



Facultad de ciencias

Programa de Lic. En ciencias Mención Biología o Química.

**“Mecanismos que subyacen a la inducción de la potenciación a largo plazo
inhibitoria (iLTP) en hipocampo de rata”.**

Jorge Arriagada Díaz.

Tesis para optar al grado de Licenciado en Ciencias Mención Biología.

Director de Tesis:

Prof. Dr. Marco Fuenzalida Núñez

2015

Índice

Abreviaturas	3
Resumen.....	7
Introducción	10
Planteamiento del problema.....	19
Hipótesis y objetivos.....	21
Métodos	23
Resultados	29
Discusión	37
Conclusiones	42
Financiamiento	45
Referencias.....	47

I. Abreviaturas

Abreviaturas

ACh: Acetilcolina.

AFDX: Antagonista selectivo para receptor M₂ muscarínico.

AM251: antagonista de CB1R.

APV o D-AP5: ácido D-2-aminofosfonovalerato, antagonista específico del receptor NMDA.

Atropina: antagonista competitivo de mACh-R. cAMP: AMP cíclico.

BAPTA: Quelante de calcio.

CB1-R: receptor de endocannabinoides tipo 1. CCK: neuropéptido colecistoquinina.

CNQX: antagonista del receptor AMPA/Kainato.

DHPG: Agonista selectivo para receptores metabotrópicos del grupo I (mGluR1/5)

DSI: depresión inducida por despolarización (i.e. Depolarization Suppression of Inhibition).

eCBs: endocannabinoides.

fIPSP: potenciales post-sinápticas inhibitorias de campo.

GABA: ácido γ -Aminobutírico, principal neurotransmisor inhibitorio.

GABAA -R: receptor ionotrópico de GABA tipo A.

GABAB -R: receptor metabotrópico de GABA tipo B.

GABA_C-R: receptor ionotrópico de GABA tipo C.

iLTD: depresión a largo plazo de sinapsis inhibitorias (i.e. inhibitory LongTerm Depression).

LCA: líquido cefalorraquídeo artificial.

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

iLTP: Potenciación a largo plazo de sinapsis inhibitorias (i.e. inhibitory LongTerm potentiation).

LTP: potenciación a Largo Plazo (i.e. Long Term Potenciation) mACh-R: receptor de Acetilcolina del tipo muscarínico.

LY36385: Antagonista mGLU-R del grupo I.

MCPG: antagonista no selectivo para receptores mGlu del tipo I y II. mGlu-R: receptor metabotrópico de Glutamato.

MPEP: Antagonista receptor mGLU-R tipo V.

nACh-R: receptor de Acetilcolina de tipo nicotínico.

PKA: proteína quinasa A (i.e. protein kinase A).

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

PV: Proteína ligando de calcio parvalbúmina.

SNC: Sistema Nervioso Central.

SNP: Sistema Nervioso Periférico.

STD: Depresión a corto plazo (i.e. Short Term Depression).

II. Resumen

Resumen

El correcto funcionamiento del sistema nervioso (SN) se debe en gran parte al balance entre sinapsis del tipo excitatorio e inhibitorio y su capacidad de generar distintas formas de plasticidad sináptica, término que hace referencia a la capacidad que posee tanto el sistema nervioso central (SNC) y periférico (SNP) de adaptarse frente a distintos requerimientos, tanto ambientales como fisiológicos. Estas adaptaciones, a nivel celular, se ven reflejadas en cambios en la eficacia sináptica, las cuales pueden ser tanto a largo como a corto plazo. Estos cambios están vinculados a procesos cognitivos, como el aprendizaje y la memoria, los cuales dependen en gran medida de cambios en la eficacia de la transmisión de sinapsis existentes y la generación de nuevas conexiones. Numerosas evidencias experimentales han demostrado que diferentes tipos de neurotransmisores como glutamato, GABA, acetilcolina entre otros, regulan tanto la eficacia sináptica como la excitabilidad neuronal. A pesar que estudios científicos han demostrado que la interacción entre el sistema colinérgico y glutamatérgico están vinculados en la inducción, expresión y mantención de la eficacia sináptica excitatoria, su papel funcional sobre sinapsis inhibitorias han sido menos estudiados.

En nuestro laboratorio demostramos que la co-activación de los receptores para endocannabinoides y muscarínicos para acetilcolina es capaz de inducir depresión a largo plazo de la transmisión GABAérgica en las neuronas piramidales de CA1 en hipocampo. En el presente trabajo utilizando registros de potenciales postsinápticos de campo y de patch-clamp, hemos demostrado que la activación de receptores muscarínicos de acetilcolina del tipo M1 (m1ACh-R) y metabotrópicos de glutamato, del grupo I (mGlu-R1/5) son requeridos para inducir una potenciación a largo plazo en sinapsis inhibitoria (iLTP). Esta potenciación sináptica está determinada por la activación de proteína G, probablemente del tipo Gq, de aumento en los niveles de calcio postsinápticos y la activación de la calmodulina kinasa-2 (CaMKII). Nuestros resultados sugieren la existencia de la señalización cooperativa entre las vías colinérgicas y glutamatérgicas que es capaz de inducir potenciación de sinapsis inhibitorias en hipocampo. De esta manera, la activación de m1AChR sirve como interruptor metaplastico haciendo competentes a las sinapsis glutamatérgicas para la generación de potenciación a largo plazo de las sinapsis inhibitorias, mecanismo que puede contribuir de manera importante a los mecanismos cerebrales que subyacen al aprendizaje y la memoria.

III. Introducción

|

Introducción:

El concepto de plasticidad sináptica se refiere al proceso biológico mediante el cual un patrón de actividad sináptica específico cambia la fuerza de las conexiones sinápticas. Este cambio adaptativo de las sinapsis, ha sido postulado como la base celular del aprendizaje y la memoria (Morris, 2003; Malenka and Bear, 2004). Trabajando en hipocampo de conejo Bliss y Lomo en 1973, proporcionaron la primera evidencia experimental en vertebrados de la existencia de cambios persistentes en la eficacia de las conexiones sinápticas, como consecuencia de la actividad repetida de aferencias glutamatérgicas (Bliss and Lomo, 1973; Cooke and Bliss, 2006). Bliss y Lomo observaron que la estimulación eléctrica a alta frecuencia de los axones proveniente desde la corteza entorrinal provocaba un aumento a largo plazo de la amplitud de los potenciales postsinápticos en células granulares del giro dentado. Este aumento fue denominado como potenciación a largo plazo (LTP). A partir de estos trabajos, la mayoría de las investigaciones se centraron en el análisis de los mecanismos intracelulares que determinan la plasticidad sináptica actividad-dependiente en sinapsis Glutamatérgicas. Aunque las interneuronas tienen un papel clave en la regulación de la excitabilidad y eficacia sináptica de neuronas piramidales (Dingledine and Langmoen, 1980; Chevaleyre and Castillo, 2004; Kullmann and Lamsa, 2007), sólo en la última década el estudio de los cambios plásticos en las sinapsis GABAérgicas se ha transformado en un importante foco de estudio para la neurobiología.

Sinapsis inhibitoria.

La inhibición neuronal en el SNC, depende en gran medida de la liberación del ácido gamma-aminobutírico (GABA) y la activación de receptores GABA. Se conocen tres tipos de receptores para GABA: ionotrópicos; GABA_A y GABA_C; metabotrópicos GABA_B (Luscher et al, 2011). En el hipocampo el receptor más expresado es GABA_A, complejo oligomérico formado por cinco subunidades, que al ensamblarse forman un canal específico para Cl⁻. En estado adulto, la unión de GABA a su receptor, provoca la apertura del canal y el flujo de iones cloruro hacia el interior celular, como el flujo de cationes de potasio hacia fuera de la neurona, jugando un papel fundamental en la inhibición sináptica rápida (Cortez-Romero et al., 2011; Sigel and Steinmann, 2012; Vithlani et al., 2011).

A pesar de la gran diversidad de interneuronas GABAérgicas en el hipocampo (Ascoli et al., 2008), la mayoría de los estudios se han centrado principalmente en un grupo de interneuronas que inervan la región somática de neuronas piramidales en la región de CA1 del hipocampo, denominadas "Basket cell" o células en canasto, las cuales participan tanto en la modulación, integración de información e inducción de plasticidad sináptica de circuitos neuronales. Estas interneuronas han sido subdivididas en dos grupos: interneuronas que expresan una proteína ligante de calcio, clasificadas como Parvalbuminas PV+ e interneuronas que expresan neuropéptidos de colecistoquinina denominadas CCK+ (Klausberger and Somogyi, 2008). Esta clasificación pueden ser realizada a partir de diferentes parámetros, tanto electrofisiológicos, morfológicos y moleculares (Freund and Buzsaki, 1996; Klausberger, 2009). Resulta interesante que a pesar de que morfológicamente sean similares, posean características electrofisiológicas distintas y que diversos neuromoduladores sean capaces de modificar la eficacia sináptica diferencialmente en cada grupo de interneuronas (Klausberger and Somogyi, 2008).

Tanto en sinapsis excitatorias como inhibitorias, la plasticidad a largo plazo es un fenómeno altamente regulado, donde la modificación de la concentración de calcio intracelular y la activación de varios efectores intracelulares, incluidos distintos tipos de kinasas, como la CAMKII o fosfatasa son elementos relevantes para la inducción de plasticidad sináptica actividad-dependiente. CAMKII es complejo proteico altamente expresado en hipocampo, posee dominios estructurales funcionalmente importantes que incluyen: Un dominio catalítico, un dominio auto-inhibidor, un segmento variable y un dominio de auto-asociación (Hudmon et al., 2002). La sensibilidad de la enzima CaMKII al calcio y la calmodulina, está determinada por los dominios variables y auto-inhibidor; el incremento intracelular de concentraciones de calcio produce la autofosforilación de la enzima volviéndola activa (Yang and Schulman, 1999), hasta que el residuo treonina 286, del dominio auto-inhibidor vuelva a desfosforilarla. La CaMKII, actúa fosforilando una amplia gama de sustratos que están involucrados en la transmisión sináptica (Colbran et al., 2004), pudiendo incluso interactuar directamente con receptores GABA_A de la membrana postsináptica. Esta interacción puede provocar un cambio en el número y/conductancia, lo cual en gran medida parece depender de la fosforilación de gefirina componente estructural esencial de sinapsis GABAérgicas (Moss and Smart, 1996; Brandon et al. 2002; Kittler and Moss, 2003). Además se ha demostrado que la aplicación

intracelular de CAMKII activada generan aumento en las corrientes inhibitorias en neuronas piramidales de CA1 (Catriona M. et al., 2009). Lo anterior sugiere que CAMKII puede ser un elemento esencial para aumentar la eficacia sináptica GABAérgica.

