is being comprehensively examined (Rusakov, 2015). In this study, using melanopsin as a trigger we first evaluated whether changes in astrocyte Ca^{2+} dynamics had an impact on the local neuronal network. We found that low-frequency stimulation (LFS; 0.06 Hz) of melanopsin evoked significant Ca^{2+} responses in astrocytic processes and soma, and unexpectedly, long-lasting changes in excitatory synaptic transmission (LTP). These results indicate that changes in duration (Figure 1f and g), and frequency (Figure 7) of light protocols used to stimulate melanopsin-astrocytes can modulate intracellular Ca^{2+} signals with different consequences on synaptic plasticity, from transient to long-lasting effects. Indeed, while a single 5 s pulse did induce transient EPSC potentiation, LFS evoked LTP. Hence, our data show that tuning their Ca^{2+} signals astrocytes can participate in different forms of synaptic plasticity, which could denote the contribution of astrocytes to particular brain states. Recently, it has been shown the role of astrocyte signaling in short- and long-lasting EPSCs potentiation triggered by different patterns of postsynaptic neuronal activity (Gomez-Gonzalo et al., 2015; Martin et al., 2015; Perea et al., 2016), as well as the astrocytic contribution to low-frequency states of cortical circuits, which may play a causal role in the control of cortical synchronizations (Poskanzer & Yuste, 2016). Our results showed that periods of low-frequency activity in astrocytes can engage long-term hippocampal synaptic plasticity. We next investigated whether those changes induced by melanopsin-astrocyte activation would impact animal performance in vivo. Remarkably, activation of astrocytes in vivo induced an enhancement of hippocampal-dependent memory tasks (NOL), which supports the role of astrocytes in cognitive processes (Adamsky et al., 2018), and their potential as cognitive enhancers.

Altogether, these results show melanopsin as a light-control trigger to manipulate astrocytic Ca^{2+} signaling, which can mimic the endogenous signaling pathways based on G-protein/IP3 activation triggered by neurotransmitter receptor stimulation. Additionally, present data show that fine-tuning of astrocyte signaling impacts synaptic transmission at different temporal scales, suggesting the ability of astrocytes to sense diverse patterns of neuronal activity. Such range of astrocyte activation might contribute to different forms synaptic plasticity and animal behavior. Future studies will reveal whether melanopsin may replicate endogenous astrocyte activity patterns, that will uncover the weight of astrocytes in particular brain functions, and alternatively, whether melanopsin can be applied to restore dysfunctional astrocyte-to-neuron signaling in animal models of human diseases. Overall, present data reveal melanopsin as a valuable optogenetic tool for neuron–glia studies.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. J. Chen (UCSD, CA, USA) for providing IP3R2$^{-/-}$ mice; Dr. W. Buño, Dr. E. Martin and Dr. Araque for helpful comments; Dr. JA Esteban, C. Sánchez and M.A. Muñoz for helpful assistance with the two-photon technical assistance; Dr. M. Valero for MATLAB advice. This work was supported by PhD fellowship program (MINECO, BES-2014-067594) to S.M; and MINECO grants

(BFU2013-47265R; Intramural 201620I017; BFU2016-75107-P) to G.P.

AUTHOR CONTRIBUTION

S. M., M. M.-F. and G. P. performed two-photon calcium imaging experiments, S. M. and G. P. analyzed calcium data. S. M. and A. H.-V. performed electrophysiology experiments and analyzed data. S. M. performed the in vivo experiments. J. R.-F. performed immunohistochemistry analysis. A. Y. and E. B. designed and provided GFAP-melanopsin construct. M. N. supervised and contributed to the two-photon calcium imaging experiments. G. P. designed the study and wrote the paper. All authors discussed the results and contributed to interpretation of the data.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no competing financial interests.

ORCID

Gertrudis Perea https://orcid.org/0000-0001-5924-9175

REFERENCES

Adamsky, A., Kol, A., Kreisel, T., Doron, A., Ozeri-Engelhard, N., Melcer, T., … Goshen, I. (2018). Astrocytic activation generates de novo neuronal potentiation and memory enhancement. *Cell*, *174*, 59–71. https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.05.002

Agarwal, A., Wu, P. H., Hughes, E. G., Fukaya, M., Tischfield, M. A., Langseth, A. J., … Bergles, D. E. (2017). Transient opening of the mitochondrial permeability transition pore induces microdomain calcium transients in astrocyte processes. *Neuron*, *93*(3), 587–605. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.12.034

Agulhon, C., Boyt, K. M., Xie, A. X., Friocourt, F., Roth, B. L., & McCarthy, K. D. (2013). Modulation of the autonomic nervous system and behaviour by acute glial cell Gq protein-coupled receptor activation in vivo. *The Journal of Physiology*, *591*(22), 5599–5609. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.261289

Agulhon, C., Fiacco, T. A., & McCarthy, K. D. (2010). Hippocampal short- and long-term plasticity are not modulated by astrocyte Ca2+ signaling. *Science*, *327*(5970), 1250–1254. https://doi.org/10.1126/science.1184821

Airan, R. D., Thompson, K. R., Fenno, L. E., Bernstein, H., & Deisseroth, K. (2009). Temporally precise in vivo control of intracellular signalling. *Nature*, *458*(7241), 1025–1029. https://doi.org/10.1038/nature07926

Araque, A., Carmignoto, G., Haydon, P. G., Oliet, S. H., Robitaille, R., & Volterra, A. (2014). Gliotransmitters travel in time and space. *Neuron*, *81*(4), 728–739. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.02.007

Bang, J., Kim, H. Y., & Lee, H. (2016). Optogenetic and chemogenetic approaches for studying astrocytes and gliotransmitters. *Experimental Neurobiology*, *25*(5), 205–221. https://doi.org/10.5607/en.2016.25.5.205

Bazargani, N., & Attwell, D. (2016). Astrocyte calcium signaling: The third wave. *Nature Neuroscience*, *19*(2), 182–189. https://doi.org/10.1038/nn.4201

Bennett, M. V., Garre, J. M., Orellana, J. A., Bukauskas, F. F., Nedergaard, M., & Saez, J. C. (2012). Connexin and pannexin hemichannels in inflammatory responses of glia and neurons. *Brain Research*, *1487*, 3–15. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.08.042

Beppu, K., Sasaki, T., Tanaka, K. F., Yamanaka, A., Fukazawa, Y., Shigemoto, R., & Matsui, K. (2014). Optogenetic countering of glial acidosis suppresses glial glutamate release and ischemic brain damage. *Neuron*, *81*(2), 314–320. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.11.011

Bernstein, J. G., & Boyden, E. S. (2011). Optogenetic tools for analyzing the neural circuits of behavior. *Trends in Cognitive Sciences*, *15*(12), 592–600. https://doi.org/10.1016/j.tics.2011.10.003

Bindocci, E., Savtchouk, I., Liaudet, N., Becker, D., Carriero, G., & Volterra, A. (2017). Three-dimensional Ca(2+) imaging advances understanding of astrocyte biology. *Science*, *356*(6339), eaai8185. https://doi.org/10.1126/science.aai8185

Boue-Grabot, E., & Pankratov, Y. (2017). Modulation of central synapses by astrocyte-released ATP and postsynaptic P2X receptors. *Neural Plasticity*, *2017*, 9454275. https://doi.org/10.1155/2017/9454275

Cao, X., Li, L. P., Wang, Q., Wu, Q., Hu, H. H., Zhang, M., … Gao, T. M. (2013). Astrocyte-derived ATP modulates depressive-like behaviors. *Nature Medicine*, *19*(6), 773–777. https://doi.org/10.1038/nm.3162

Chen, N., Sugihara, H., Kim, J., Fu, Z., Barak, B., Sur, M., … Han, W. (2016). Direct modulation of GFAP-expressing glia in the arcuate nucleus bi-directionally regulates feeding. *eLife*, *5*, e18716. https://doi.org/10.7554/eLife.18716

Devaraju, P., Sun, M. Y., Myers, T. L., Lauderdale, K., & Fiacco, T. A. (2013). Astrocytic group I mGluR-dependent potentiation of astrocytic glutamate and potassium uptake. *Journal of Neurophysiology*, *109*(9), 2404–2414. https://doi.org/10.1152/jn.00517.2012

Di Castro, M. A., Chuquet, J., Liaudet, N., Bhaukaurally, K., Santello, M., Bouvier, D., … Volterra, A. (2011). Local Ca^{2+} detection and modulation of synaptic release by astrocytes. *Nature Neuroscience*, *14*(10), 1276–1284. https://doi.org/10.1038/nn.2929