Neuromodulación de la Plasticidad sináptica inhibitoria

En nuestro laboratorio, se ha mostrado que la eficacia sináptica de la transmisión GABAérgica puede depender de la acción de diferentes neuromoduladores y neurotransmisores, los cuales son capaces de interactuar entre sí generando diversas formas de plasticidad sináptica. (Cachope, 2011; Mukherjee and Manahan- Vaughan, 2012; Picciotto et al., 2012). En particular, se demostró que el protocolo, denominado “*spike timing dependent plasticity*” (STDP), puede inducir LTP en sinapsis glutamatérgicas y simultáneamente generar LTD de corrientes postsinápticas inhibitorias. Fenómeno que requiere aumento de calcio postsináptico, liberación de endocannabinoides (eCBs), la activación de receptores para endocannabinoides del tipo-1 y la activación de receptores muscarínicos del tipo 2, los cuales provocan en la disminución de la probabilidad de liberación de GABA. Intracelularmente, este proceso estaría involucrada la activación en la terminal GABAérgica de la adenilato ciclasa/AMPC/proteína kinasa A (Ahumada et al., 2013). Es relevante el hecho que la transmisión GABAérgica también puede ser potenciada a largo plazo (LTP) (Arianna Maffei, 2011; Pablo E. Castillo, 2012). Los experimentos iniciales mostraron que esta potenciación inhibitoria puede ocurrir ocurre en corteza visual en respuesta a patrones de alta frecuencia de estimulación (Komatsu and Iwakiri, 1993), posteriormente estos trabajos de plasticidad GABAérgica se extendieron a distintas áreas del cerebro incluyendo al hipocampo, tronco encefálico y el área tegmental ventral (McLean et al., 1996; S.R. Glaum and P. A. Brooks, 1996; Madhavan et al., 2010; Nugent et al., 2007). Es destacable que la interacción de distintos sistemas de neurotransmisores y neuromoduladores, incluyendo el glutamato y la acetilcolina pueden modificar la eficacia de la transmisión GABAérgica. (Gaiarsa et al 2002; Dominguez et al, 2014, 2015).

La acetilcolina (ACh) es un neurotransmisor que puede modular la transmisión sináptica excitatoria e inhibitoria en el SNC (Cobb and Davies, 2005; Hasselmo, 1999). Activando distintos tipos de receptores colinérgicos, la ACh regula la excitabilidad y puede sincronizar activamente circuitos neuronales. Los receptores para ACh son clasificados en dos tipos los receptores muscarínicos y receptores nicotínicos (nACh-R) (Cobb and Davies, 2005; Lawrence et al., 2006; McQuiston and Madison, 1999; Widmer et al., 2006). Los receptores del tipo nicotínico, son proteínas pentaméricas compuestas de subunidades heterólogas; que actúan como canales iónicos, permeando cationes. Si bien es cierto, existen una gran variedad de nACh-R, en hipocampo encontramos principalmente, receptores $\alpha 7$ (homoméricos), los cuales presentan una gran permeabilidad a iones calcio, y receptores $\alpha 4\beta 2$ (heteroméricos), (Alkondon et al., 1997). Por otro lado, encontramos cinco tipos de receptores para ACh, asociados a proteína G, del tipo muscarínico (M1 a M5) (Buno et al., 2006; Fernandez- Fernandez et al., 1999; McQuiston and Madison, 1999). De los cuales, M1, M3 y M5 están acoplados a una proteína del tipo Gq que activa una cascada intracelular mediada por Fosfolipasa C (PLC), mientras que los subtipos M2 y M4 se encuentran acoplados a una proteína G inhibitoria (G_i/o), cuya activación inhibe la enzima adenilato ciclasa, disminuyendo la actividad de la proteína kinasa A (Caulfield, 1993; Caulfield and Birdsall, 1998). Recientemente, se ha demostrado que la activación de vías colinérgicas combinado con una despolarización en neuronas piramidales puede inducir potenciación de la transmisión GABAérgica, la cual parece depender de un aumento en la activación de la subunidad $\alpha 5\beta 2$ de receptores GABA hipocampal (Domínguez et al., 2013).

Por su parte glutamato (Glu), actuando sobre de receptores inotrópicos (iGluRs) y metabotrópicos (mGluRs), puede modificar la eficacia de la transmisión excitatoria e inhibitoria. Los receptores inotrópicos para glutamato, actúan como canales de cationes, y encontramos tres familias, los de N-metil-D-aspartato (receptores NMDA); los de ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (receptores AMPA); y los de kainato (receptores de kainato). En cuanto a los receptores metabotrópicos de glutamato, existen siete tipos, los cuales se dividen en tres grupos: el grupo I conformado por los receptores de los sub-tipos (1 y 5, acoplados a proteína Gq que media la activación de la PLC, y los grupos II (sub-tipos 2-3) y III (sub-tipos 4- 6 -7 y 8) acoplados a proteína G_i/o que inhibe la enzima adenilato ciclasa y una disminución de la actividad de la PKA (Sladeczek et al.,

1985; Sugiyama et al., 1987). Aunque está bien establecido que la activación de receptores metabotrópicos para glutamato puede inducir plasticidad sináptica a corto y largo plazo en sinapsis GABAérgicas, existe poca información que demuestre que la activación de receptores mGlu sea capaz de generar potenciación de la transmisión GABAérgica (Patenaude et al, 2003, 2005).

En nuestro laboratorio se demostró una nueva forma de plasticidad inhibitoria, el cual depende de la interacción entre los sistemas colinérgico y de eCBs en la inducción de iLTD (Ahumada et al., 2013). Recientemente hemos demostrado que la activación de vías colinérgicas facilita la inducción de plasticidad sináptica inhibitoria, lo que se traduce en una nueva forma de metaplasticidad sináptica (tesis Magister M. Moreno). En particular se observó que, la activación de vías colinérgicas mediante la aplicación exógena de ACh, induce una depresión a corto plazo (iSTD), interesantemente, si luego de 10 minutos de la aplicación de ACh, se activan fibras glutamatérgicas, mediante un protocolo de estimulación de alta frecuencia (HFS) o farmacológico por la aplicación de un agonista de mGluR del grupo I, es posible inducir potenciación a largo plazo de la transmisión inhibitoria iLTP (figura 1a). Resultados obtenidos recientemente en mi unidad de investigación, nos muestran que este tipo de iLTP GABAérgica necesita de la asociación temporal entre la activación de receptores M1 para Acetilcolina (m1ACh-R) y mGlu-R; donde el “*priming*” generado por la aplicación de ACh actuaría durante un tiempo aproximado de 10 minutos; para que se genere un efecto sinérgico al activar los mGlu-R del grupo I (figura 1b).

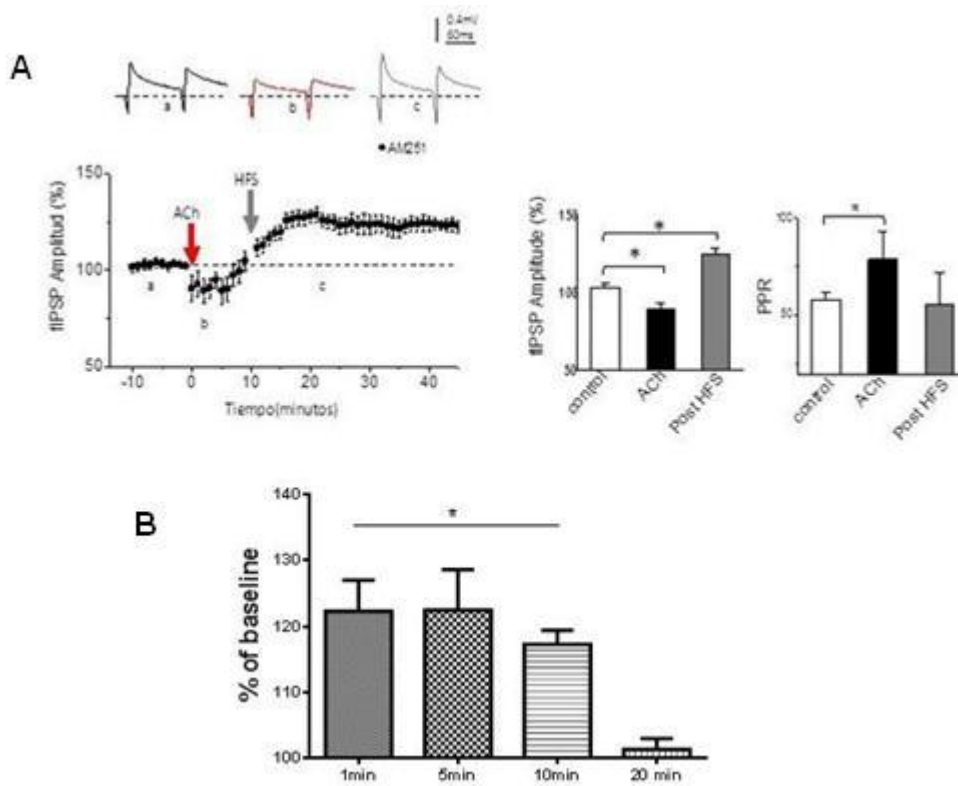


Figura 1: La activación temporal de las vías colinérgica y glutamatérgica mediante receptores metabotrópicos induce una iLTP. a) Arriba izquierda, se muestran los registros representativos en cada fase del protocolo, control (negro), post ACh (rojo) y post HFS (gris). Abajo, gráfico del promedio de las amplitudes de los fIPSP en función al tiempo ($n=7$), en el cual se muestra la aplicación en bolo de ACh ($5 \mu M$) (flecha roja) y 10 minutos después la aplicación del protocolo de HFS (flecha gris) en la región del stratum radiatum (fibras glutamatérgicas), hacia la derecha se muestran los gráficos de barra promedios representativos para los fIPSP y PPR durante las distintas fases del protocolo. **b)** Gráfico de barras en el cual se observa el tiempo donde la ACh es capaz de actuar como priming para generar el fenómeno de iLTP, luego de activar fibras glutamatérgicas. De esta manera, observamos que la actividad catalizadora de la ACh actuará durante un tiempo aproximado de 10 min.

IV. Planteamiento del problema

Planteamiento del problema

El fenómeno de plasticidad sináptica es un proceso neurobiológico que permite explicar cambios adaptativos, de conducta y procesos patológicos. La mayoría de los estudios sobre los mecanismos celulares que controlan diversas formas de plasticidad sináptica se han centrado principalmente en sinapsis del tipo Glutamatérgicas de varias estructuras cerebrales (Malenka and Bear, 2004; Malinow and Tsien, 1990; Zhou et al., 2004), siendo menos estudiado los mecanismos celulares que subyacen a la neuromodulación de la plasticidad sináptica GABAérgica. Procesos intracelulares vinculados a plasticidad sináptica, están relacionados al aumento o disminución en la concentración de Calcio, el cual podría activar diversos complejos proteicos, como la CaMKII, quien podría estar participando en la inducción de plasticidad sináptica inhibitoria. En nuestro laboratorio, hemos mostrado que la activación de receptores M1 de acetilcolina y metabotrópicos de glutamato del grupo I, son requeridos para inducir un tipo de potenciación a largo plazo (LTP) GABAérgica, fenómeno que requiere una asociación temporal entre la activación de las vías mediadas por acetilcolina y glutamato, contribuyendo esta última, en un aumento de la eficacia en la inducción de la iLTP. Sin embargo aún desconocemos los mecanismos postsinápticos que determinan la potenciación GABAérgica a largo plazo.

V. Hipótesis y objetivos.

Hipótesis

“La potenciación a largo plazo GABAérgica depende del aumento de calcio intracelular y la activación de la CaMKII”.

Objetivo general

Determinar si el aumento de calcio y la activación de CaMKII participan en la inducción de potenciación GABAérgica a largo plazo.

Objetivos específicos

- Determinar si la inducción de iLTP es dependiente del aumento de calcio postsináptico intracelular.
- Establecer si la inducción de iLTP depende de la activación de CAMKII

VI. Materiales y métodos.

Materiales y métodos

Para estudiar los mecanismos intracelulares por los cuales se lleva a cabo este tipo de potenciación a largo plazo GABAérgica, se utilizaron tanto técnicas farmacológicas y electrofisiológicas en registros inhibitorios de campo y patch-clamp.

Animales: Se utilizaron ratas Sprague-Dawley, las cuales fueron sacrificadas entre los 20-30 días post-natal, para la obtención de rebanadas de hipocampo. Para la obtención de rebanadas transversales de hipocampo, los animales fueron sacrificados por decapitación, previamente anestesiados con isoflurano (anestésico inhalatorio), una vez obtenido el cerebro, mediante craneotomía (en el menor tiempo posible, generalmente menos de un minuto), se sumergió en líquido cefalorraquídeo artificial (LCA, está compuesto por: 124.00 NaCl, 2.69 KCl, 1.25 KH₂PO₄, 2.00 Mg₂SO₄, 26.00 NaHCO₃, 2.00 CaCl₂ y 10.00 Glucosa, todas ellas en unidades de concentración mM) a 4°C. Luego de la extracción, el cerebro fue cortado en una zona anterior y posterior (Figura 2), para luego ser fijado a la cámara de corte, con una orientación coronal-frontal, utilizando pegamento cianocrilato. Posterior al proceso de fijación, el cerebro fue nuevamente sumergido en LCA a 4°C siendo constantemente burbujeadado con gas carbónico (95% O₂ y 5%CO₂). Las rebanadas de hipocampo se obtuvieron utilizando un vibratomo motorizado (Campden instruments, model MA752 Leicester, England). Con un grosor de 350 µm. Las rebanadas obtenidas se traspasaron a una cámara de incubación donde se mantuvieron en LCA a temperatura ambiente (23-25°C) y pH de 7.4, para posteriormente realizar registros electrofisiológicos de campo y patch-clamp.

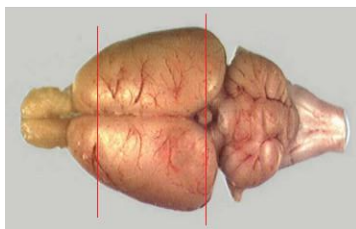


Figura 2: cerebro de rata obtenido por craneotomía, las líneas rojas muestran los cortes realizados previos a la fijación en la cámara de corte.

Farmacología

Ya que nuestra investigación se centró en la transmisión inhibitoria GABAérgica, se utilizaron antagonistas específicos para receptores inotrópicos de glutamato (NMDA-R y AMPA-R) los cuales fueron APV (10 μ M) y CNQX (10 μ M) respectivamente, nuestros experimentos se realizaron en presencia de AM251 (10 μ M), agonista inverso de receptores de endocannabinoides del tipo 1 (CB1-R). Estas fueron las drogas presentes como base en cada una de nuestros protocolos. La aplicación de nuevas drogas se utilizaron en experiencias en particular para responder preguntas específicas dentro de nuestra investigación, ya sea para identificar el tipo de receptores presentes en este fenómeno o para determinar los mecanismos intracelulares por los cuales se genera este tipo de potenciación a largo plazo. (Tabla n°1).

Fármaco	Función	Concentración
APV	Antagonista receptor inotrópico de glutamato (AMPA-R).	10 μ M
AM251	Agonista inverso eCBs-R	10 μ M
CNQX	Antagonista receptor inotrópico de glutamato (NMDA-R).	10 μ M
Acetilcolina	Activación de receptores tanto nicotínicos como muscarínicos.	5 μ M
DHPG	Agonista selectivo para grupo I de mGlu-R.	50 μ M
AFDX	Antagonista selectivo para mACh-R tipo 2.	10 μ M
MPEP	Antagonista selectivo para mGlu-R ₅ .	4 μ M
LY368385	Antagonista selectivo para receptor mGlu-R del grupo I.	100 μ M
Actinomicina	inhibidor de la transcripción del ADN	25 μ M
Atropina	Antagonista genérico de receptores muscarínicos.	1 μ M
MCPG	Antagonista no selectivo para mGlu-R.	50 μ M
BAPTA	Quelante de calcio	20 μ M
KN93	Bloqueador del complejo CAMKII	10 μ M

Tabla n°1: Fármacos utilizados para realizar registros electrofisiológicos de campo y patch-clamp, junto a su función y concentración respectiva

Electrofisiología

Como se mencionó anteriormente, se realizarán experimentos electrofisiológicos en campo, para analizar y registrar la actividad de poblaciones neuronales, en este caso la región CA1 de hipocampo y registros de patch-clamp, utilizando técnicas de fijación de voltaje, para analizar cambios y registrar la actividad neuronal de manera individual. Durante nuestros experimentos se utilizó un electrodo de estimulación y uno de registro, ambos posicionados en “*stratum pyramidale*” para estimular y registrar la actividad inhibitoria (Figura. 3). Durante todos los protocolos las rebanadas de hipocampo fueron perfundidas en LCA a temperatura ambiente (23-25°C).

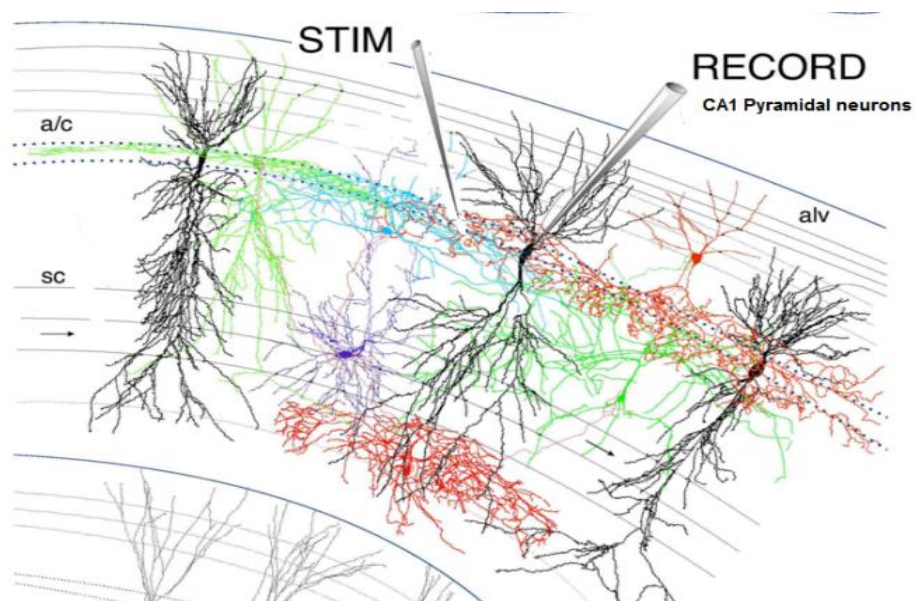


Figura 3: Montaje experimental para registros de neuronas en la región CA1 hipocampal, tanto para protocolos electrofisiológicos de patch-clamp como de campo

Registros de Patch-clamp.

La técnica de Patch-clamp, fue utilizada en su configuración célula entera (whole cell), usando micropipetas de registros hechas de vidrio boro-silicato, con un diámetro externo-interno: 1.5-0.84 mm; en cuyo interior iba posicionado el electrodo de plata clorurado (Ag/AgCl). Las pipetas se fabricaron utilizando un puller (*Sutter Instrument Co., P-97*) y llenadas con la solución intracelular correspondiente (ver soluciones de registro), la resistencia de las pipetas se encontraba en un rango de 4-6 MΩ. El electrodo de registro se encontraba conectado a un amplificador EPC-7 (HEKA instruments). Los experimentos realizados, se llevaron a cabo mediante la fijación de voltaje (i.e: voltaje holding; V_h), ajustándolo al potencial de reversión de las corrientes glutamatérgicas para el registro de las corrientes inhibitorias postsinápticas (IPSCs) (0.5 ± 0.9 mV). Las neuronas parchadas, solo fueron registradas cuando la resistencia del sello era superior a 1 GΩ y que la resistencia en serie no cambiase más de un 20% durante el experimento. Los registros fueron filtrados a 3 KHz y muestreados entre 6 y 10 KHz, a través de un conversor análogo-digital (ITC-16; Intrutech) y guardados en software Pulse Fit (Heka Instruments).