Do, M. T., Kang, S. H., Xue, T., Zhong, H., Liao, H. W., Bergles, D. E., & Yau, K. W. (2009). Photon capture and signalling by melanopsin retinal ganglion cells. *Nature*, *457*(7227), 281–287. https://doi.org/10.1038/nature07682

Eriksen, J., Chang, R., McGregor, M., Silm, K., Suzuki, T., & Edwards, R. H. (2016). Protons regulate vesicular glutamate transporters through an allosteric mechanism. *Neuron*, *90*(4), 768–780. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.03.026

Faber, D. S., & Korn, H. (1991). Applicability of the coefficient of variation method for analyzing synaptic plasticity. *Biophysical Journal*, *60*(5), 1288–1294. https://doi.org/10.1016/S0006-3495(91)82162-2

Fernandez de Sevilla, D., Cabezas, C., de Prada, A. N., Sanchez-Jimenez, A., & Buno, W. (2002). Selective muscarinic regulation of functional glutamatergic Schaffer collateral synapses in rat CA1 pyramidal neurons. *The Journal of Physiology*, *545*(Pt 1), 51–63.

Figueiredo, M., Lane, S., Stout, R. F., Jr., Liu, B., Parpura, V., Teschemacher, A. G., & Kasparov, S. (2014). Comparative analysis of optogenetic actuators in cultured astrocytes. *Cell Calcium*, *56*(3), 208–214. https://doi.org/10.1016/j.ceca.2014.07.007

Florian, C., Vecsey, C. G., Halassa, M. M., Haydon, P. G., & Abel, T. (2011). Astrocyte-derived adenosine and A1 receptor activity contribute to sleep loss-induced deficits in hippocampal synaptic plasticity and memory in mice. *The Journal of Neuroscience*, *31*(19), 6956–6962. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5761-10.2011

Geisler, J. C., Corbin, K. L., Li, Q., Feranchak, A. P., Nunemaker, C. S., & Li, C. (2013). Vesicular nucleotide transporter-mediated ATP release regulates insulin secretion. *Endocrinology*, *154*(2), 675–684. https://doi.org/10.1210/en.2012-1818

Goh, G. Y., Huang, H., Ullman, J., Borre, L., Hnasko, T. S., Trussell, L. O., & Edwards, R. H. (2011). Presynaptic regulation of quantal size: K+/H+ exchange stimulates vesicular glutamate transport. *Nature Neuroscience*, *14*(10), 1285–1292. https://doi.org/10.1038/nn.2898

Gomez-Gonzalo, M., Navarrete, M., Perea, G., Covelo, A., Martin-Fernandez, M., Shigemoto, R., … Araque, A. (2015). Endocannabinoids induce lateral long-term potentiation of transmitter release by stimulation of gliotransmission. *Cerebral Cortex*, *25*(10), 3699–3712. https://doi.org/10.1093/cercor/bhu231

Gordon, G. R., Baimoukhametova, D. V., Hewitt, S. A., Rajapaksha, W. R., Fisher, T. E., & Bains, J. S. (2005). Norepinephrine triggers release of glial ATP to increase postsynaptic efficacy. *Nature Neuroscience*, *8*(8), 1078–1086. https://doi.org/10.1038/nn1498

Gourine, A. V., Kasymov, V., Marina, N., Tang, F., Figueiredo, M. F., Lane, S., … Kasparov, S. (2010). Astrocytes control breathing through pH-dependent release of ATP. *Science*, *329*(5991), 571–575. https://doi.org/10.1126/science.1190721

Hamilton, N. B., & Attwell, D. (2010). Do astrocytes really exocytose neurotransmitters? *Nature Reviews. Neuroscience*, *11*(4), 227–238. https://doi.org/10.1038/nrn2803

Hatori, M., & Panda, S. (2010). The emerging roles of melanopsin in behavioral adaptation to light. *Trends in Molecular Medicine*, *16*(10), 435–446. https://doi.org/10.1016/j.molmed.2010.07.005

Hattar, S., Liao, H. W., Takao, M., Berson, D. M., & Yau, K. W. (2002). Melanopsin-containing retinal ganglion cells: Architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science*, *295*(5557), 1065–1070. https://doi.org/10.1126/science.1069609

Haustein, M. D., Kracun, S., Lu, X. H., Shih, T., Jackson-Weaver, O., Tong, X., … Khakh, B. S. (2014). Conditions and constraints for astrocyte calcium signaling in the hippocampal mossy fiber pathway. *Neuron*, *82*(2), 413–429. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.02.041

Henneberger, C., Papouin, T., Oliet, S. H., & Rusakov, D. A. (2010). Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes. *Nature*, *463*(7278), 232–236. https://doi.org/10.1038/nature08673

Jourdain, P., Bergersen, L. H., Bhaukaurally, K., Bezzi, P., Santello, M., Domercq, M., … Volterra, A. (2007). Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength. *Nature Neuroscience*, *10*(3), 331–339. https://doi.org/10.1038/nn1849

Karpuk, N., Burkovetskaya, M., Fritz, T., Angle, A., & Kielian, T. (2011). Neuroinflammation leads to region-dependent alterations in astrocyte gap junction communication and hemichannel activity. *The Journal of Neuroscience*, *31*(2), 414–425. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5247-10.2011

Lalo, U., Palygin, O., Rasooli-Nejad, S., Andrew, J., Haydon, P. G., & Pankratov, Y. (2014). Exocytosis of ATP from astrocytes modulates phasic and tonic inhibition in the neocortex. *PLoS Biology*, *12*(1), e1001747. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001747

Lalo, U., Palygin, O., Verkhratsky, A., Grant, S. G., & Pankratov, Y. (2016). ATP from synaptic terminals and astrocytes regulates NMDA receptors and synaptic plasticity through PSD-95 multi-protein complex. *Scientific Reports*, *6*, 33609. https://doi.org/10.1038/srep33609

Lee, H. S., Ghetti, A., Pinto-Duarte, A., Wang, X., Dziewczapolski, G., Galimi, F., … Heinemann, S. F. (2014). Astrocytes contribute to gamma oscillations and recognition memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(32), E3343–E3352. https://doi.org/10.1073/pnas.1410893111

Letellier, M., Park, Y. K., Chater, T. E., Chipman, P. H., Gautam, S. G., Oshima-Takago, T., & Goda, Y. (2016). Astrocytes regulate heterogeneity of presynaptic strengths in hippocampal networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(19), E2685–E2694. https://doi.org/10.1073/pnas.1523717113

Li, X., Zima, A. V., Sheikh, F., Blatter, L. A., & Chen, J. (2005). Endothelin-1-induced arrhythmogenic Ca2+ signaling is abolished in atrial myocytes of inositol-1,4,5-trisphosphate(IP3)-receptor type 2-deficient mice. *Circulation Research*, *96*(12), 1274–1281. https://doi.org/10.1161/01.RES.0000172556.05576.4c

Li, Y. K., Wang, F., Wang, W., Luo, Y., Wu, P. F., Xiao, J. L., … Chen, J. G. (2012). Aquaporin-4 deficiency impairs synaptic plasticity and associative fear memory in the lateral amygdala: Involvement of downregulation of glutamate transporter-1 expression. *Neuropsychopharmacology*, *37*(8), 1867–1878. https://doi.org/10.1038/npp.2012.34

Lin, J. Y. (2011). A user's guide to channelrhodopsin variants: Features, limitations and future developments. *Experimental Physiology*, *96*(1), 19–25. https://doi.org/10.1113/expphysiol.2009.051961

Mariotti, L., Losi, G., Lia, A., Melone, M., Chiavegato, A., Gomez-Gonzalo, M., … Carmignoto, G. (2018). Interneuron-specific signaling evokes distinctive somatostatin-mediated responses in adult cortical astrocytes. *Nature Communications*, *9*(1), 82. https://doi.org/10.1038/s41467-017-02642-6

Martin, R., Bajo-Graneras, R., Moratalla, R., Perea, G., & Araque, A. (2015). Circuit-specific signaling in astrocyte-neuron networks in basal ganglia pathways. *Science*, *349*(6249), 730–734. https://doi.org/10.1126/science.aaa7945