Registro electrofisiológico de campo.

Registros de potenciales postsinápticos de campo, se realizaron en presencia de antagonistas para receptores inotrópicos de glutamato ($10 \mu\text{M}$ APV y $10 \mu\text{M}$ CNQX). Los cuales fueron obtenidos utilizando un electrodo concéntrico (platino/iridio, FHC Inc.), el cual fue posicionado en el “stratum pyramidale” de hipocampo. Las pipetas para realizar los registros extracelulares (vidrio boro-silicato, 2-4MΩ y llenadas con LCA) fueron posicionadas también en “*stratum pyramidale*” y conectadas a un amplificador (P-5 Series, Grass), con una ganancia de 10,000x, filtro LP de 3.0 KHz y un filtro HP de 0.30 Hz. Además, Los registros de campo se llevaron a cabo en una cámara de registro utilizando una lupa (stereoscopic zoom microscope SMZ-2, NIKON, Japan), instrumentos montados sobre una mesa anti-vibratoria y dentro de una cámara de Faraday, con el fin de aislar toda transmisión externa a la zona de registro

Índice de Pulsos Pareados (PPR)

El estudio de la variación de amplitud de los fIPSP y IPSC, se realizó utilizando la prueba de razón por pulsos pareados. Protocolo que nos sugiere conocer si los cambios durante nuestra experimentación son a nivel pre o post-sinápticos. Este protocolo consta de dos pulsos eléctricos de igual magnitud, separados por un intervalo de tiempo de 60-80 ms. Como se ha explicado anteriormente, nuestro estudio se centra en la transmisión inhibitoria, que se caracteriza por poseer una PPR que presenta una alta probabilidad de liberación, en donde la primera respuesta generada por el primer pulso es de mayor amplitud que la segunda respuesta, este índice es calculado mediante la siguiente formula:

$$\text{PPR} = 1 - (\text{R2/R1}) \quad (1)$$

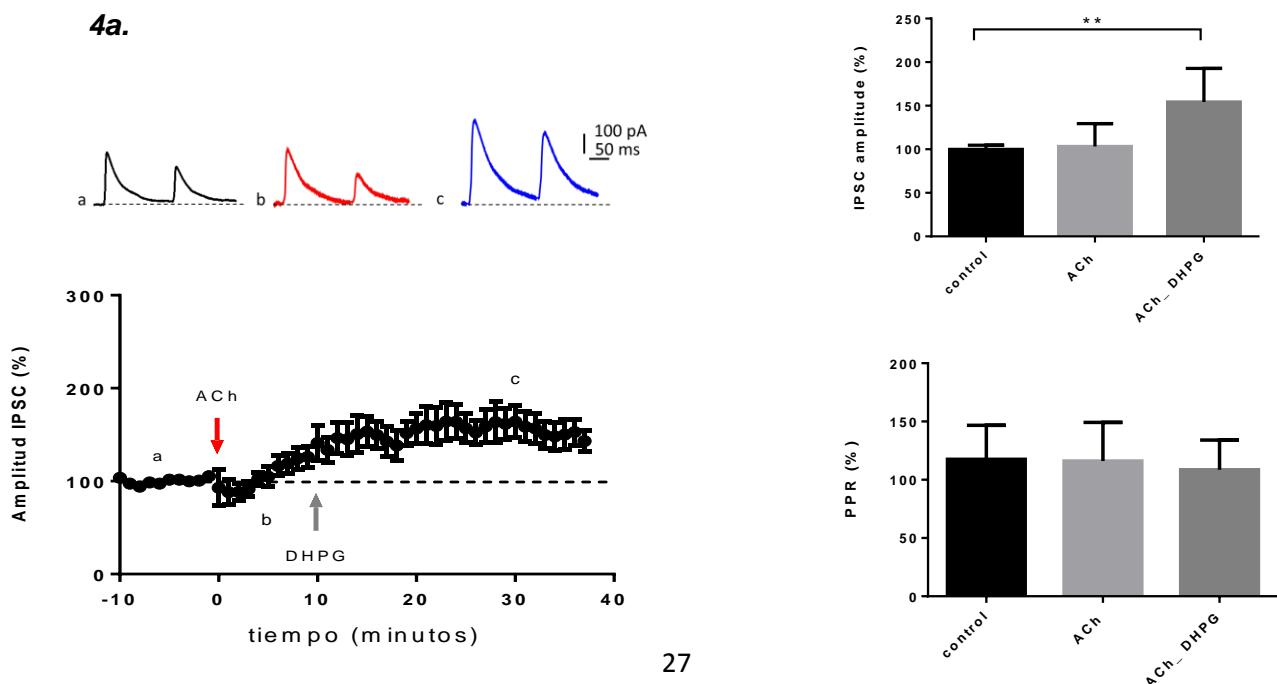
Donde R1 y R2 son los picos de amplitud de la primera y segunda corriente inhibitoria, respectivamente. Este índice nos permitió observar si se producen cambios a nivel pre-sináptico durante el transcurso de los ensayos experimentales.

VII. Resultados

Resultados

Inducción de la iLTP a nivel de célula única.

Existen evidencias sobre una nueva forma de plasticidad sináptica a largo plazo de la transmisión GABAérgicas inducida por la activación de mACh-R y mGlu. (Figura 1); sin embargo, para estudiar los mecanismos intracelulares vinculados a este fenómeno de iLTP, se realizó el mismo protocolo anteriormente descrito pero a nivel de célula única, mediante la técnica de patch-clamp. Al igual que en los registros de campo inhibitorios se aplicó ACh (5 μ M) en bolo y luego de 10 minutos se aplicó un agonista de los mGlu-R del grupo I, DHPG (50 μ M), perfundido constantemente con AM251. De esta manera, se puede observar que este protocolo, a nivel de célula única, es capaz de inducir un aumento de la amplitud de las IPSCs (figura 4a), obteniendo los siguientes valores: $100.2 \pm 0.6\%$ (control), $90.40 \pm 0.9\%$ (post ACh), $160.2 \pm 2.2\%$ (post DHPG). Adicionalmente no se observaron variaciones en la PPR de sinapsis inhibitorias: $117.6 \pm 13.0\%$ en control, $116.1 \pm 14.8\%$ post ACh, $108.6 \pm 11.4\%$ post DHPG. Mediante el uso de antagonistas genéricos tanto para los receptores mACh-R y mGlu-R (atropina y MCPG), se corrobora la que la activación de estos receptores metabotrópicos es requerida para la inducción de este fenómeno de plasticidad inhibitoria (figura 4b).



4b

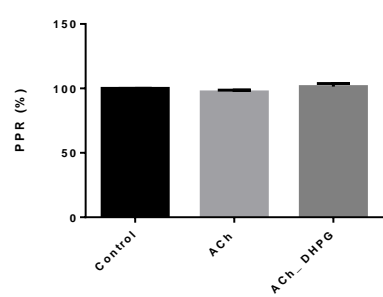
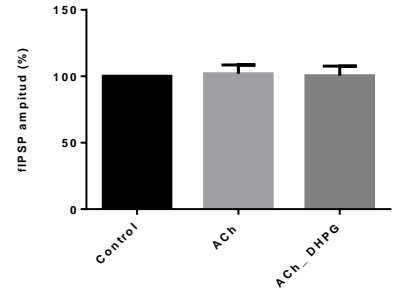
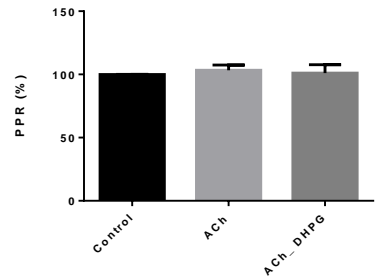
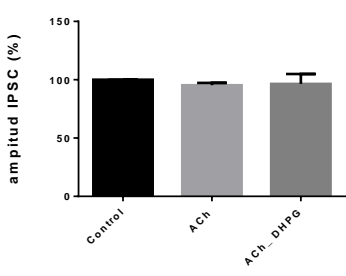
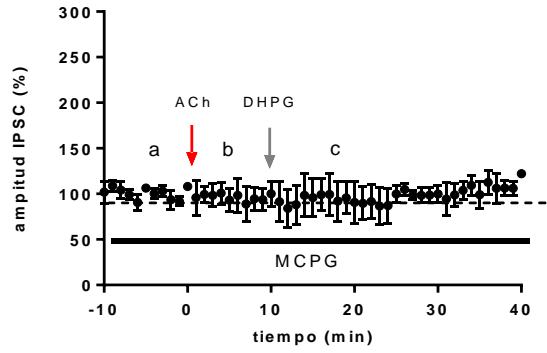
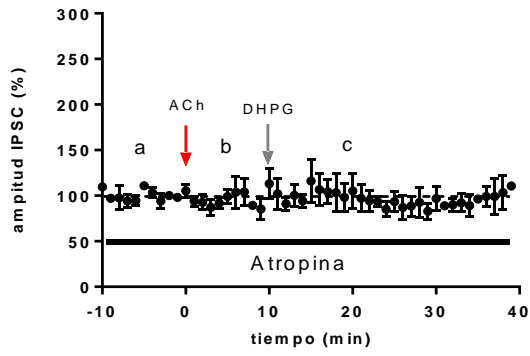
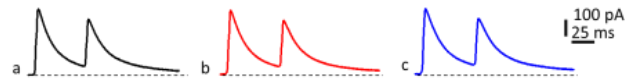
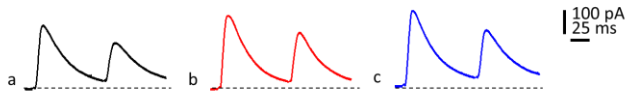


Figura 4: iLTP inducida a nivel de célula única, mediante solución intracelular de gluconato de Cesio. En **a**, izquierda arriba, registros representativos para las fases: control (negro); post ACh (rojo); post DHPG (azul). Izquierda abajo, gráfico de los promedios de la amplitud de los IPSC en función al tiempo, durante las fases de aplicación en bolo de ACh (flecha roja), 10 minutos después aplicación en bolo de DHPG (flecha gris). Derecha, gráficos de barra en porcentaje tanto para las variaciones de los IPSC y PPR durante todas las fases del protocolo de inducción de iLTP. En **b**, uso de antagonistas genéricos para los receptores metabotrópicos ACh y Glu, izquierda se muestra el gráfico promedio de los fIPSP en el experimento de perfusión continua con Atropina (n=4) versus el tiempo, en él se muestran los tiempos en los cuales fue aplicado el bolo de ACh (flecha roja) y DHPG (flecha gris), abajo se muestran los gráficos de barras representativos tanto para los fIPSP como PPR durante las fases del protocolo. Derecha, gráfico promedio de la amplitud de los fIPSP, durante la perfusión continua de MCPG (n=6) versus el tiempo, abajo se muestran los gráficos de barra representativos para fIPSP y PPR durante las fases del protocolo.