Martin-Fernandez, M., Jamison, S., Robin, L. M., Zhao, Z., Martin, E. D., Aguilar, J., … Araque, A. (2017). Synapse-specific astrocyte gating of amygdala-related behavior. *Nature Neuroscience*, *20*, 1540–1548. https://doi.org/10.1038/nn.4649

Masamoto, K., Unekawa, M., Watanabe, T., Toriumi, H., Takuwa, H., Kawaguchi, H., … Suzuki, N. (2015). Unveiling astrocytic control of cerebral blood flow with optogenetics. *Scientific Reports*, *5*, 11455. https://doi.org/10.1038/srep11455

Matos, M., Shen, H. Y., Augusto, E., Wang, Y., Wei, C. J., Wang, Y. T., … Chen, J. F. (2015). Deletion of adenosine A2A receptors from astrocytes disrupts glutamate homeostasis leading to psychomotor and cognitive impairment: Relevance to schizophrenia. *Biological Psychiatry*, *78*(11), 763–774. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.02.026

McGregor, K. M., Becamel, C., Marin, P., & Andrade, R. (2016). Using melanopsin to study G protein signaling in cortical neurons. *Journal of Neurophysiology*, *116*(3), 1082–1092. https://doi.org/10.1152/jn.00406.2016

Min, R., & Nevian, T. (2012). Astrocyte signaling controls spike timing-dependent depression at neocortical synapses. *Nature Neuroscience*, *15*(5), 746–753. https://doi.org/10.1038/nn.3075

Mure, L. S., Hatori, M., Zhu, Q., Demas, J., Kim, I. M., Nayak, S. K., & Panda, S. (2016). Melanopsin-encoded response properties of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *Neuron*, *90*(5), 1016–1027. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.04.016

Navarrete, M., Perea, G., Fernandez de Sevilla, D., Gomez-Gonzalo, M., Nunez, A., Martin, E. D., & Araque, A. (2012). Astrocytes mediate in vivo cholinergic-induced synaptic plasticity. *PLoS Biology*, *10*(2), e1001259. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001259

Oliveira, J. F., Sardinha, V. M., Guerra-Gomes, S., Araque, A., & Sousa, N. (2015). Do stars govern our actions? Astrocyte involvement in rodent behavior. *Trends in Neurosciences*, *38*(9), 535–549. https://doi.org/10.1016/j.tins.2015.07.006

Oya, M., Kitaguchi, T., Yanagihara, Y., Numano, R., Kakeyama, M., Ikematsu, K., & Tsuboi, T. (2013). Vesicular nucleotide transporter is involved in ATP storage of secretory lysosomes in astrocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *438*(1), 145–151. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.07.043

Panatier, A., Vallee, J., Haber, M., Murai, K. K., Lacaille, J. C., & Robitaille, R. (2011). Astrocytes are endogenous regulators of basal transmission at central synapses. *Cell*, *146*(5), 785–798. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.022

Panda, S., Nayak, S. K., Campo, B., Walker, J. R., Hogenesch, J. B., & Jegla, T. (2005). Illumination of the melanopsin signaling pathway. *Science*, *307*(5709), 600–604. https://doi.org/10.1126/science.1105121

Pankratov, Y., Lalo, U., Verkhratsky, A., & North, R. A. (2007). Quantal release of ATP in mouse cortex. *The Journal of General Physiology*, *129*(3), 257–265. https://doi.org/10.1085/jgp.200609693

Papouin, T., Henneberger, C., Rusakov, D. A., & Oliet, S. H. R. (2017). Astroglial versus neuronal D-serine: Fact checking. *Trends in Neurosciences*, *40*(9), 517–520. https://doi.org/10.1016/j.tins.2017.05.007

Peinado, G., Osorno, T., Gomez Mdel, P., & Nasi, E. (2015). Calcium activates the light-dependent conductance in melanopsin-expressing photoreceptors of amphioxus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(25), 7845–7850. https://doi.org/10.1073/pnas.1420265112

Pelluru, D., Konadhode, R. R., Bhat, N. R., & Shiromani, P. J. (2016). Optogenetic stimulation of astrocytes in the posterior hypothalamus increases sleep at night in C57BL/6J mice. *The European Journal of Neuroscience*, *43*(10), 1298–1306. https://doi.org/10.1111/ejn.13074