La Potenciación sináptica inhibitoria depende del aumento de calcio intracelular y la activación del complejo CAMKII .

La gran mayoría de los procesos intracelulares vinculados a plasticidad sináptica, están relacionados con variaciones en la concentración de Ca^{2+} intracelular. Debido a esto, que nos propusimos determinar si la inducción de iLTP mediada por ACh, era un fenómeno Ca^{2+} dependiente. Para ello aplicamos el mismo protocolo de inducción de iLTP (figura 4a) pero esta vez la solución intracelular de registro contenía un quelador de Ca^{2+} , BAPTA (20mM). Como se observa en la figura 5, la aplicación de ACh y DHPG es incapaz de inducir iLTP. Así, la amplitud de los IPSC son similares: $101.0 \pm 2.5\%$ en control; $104.4 \pm 3.2\%$ post ACh y $104.3 \pm 2.1\%$ post DHPG) $p < 0.05$, $n=4$.

Adicionalmente, determinamos que BAPTA no induce cambios a nivel presináptico. Así, el análisis de la PPR, mostró que la probabilidad de liberación de GABA se mantiene constante durante todo el experimento: 100.0 ± 2.3 (control); $96.59 \pm 4.1\%$ (post ACh); $96.56 \pm 6.1\%$ (post DHPG) $n=3$ (figura 5).

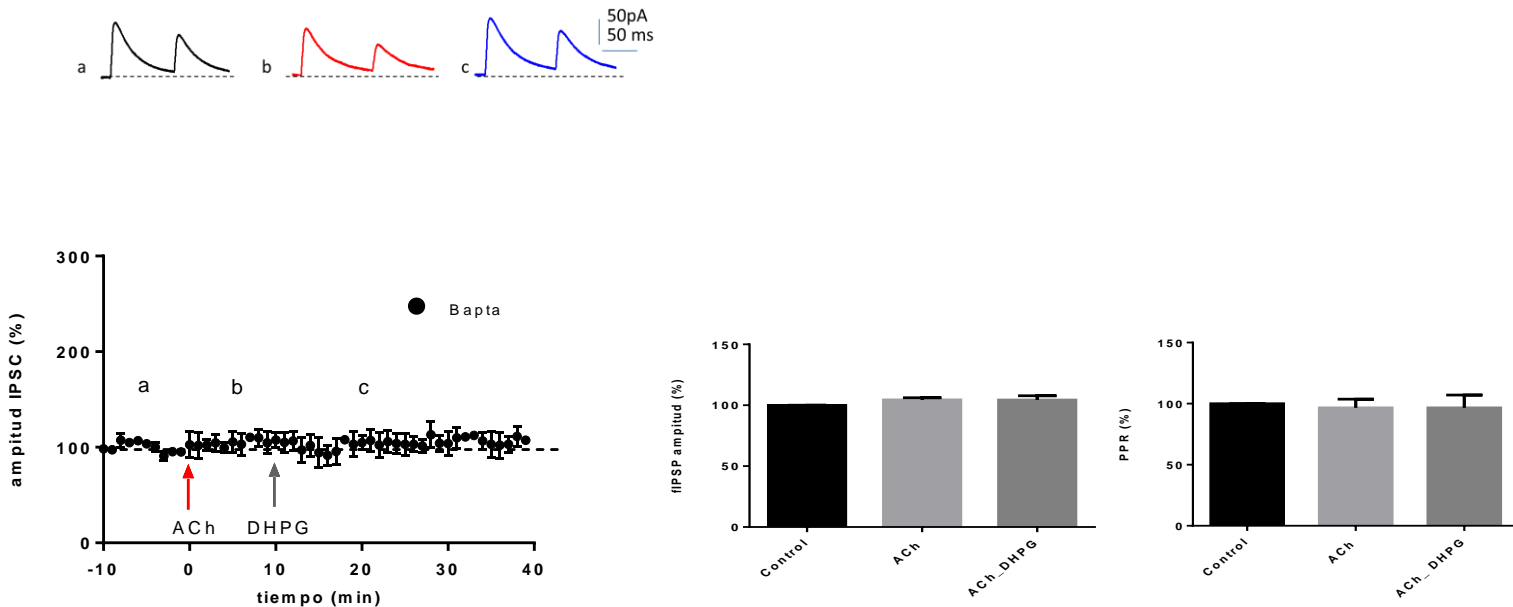


Figura 5: La iLTP mediada por ACh, es un mecanismo de plasticidad sináptica inhibitoria Ca^{2+} dependiente. Izquierda, grafico que muestra el promedio de la amplitud de los IPSC en función al tiempo, durante las fases del protocolo (bolo de ACh, flecha roja; bolo de DHPG, flecha gris), estos experimentos fueron realizados bajo la presencia de perfusión continua de AM251 y BAPTA disuelto en la solución intracelular de registro de gluconato de Cesio (ver tabla 1). Derecha, gráficos de barra de los porcentajes de variación tanto para los IPSC, como PPR durante las fases del protocolo.

El proceso de potenciación a largo plazo (LTP) es un fenómeno altamente regulado donde el sistema de segundos mensajeros intracelulares, juega un rol fundamental, especialmente aquellos que son dependientes de iones calcio. Una de estas enzimas, es la calcio-calmodulina quinasa de tipo II (CaM-KII) que desempeña un papel importante en la plasticidad sináptica. Los ratones transgénicos a los que se ha eliminado el gen que codifica para CaM-KII presentaban claros déficits en su capacidad para inducir LTP en hipocampo (Cooke and Bliss, 2006; Silva et al., 1992). De esta manera, nos propusimos determinar si la inducción de esta forma de plasticidad sináptica inhibitoria es dependiente de la actividad del complejo CAMKII. Realizamos el mismo protocolo descrito anteriormente pero esta vez utilizando un bloqueador del complejo proteico CAMKII, KN-

93 (10 μ M) disuelto en la solución de registro intracelular. Los resultados muestran que bajo el bloqueo de la CAMKII la aplicación de ACh y DHPG no modifica la amplitud de las IPSC. Así, los valores obtenidos fueron: 100.0 \pm 2.5% (control); 102.8 \pm 0.6 % (post ACh) ; 100.8 \pm 1.5 % (post DHPG), n=4 (figura 6). De manera similar los valores de la PPR no sufrieron mayores cambios: 100.0 \pm 1,0 % (control); 100.1 \pm 3.4 % (post ACh); 99.5 \pm 2.7 % (post DHPG), n=3 (figura 6).

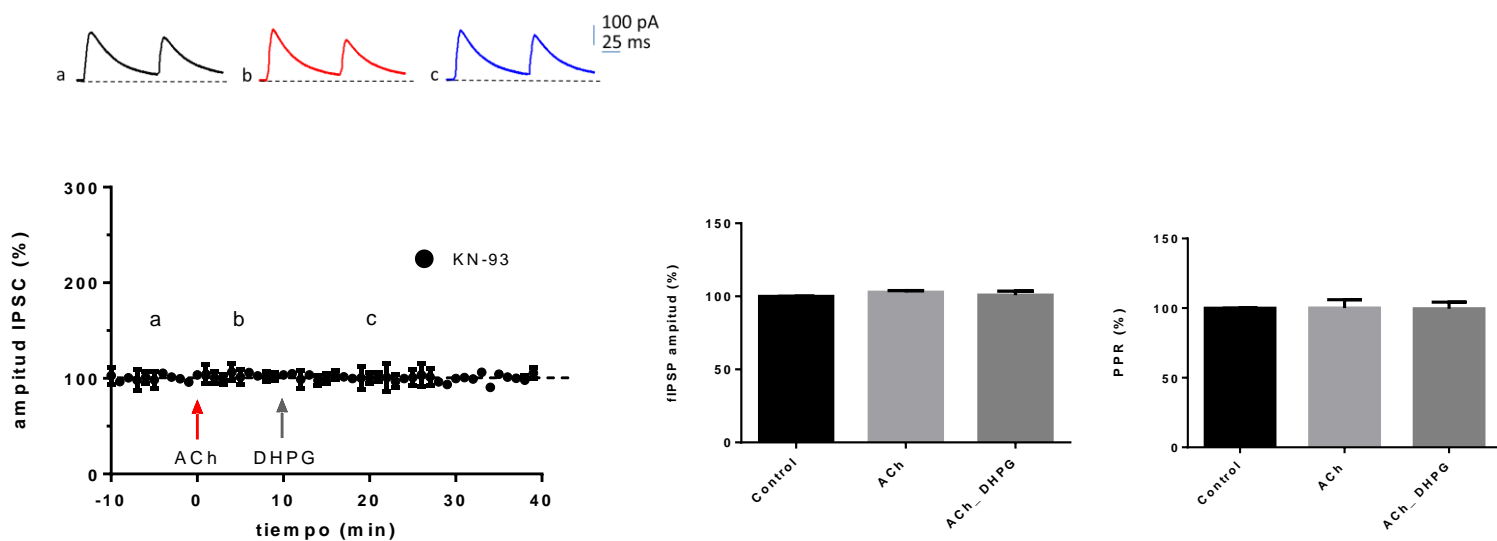


Figura 6: La iLTP necesita de la activación del complejo CAMKII. Izquierda, gráfico que muestra el promedio de la amplitud de los IPSC en función al tiempo, durante las fases del protocolo (bolo de ACh, flecha roja; bolo de DHPG, flecha gris), estos experimentos fueron realizados utilizando KN-93, disuelto en la solución intracelular de registro de gluconato de Cesio (ver tabla 1). Derecha, gráficos de barra de los porcentajes de variación tanto para los IPSC, como PPR durante las fases del protocolo.

La iLTP depende de la transcripción génica.

El proceso de LTP tiene dos fases; una fase temprana y una fase tardía. La primera fase requiere el tráfico de proteínas a través de la membrana sináptica pero no la síntesis de nuevas proteína (Bliss and Collingridge, 1993; Malenka and Bear, 2004). La fase tardía de la LTP depende de la síntesis de nuevas proteína y, por tanto, de la activación de ARNm (Frey et al., 1988; Patterson et al., 2001). Para determinar si este fenómeno de iLTP depende de la transcripción de nuevos genes, registramos los fIPSP y aplicamos un protocolo similar a los descrito anteriormente (ACh y DHPG aplicados un intervalo de 10 minutos), pero en presencia de un bloqueador de la transcripción, actinomicina (25 μ M). Los resultados muestran una potenciación de la fIPSP, se mantiene sólo durante los primeros 30 minutos luego de la aplicación de DHPG, volviendo a valores similares al control, (Figura 7). Los valores alcanzados fueron $104.0 \pm 2.5\%$ (control); $104.4 \pm 1.4 \%$ (post ACh); $129.1 \pm 3.8 \%$ (post DHPG, 30 min.); $107.2 \pm 3.5 \%$ (post DHPG, 60 min), n=5. Además observamos que durante todo el experimento no hubo variaciones de la PPR, cuyos valores alcanzaron $100.0 \pm 0.1\%$ en control, $100.5 \pm 0.8 \%$ post ACh, $96.68 \pm 3.1 \%$ post DHPG, 30 min y $101.2 \pm 2.9 \%$ post DHPG, 60 min.

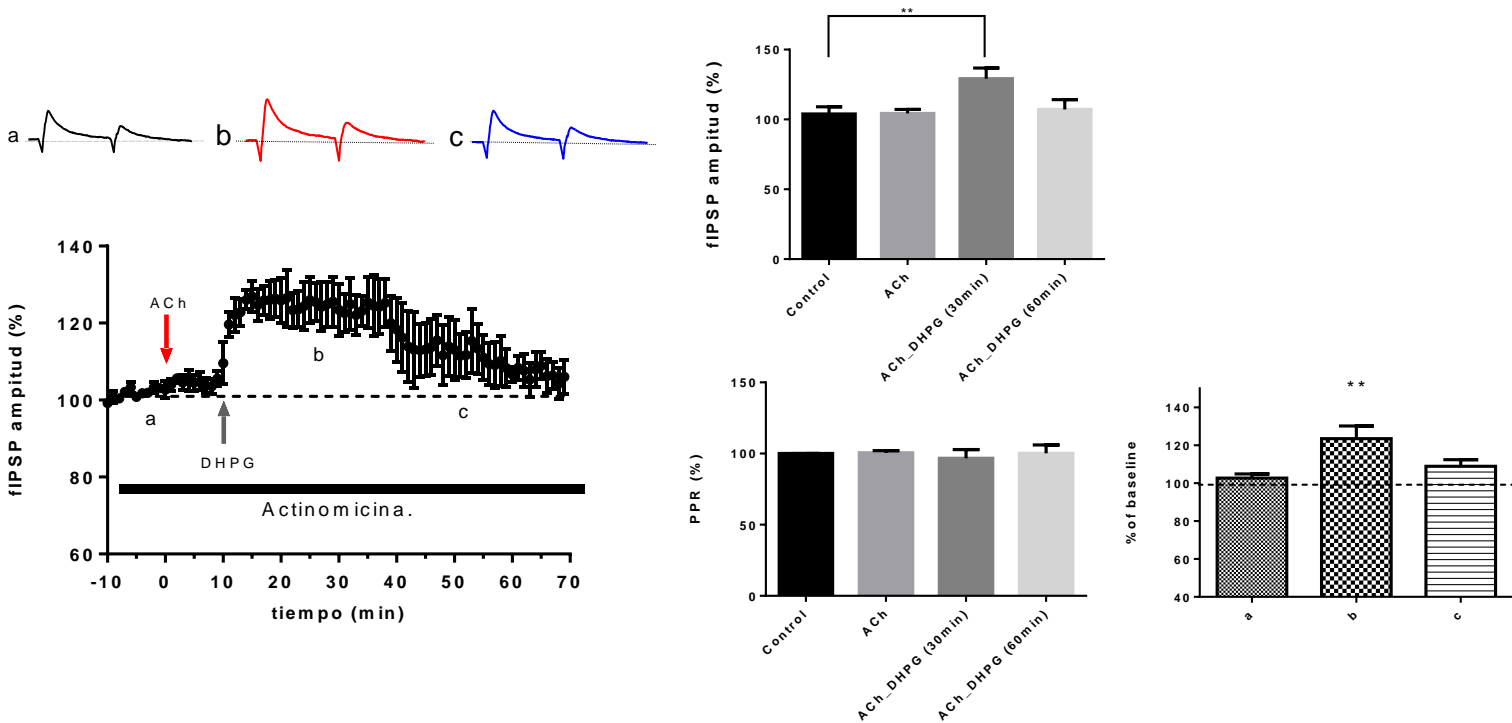


Figura 7: El fenómeno de iLTP, depende de la transcripción de nuevos genes. Arriba izquierda, se muestran los registros representativos en cada fase del protocolo, control (negro), los primeros 30 minutos luego de la aplicación de DHPG (rojo) y los últimos minutos 30 minutos luego de la aplicación de DHPG (azul). Abajo, gráfico del promedio de las amplitudes de los fIPSP en función al tiempo (n=6), en el cual se muestra la aplicación en bolo de ACh (5 μ M) (flecha roja) y 10 minutos después la aplicación en bolo de DHPG (flecha gris), en la presencia continua de actinomicina. Derecha, gráficos de barra, tanto para el promedio de los fIPSP, como la PPR durante todas las fases del protocolo.

VIII. Discusión.

Discusión

En este trabajo presentamos evidencia experimental que sugiere que la potenciación a largo plazo de la transmisión inhibitoria hipocampal dependiente de activación de receptores metabotrópicos de ACh y glu, que requiere a nivel postsináptico de un aumento de Calcio intracelular y la activación de la CaMKII.

ACh es capaz de generar distintas formas de plasticidad sináptica, principalmente en sinapsis excitatorias. En el presente trabajo mostramos que la ACh, posee una función de “primer”, que actúa durante un tiempo determinado (10 minutos aproximadamente) preparando a la neurona postsináptica, para la inducción de iLTP (figura 1). A nivel postsináptico, los receptores M1 de acetilcolina, se encuentran acoplados a una proteína del tipo G_q , la cual activa una cascada intracelular mediada por Fosfolipasa C (PLC) (Caufield, 1993; Hulme Ec, 1990), proceso que estaría vinculado a un aumento en el calcio intracelular, proveniente desde reservorios intracelulares, mediado por la liberación de un segundo mensajero (IP_3), (Mak & Foskett, 2014; Seo, Enomoto, Ishiyama, Stathopoulos, & Ikura, 2014). Diversos trabajos han mostrado que los reservorios intracelulares de Calcio desde el RE y la liberación de calcio inducida por Calcio (LCIC) desde estos depósitos intracelulares, pueden contribuir a la inducción y mantención de la potenciación de sinapsis excitatorias en el SNC. Además, la activación de M1, induce una disminución en las conductancias de K^+ , que puede generar una mayor despolarización celular a nivel post-sináptico (Bell, Bell, & McQuiston, 2013; Kruse, Hammond, & Hille, 2012), promoviendo la apertura de canales de Calcio dependiente de voltaje y el consiguiente aumento de Calcio intracelular.

Ahora bien, la activación de estos receptores M1 no son capaces por si solos de inducir la iLTP, ya que parecen requerir de una asociación temporal con otros sistema neuromoduladores, en nuestro caso del glutamatérgico. En este contexto los receptores mGlu-R del grupo I (mGLU-R₁; mGlu-R₅), expresados a nivel postsináptico, los cuales están acoplados a proteína G_q vía fosfolipasa C (Cohen and Abraham, 1996; Cohen et al., 1998) estarían jugando un rol fundamental, generando un efecto sinérgico y “potenciando” la vía de señalización intracelular previamente activada por los receptores M1 de acetilcolina.

Debido a que la activación de receptores M1 y mGlu del grupo I desencadenan un aumento del calcio intracelular, el paso siguiente fue estudiar si esta forma de potenciación es un fenómeno dependiente o independiente de calcio, para ello realizamos el protocolo de inducción de iLTP en registro de célula única, y utilizamos un quelador rápido de calcio, BAPTA, a nivel intracelular (figura 5). Bajo estas condiciones observamos que la inducción de iLTP fue bloqueada totalmente.

El aumento de Calcio intracelular, activaría un complejo proteico CAMKII, pudiendo modular la actividad de canales iónicos y otras proteínas quinasas implicadas en la transmisión sináptica e importantemente en el tráfico de receptores post-sinápticos, evento necesario para la expresión y mantención de la potenciación sináptica (Cuitino et al., 2010; Malenka et al., 1989; Malinow et al., 1989). De esta manera, CAMKII parece juega un rol fundamental en este forma de iLTP, pues al bloquear este complejo proteico utilizando KN-93 (figura 6), la potenciación a largo plazo no se produce. En nuestros experimentos la activación de CAMKII podría estar participando en la síntesis e inserción de receptores GABA_A en la membrana post-sináptico. El análisis de PPR y los experimentos realizados con BAPTA, nos sugieren que éste es un fenómeno es esencialmente post-sináptico, el cual podría deberse a un aumento en la expresión de receptores y/o un aumento en la conductancia de estos fenómeno que debemos analizar en profundidad.