Perea, G., & Araque, A. (2005). Properties of synaptically evoked astrocyte calcium signal reveal synaptic information processing by astrocytes. *The Journal of Neuroscience*, *25*(9), 2192–2203. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3965-04.2005

Perea, G., & Araque, A. (2007). Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science*, *317*(5841), 1083–1086. https://doi.org/10.1126/science.1144640

Perea, G., Gomez, R., Mederos, S., Covelo, A., Ballesteros, J. J., Schlosser, L., … Araque, A. (2016). Activity-dependent switch of GABAergic inhibition into glutamatergic excitation in astrocyte-neuron networks. *eLife*, *5*, e23062. https://doi.org/10.7554/eLife.20362

Perea, G., Yang, A., Boyden, E. S., & Sur, M. (2014). Optogenetic astrocyte activation modulates response selectivity of visual cortex neurons in vivo. *Nature Communications*, *5*, 3262. https://doi.org/10.1038/ncomms4262

Poskanzer, K. E., & Yuste, R. (2016). Astrocytes regulate cortical state switching in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(19), E2675–E2684. https://doi.org/10.1073/pnas.1520759113

Pougnet, J. T., Compans, B., Martinez, A., Choquet, D., Hosy, E., & Boue-Grabot, E. (2016). P2X-mediated AMPA receptor internalization and synaptic depression is controlled by two CaMKII phosphorylation sites on GluA1 in hippocampal neurons. *Scientific Reports*, *6*, 31836. https://doi.org/10.1038/srep31836

Pougnet, J. T., Toulme, E., Martinez, A., Choquet, D., Hosy, E., & Boue-Grabot, E. (2014). ATP P2X receptors downregulate AMPA receptor trafficking and postsynaptic efficacy in hippocampal neurons. *Neuron*, *83*(2), 417–430. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.06.005

Rasooli-Nejad, S., Palygin, O., Lalo, U., & Pankratov, Y. (2014). Cannabinoid receptors contribute to astroglial Ca(2)(+)-signalling and control of synaptic plasticity in the neocortex. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, *369*(1654), 20140077. https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0077

Roux, L., Madar, A., Lacroix, M. M., Yi, C., Benchenane, K., & Giaume, C. (2015). Astroglial Connexin 43 Hemichannels modulate olfactory bulb slow oscillations. *The Journal of Neuroscience*, *35*(46), 15339–15352. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0861-15.2015

Rusakov, D. A. (2015). Disentangling calcium-driven astrocyte physiology. *Nature Reviews. Neuroscience*, *16*(4), 226–233. https://doi.org/10.1038/nrn3878

Sakamoto, S., Miyaji, T., Hiasa, M., Ichikawa, R., Uematsu, A., Iwatsuki, K., … Moriyama, Y. (2014). Impairment of vesicular ATP release affects glucose metabolism and increases insulin sensitivity. *Scientific Reports*, *4*, 6689. https://doi.org/10.1038/srep06689

Sanchez-Mendoza, E. H., Bellver-Landete, V., Arce, C., Doeppner, T. R., Hermann, D. M., & Oset-Gasque, M. J. (2017). Vesicular glutamate transporters play a role in neuronal differentiation of cultured SVZ-derived neural precursor cells. *PLoS One*, *12*(5), e0177069. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177069

Sasaki, T., Beppu, K., Tanaka, K. F., Fukazawa, Y., Shigemoto, R., & Matsui, K. (2012). Application of an optogenetic byway for perturbing neuronal activity via glial photostimulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(50), 20720–20725. https://doi.org/10.1073/pnas.1213458109

Schwarz, Y., Zhao, N., Kirchhoff, F., & Bruns, D. (2017). Astrocytes control synaptic strength by two distinct v-SNARE-dependent release pathways. *Nature Neuroscience*, *20*, 1529–1539. https://doi.org/10.1038/nn.4647

Serrano, A., Haddjeri, N., Lacaille, J. C., & Robitaille, R. (2006). GABAergic network activation of glial cells underlies hippocampal heterosynaptic depression. *The Journal of Neuroscience*, *26*(20), 5370–5382. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5255-05.2006

Sexton, T., Buhr, E., & Van Gelder, R. N. (2012). Melanopsin and mechanisms of non-visual ocular photoreception. *The Journal of Biological Chemistry*, *287*(3), 1649–1656. https://doi.org/10.1074/jbc.R111.301226