La potenciación a largo plazo (LTP) tiene dos fases. Una fase temprana que requiere el tráfico de proteínas a través de la membrana sináptica pero no la síntesis de nuevas proteína (Bliss and Collingridge, 1993; Malenka and Bear, 2004). Y una fase tardía que depende de la síntesis de nuevas proteína y, por tanto, de la activación de ARNm (Frey et al., 1988; Patterson et al., 2001). Mientras que la primera fase de la LTP es transitoria, la segunda fase consiste en un proceso altamente regulado, con sus propios mecanismos de control, que llevan a la consolidación de cambios sinápticos (Bramham and Messaoudi, 2005). Aunque es preliminar, es interesante el hecho que nuestros resultados sugieran que esta forma de plasticidad requiera expresión génica y traducción proteica (figura 9). La mantención de LTP, requiere además de la síntesis de proteínas. Se determinó que anisomicina, un inhibidor de la síntesis de proteínas, podía bloquear el establecimiento de la potenciación a largo plazo en hipocampo (Frey et al. 1988). De esta manera, se

propone para experimentos futuros determinar si en esta forma de plasticidad inhibitoria es requerida la síntesis de proteínas.

En conjunto nuestros resultados sugieren que la activación de mACh-R, seguido por la aplicación de un protocolo de alta frecuencia en las colaterales de Schaffer o activación farmacológica de mGluR, induce potenciación a largo plazo de sinapsis GABAérgicas de la región de CA1 del hipocampo. Este mecanismo cooperativo de dos sistemas de neurotransmisores puede proveer un mecanismo sináptico, mediante el cual la plasticidad de sinapsis inhibitorias puede modular diferentes funciones cognitivas como el aprendizaje y memoria. Actualmente es aceptado que la neuromodulación GABAérgica es fundamental para la sincronización neuronal y el correcto funcionamiento de diferentes circuitos cerebrales (Field et al., 2011; Lewis et al., 2008) y alteraciones en la transmisión GABAérgica, están estrechamente vinculados a varios trastornos neuro-psiquiátricos tales como la esquizofrenia, epilepsia y depresión (Ford et al., 2007; Ford and Mathalon, 2008). Debido a que la actividad sincrónica entre distintos sistemas moduladores (ACh, eCBs, Glu), son capaces de aumentar o disminuir la eficacia sináptica de la transmisión inhibitoria (Ahumada et al., 2013; Domínguez et al., 2014), es relevante determinar el papel de los receptores de membrana y mecanismos celulares que subyacen a estas formas de plasticidad sináptica de la transmisión inhibitoria, ya que estos podrían ser un blanco terapéutico, para diversas enfermedades neurodegenerativas y neuro-psiquiátricas.

IX. Conclusiones.

Conclusiones.

A partir de nuestros resultados podemos concluir que:

1. La LTP GABAérgica mediada por el sistema colinérgico, requiere de la activación de receptores muscarínicos del tipo M1 y mGlu del grupo I.
2. Este fenómeno de plasticidad sináptica inhibitoria, necesita de la activación de proteínas G, del tipo Gq y del consiguiente aumento en los niveles de Ca^{2+} .
3. El fenómeno de iLTP, necesita la activación del complejo proteico CAMKII
4. Debe existir una asociación temporal (en una ventana temporal de no más de 10 minutos) entre la activación de receptores M1 de acetilcolina y metabotrópicos de glutamato, para la inducción de la iLTP.
5. La mantención de la iLTP, depende de la transcripción génica.

Los resultados presentados en este trabajo, presentan un fenómeno de plasticidad sináptica GABAérgica, el cual muestra como dos sistemas neuromoduladores (colinérgico y glutamatérgico) son capaces de interactuar y aumentar la eficacia sináptica inhibitoria en hipocampo de rata. A partir de este trabajo se abren nuevas interrogantes, como: ¿Este tipo de iLTP necesitara de la activación de la fosfolipasa C (PLC)?, ¿la iLTP, depende de inserción o difusión lateral de receptores $GABA_A$? , ¿Existe un cambio en las subunidades de los $GABA_A$ -R?, ¿La endocitosis de receptores GABA participa en la inducción o expresión de esta forma de iLTP?

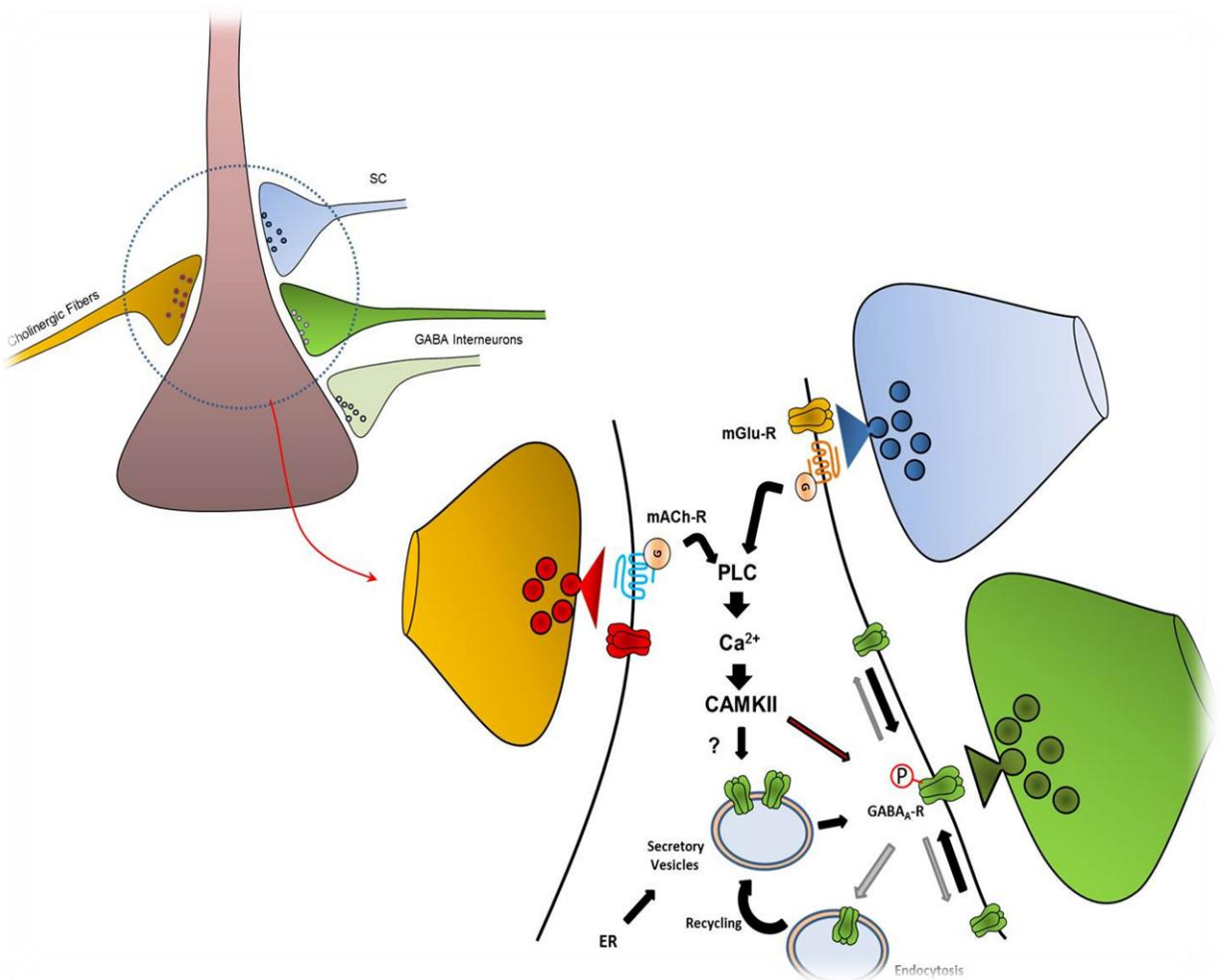


Figura8: Esquema representativo del mecanismo intracelular propuesto que explicaría este fenómeno de potenciación a largo plazo en este tipo de sinapsis GABAérgica; por medio de interneuronas que inervan la región somática de neuronas piramidales en la región CA1 del hipocampo. Donde la cascada rio abajo luego de la activación de mACh-R y mGlu-R, estaría asociado a la activación de PLC, proceso que estaría vinculado a la liberación de Ca^{2+} intracelular. La liberación de este ion activaría a CaMKII quien estaría participando en la fosforilacion de receptores GABA_A, cambiando su conductancia o aumentando la inserción de estos receptores en la membrana postsináptica.

X. Financiamiento.

Financiamiento

Los costos asociados a esta tesis, están vinculados con los siguientes proyectos:

- Fondecyt 1130614 Marco Fuenzalida.
- Fondecyt 1130491 Christian Bonansco.
- Núcleo milenio: NUmind NC 130011 Marco Fuenzalida.

XI. Referencias.

Ahumada J, Fernandez de Sevilla D, Couve A, Buno W, Fuenzalida M. 2013 Long-term depression of inhibitory synaptic transmission induced by spike-timing dependent plasticity requires coactivation of endocannabinoid and muscarinic receptors. *Hippocampus* 23(12):1439-52.

Alkondon M, Braga MF, Pereira EF, Maelicke A, Albuquerque EX. 2000. $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors and modulation of gabaergic synaptic transmission in the hippocampus. *Eur J Pharmacol* 393(1-3):59-67.

Alkondon M, Pereira EF, Barbosa CT, Albuquerque EX. 1997. Neuronal nicotinic acetylcholine receptor activation modulates gamma-aminobutyric acid release from CA1 neurons of rat hippocampal slices. *J Pharmacol Exp Ther* 283(3):1396-411.

A. Madhavan, A. Bonci, and J. L. Whistler, "Opioid-induced GABA potentiation after chronic morphine attenuates the rewarding effects of opioids in the ventral tegmental area," *Journal of Neuroscience*, vol. 30, no. 42, pp. 14029–14035, 2010.

Ascoli GA, Alonso-Nanclares L, Anderson SA, Barrionuevo G, Benavides-Piccione R, Burkhalter A, Buzsaki G, Cauli B, Defelipe J, Fairen A and others. 2008. Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* 9(7):557-68.

Bell, L. A., Bell, K. A., & McQuiston, A. R. (2013). Synaptic muscarinic response types in hippocampal CA1 interneurons depend on different levels of presynaptic activity and different muscarinic receptor subtypes. *Neuropharmacology*, 73, 160–73. <http://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.05.026>

Brandon N, Jovanovic J & Moss S (2002). Multiple roles of protein kinases in the modulation of γ -aminobutyric acid A receptor function and cell surface expression. *Pharmacol Ther* 94, 113–122.

Bliss TV, Lomo T. 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232(2):331-56.