Shen, W., Nikolic, L., Meunier, C., Pfrieger, F., & Audinat, E. (2017). An autocrine purinergic signaling controls astrocyte-induced neuronal excitation. *Scientific Reports*, *7*(1), 11280. https://doi.org/10.1038/s41598-017-11793-x

Sherwood, M. W., Arizono, M., Hisatsune, C., Bannai, H., Ebisui, E., Sherwood, J. L., … Mikoshiba, K. (2017). Astrocytic IP3 Rs: Contribution to Ca(2+) signalling and hippocampal LTP. *Glia*, *65*(3), 502–513. https://doi.org/10.1002/glia.23107

Shigetomi, E., Bowser, D. N., Sofroniew, M. V., & Khakh, B. S. (2008). Two forms of astrocyte calcium excitability have distinct effects on NMDA receptor-mediated slow inward currents in pyramidal neurons. *The Journal of Neuroscience*, *28*(26), 6659–6663. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1717-08.2008

Shigetomi, E., Bushong, E. A., Haustein, M. D., Tong, X., Jackson-Weaver, O., Kracun, S., … Khakh, B. S. (2013). Imaging calcium microdomains within entire astrocyte territories and endfeet with GCaMPs expressed using adeno-associated viruses. *The Journal of General Physiology*, *141*(5), 633–647. https://doi.org/10.1085/jgp.201210949

Srinivasan, R., Huang, B. S., Venugopal, S., Johnston, A. D., Chai, H., Zeng, H., … Khakh, B. S. (2015). Ca(2+) signaling in astrocytes from Ip3r2(−/−) mice in brain slices and during startle responses in vivo. *Nature Neuroscience*, *18*(5), 708–717. https://doi.org/10.1038/nn.4001

Stobart, J. L., Ferrari, K. D., Barrett, M. J. P., Gluck, C., Stobart, M. J., Zuend, M., & Weber, B. (2018). Cortical circuit activity evokes rapid astrocyte calcium signals on a similar timescale to neurons. *Neuron*, *98*, 726–735.e4. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.03.050

Tan, Z., Liu, Y., Xi, W., Lou, H. F., Zhu, L., Guo, Z., … Duan, S. (2017). Glia-derived ATP inversely regulates excitability of pyramidal and CCK-positive neurons. *Nature Communications*, *8*, 13772. https://doi.org/10.1038/ncomms13772

Tang, F., Lane, S., Korsak, A., Paton, J. F., Gourine, A. V., Kasparov, S., & Teschemacher, A. G. (2014). Lactate-mediated glia-neuronal signalling in the mammalian brain. *Nature Communications*, *5*, 3284. https://doi.org/10.1038/ncomms4284

Volianskis, A., France, G., Jensen, M. S., Bortolotto, Z. A., Jane, D. E., & Collingridge, G. L. (2015). Long-term potentiation and the role of N-methyl-D-aspartate receptors. *Brain Research*, *1621*, 5–16. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.01.016

Woo, D. H., Han, K. S., Shim, J. W., Yoon, B. E., Kim, E., Bae, J. Y., … Lee, C. J. (2012). TREK-1 and Best1 channels mediate fast and slow glutamate release in astrocytes upon GPCR activation. *Cell*, *151*(1), 25–40. https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.09.005

Xie, A. X., Petravicz, J., & McCarthy, K. D. (2015). Molecular approaches for manipulating astrocytic signaling in vivo. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *9*, 144. https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00144

Yamashita, A., Hamada, A., Suhara, Y., Kawabe, R., Yanase, M., Kuzumaki, N., … Narita, M. (2014). Astrocytic activation in the anterior cingulate cortex is critical for sleep disorder under neuropathic pain. *Synapse*, *68*(6), 235–247. https://doi.org/10.1002/syn.21733

Yang, L., Qi, Y., & Yang, Y. (2015). Astrocytes control food intake by inhibiting AGRP neuron activity via adenosine A1 receptors. *Cell Reports*, *11*(5), 798–807. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.04.002

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

How to cite this article: Mederos S, Hernández-Vivanco A, Ramírez-Franco J, et al. Melanopsin for precise optogenetic activation of astrocyte-neuron networks. *Glia*. 2019;67:915–934. https://doi.org/10.1002/glia.23580