Buno W, Cabezas C, Fernandez de Sevilla D. 2006. Presynaptic muscarinic control of glutamatergic synaptic transmission. *J Mol Neurosci* 30(1-2):161-4.

Buzsaki G. 1988. Polysynaptic long-term potentiation: a physiological role of the perforant path--CA3/CA1 pyramidal cell synapse. *Brain Res* 455(1):192-5.

Cabezas C, Buno W. 2006. Distinct transmitter release properties determine differences in short-term plasticity at functional and silent synapses. *J Neurophysiol* 95(5):3024- 34.

Cachope R. 2011. Functional diversity on synaptic plasticity mediated by endocannabinoids. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 367(1607):3242-53.

Caulfield MP. 1993. Muscarinic receptors--characterization, coupling and function. *Pharmacol Ther* 58(3):319-79.

- Caulfield MP, Birdsall NJ. 1998. International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev* 50(2):279-90.
- Cobb SR, Davies CH. 2005. Cholinergic modulation of hippocampal cells and circuits. *J Physiol* 562(Pt 1):81-8.
- Cohen AS, Abraham WC. 1996. Facilitation of long-term potentiation by prior activation of metabotropic glutamate receptors. *J Neurophysiol* 76(2):953-62.
- Cohen AS, Raymond CR, Abraham WC. 1998. Priming of long-term potentiation induced by activation of metabotropic glutamate receptors coupled to phospholipase C. *Hippocampus* 8(2):160-70.
- Cortez-Romero C, Fieni F, Russo P, Pepin M, Roux C, Pellerin JL. 2011. Presence of Maedi Visna virus (MVV)-proviral DNA in the genital tissues of naturally infected ewes. *Reprod Domest Anim* 46(1):e1-6.
- Creager R, Dunwiddie T, Lynch G. 1980. Paired-pulse and frequency facilitation in the CA1 region of the in vitro rat hippocampus. *J Physiol* 299:409-24.
- Cuitino L, Godoy JA, Farias GG, Couve A, Bonansco C, Fuenzalida M, Inestrosa NC. 2010. Wnt-5a modulates recycling of functional GABAA receptors on hippocampal neurons. *J Neurosci* 30(25):8411-20.
- Changeux JP, Edelstein SJ. 2005. Allosteric mechanisms of signal transduction. *Science* 308(5727):1424-8.
- Chevalyere V, Castillo PE. 2004. Endocannabinoid-mediated metaplasticity in the hippocampus. *Neuron* 43(6):871-81.
- Dan Y, Poo MM. 2004. Spike timing-dependent plasticity of neural circuits. *Neuron* 44(1):23-30.
- Dingledine R, Langmoen IA. 1980. Conductance changes and inhibitory actions of hippocampal recurrent IPSPs. *Brain Res* 185(2):277-87.
- Dominguez del Toro, E., Juiz, J. M., Peng, X., Lindstrom, J., & Criado, M. (1994). Immunocytochemical localization of the alpha 7 subunit of the nicotinic acetylcholine receptor in the rat central nervous system. *The Journal of Comparative Neurology*, 349(3), 325–42. <http://doi.org/10.1002/cne.903490302>
- Dominguez , Fernandez de Sevilla, Buño. 2013. Postsynaptic activity reverses the sign of the acetylcholine-induced long-term plasticity of GABA_A inhibition
- F. S. Nugent, E. C. Penick, and J. A. Kauer, "Opioids block long-term potentiation of inhibitory synapses," *Nature*, vol. 446, no. 7139, pp. 1086–1090, 2007.
- Fernandez-Fernandez JM, Wanaverbecq N, Halley P, Caulfield MP, Brown DA. 1999. Selective activation of heterologously expressed G protein-gated K⁺ channels by M2 muscarinic receptors in rat sympathetic neurones. *J Physiol* 515 (Pt 3):631-7.

- Fernandez de Sevilla D, Cabezas C, de Prada AN, Sanchez-Jimenez A, Buno W. 2002. Selective muscarinic regulation of functional glutamatergic Schaffer collateral synapses in rat CA1 pyramidal neurons. *J Physiol* 545(Pt 1):51-63.
- Frazier CJ, Strowbridge BW, Papke RL. 2003. Nicotinic receptors on local circuit neurons in dentate gyrus: a potential role in regulation of granule cell excitability. *J Neurophysiol* 89(6):3018-28.
- Freund TF, Buzsaki G. 1996. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6(4):347-470.
- Fucile S. 2004. Ca²⁺ permeability of nicotinic acetylcholine receptors. *Cell Calcium* 35(1):1-8.
- Gaiarsa JL, Caillard O, Ben-Ari Y. 2002. Long-term plasticity at GABAergic and glycinergic synapses: mechanisms and functional significance. *Trends Neurosci* 25(11):564-70.
- Givens BS, Olton DS. 1990. Cholinergic and GABAergic modulation of medial septal area: effect on working memory. *Behav Neurosci* 104(6):849-55.
- Griguoli M, Cellot G, Cherubini E. 2013. In hippocampal oriens interneurons anti-Hebbian long-term potentiation requires cholinergic signaling via alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurosci* 33(3):1044-9.
- Griguoli M, Cherubini E. 2011. Regulation of hippocampal inhibitory circuits by nicotinic acetylcholine receptors. *J Physiol*.
- Hasselmo ME. 1999. Neuromodulation: acetylcholine and memory consolidation. *Trends Cogn Sci* 3(9):351-359.
- H. A. McLean, O. Caillard, Y. Ben-Ari, and J. L. Gaiarsa, "Bidirectional plasticity expressed by GABAergic synapses in the neonatal rat hippocampus," *Journal of Physiology*, vol. 496, no. 2, pp. 471-477, 1996.
- Huerta PT, Lisman JE. 1993. Heightened synaptic plasticity of hippocampal CA1 neurons during a cholinergically induced rhythmic state. *Nature* 364(6439):723-5.
- Ivenshitz M, Segal M. 2006. Simultaneous NMDA-dependent long-term potentiation of EPSCs and long-term depression of IPSCs in cultured rat hippocampal neurons. *J Neurosci* 26(4):1199-210.
- John, D., Shelukhina, I., Yanagawa, Y., Deuchars, J., & Henderson, Z. (2014). Functional alpha7 nicotinic receptors are expressed on immature granule cells of the postnatal dentate gyrus. *Brain Research*, 1601, 15-30. <http://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.12.041>
- Kano M, Ohno-Shosaku T, Hashimoto-dani Y, Uchigashima M, Watanabe M. 2009. Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol Rev* 89(1):309-80.
- Kawaguchi SY, Hirano T. 2007. Sustained structural change of GABA(A) receptor-associated protein underlies long-term potentiation at inhibitory synapses on a cerebellar Purkinje neuron. *J Neurosci* 27(25):6788-99.

- Khiroug L, Giniatullin R, Klein RC, Fayuk D, Yakel JL. 2003. Functional mapping and Ca²⁺ regulation of nicotinic acetylcholine receptor channels in rat hippocampal CA1 neurons. *J Neurosci* 23(27):9024-31.
- Klausberger T, Somogyi P. 2008. Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. *Science* 321(5885):53-7.
- Kreitzer AC, Regehr WG. 2001. Cerebellar depolarization-induced suppression of inhibition is mediated by endogenous cannabinoids. *J Neurosci* 21(20):RC174.
- Kruse, M., Hammond, G. R. V, & Hille, B. (2012). Regulation of voltage-gated potassium channels by PI(4,5)P₂. *The Journal of General Physiology*, 140(2), 189–205. <http://doi.org/10.1085/jgp.201210806>
- Kittler JT & Moss SJ (2003). Modulation of GABA_A receptor activity by phosphorylation and receptor trafficking: implications for the efficacy of synaptic inhibition. *Curr Opin Neurobiol* 13, 341–347.
- Kullmann DM, Lamsa KP. 2007. Long-term synaptic plasticity in hippocampal interneurons. *Nat Rev Neurosci* 8(9):687-99.
- Lawrence JJ, Statland JM, Grinspan ZM, McBain CJ. 2006. Cell type-specific dependence of muscarinic signalling in mouse hippocampal stratum oriens interneurons. *J Physiol* 570(Pt 3):595-610.
- Levey AI, Edmunds SM, Koliatsos V, Wiley RG, Heilman CJ. 1995. Expression of m1-m4 muscarinic acetylcholine receptor proteins in rat hippocampus and regulation by cholinergic innervation. *J Neurosci* 15(5 Pt 2):4077-92.
- Luscher B, Fuchs T, Kilpatrick CL. 2011. GABA_A receptor trafficking-mediated plasticity of inhibitory synapses. *Neuron* 70(3):385-409.
- Llano I, Leresche N, Marty A. 1991. Calcium entry increases the sensitivity of cerebellar Purkinje cells to applied GABA and decreases inhibitory synaptic currents. *Neuron* 6(4):565-74.
- Maejima T, Ohno-Shosaku T, Kano M. 2001. Endogenous cannabinoid as a retrograde messenger from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals. *Neurosci Res* 40(3):205-10.
- Malenka RC, Bear MF. 2004. LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 44(1):5- 21.
- Malenka RC, Kauer JA, Perkel DJ, Nicoll RA. 1989. The impact of postsynaptic calcium on synaptic transmission--its role in long-term potentiation. *Trends Neurosci* 12(11):444-50.
- Malinow R, Schulman H, Tsien RW. 1989. Inhibition of postsynaptic PKC or CaMKII blocks induction but not expression of LTP. *Science* 245(4920):862-6.
- Malinow R, Tsien RW. 1990. Identifying and localizing protein kinases necessary for LTP. *Adv Exp Med Biol* 268:301-5.

Mak, D.-O. D., & Foskett, J. K. (2014). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in the endoplasmic reticulum: A single-channel point of view. *Cell Calcium*. <http://doi.org/10.1016/j.ceca.2014.12.008>

Markram H, Segal M. 1990. Electrophysiological characteristics of cholinergic and non- cholinergic neurons in the rat medial septum-diagonal band complex. *Brain Res* 513(1):171-4.

Mateos JM, Azkue J, Benitez R, Sarria R, Losada J, Conquet F, Ferraguti F, Kuhn R, Knopfel T, Grandes P. 1998. Immunocytochemical localization of the mGluR1b metabotropic glutamate receptor in the rat hypothalamus. *J Comp Neurol* 390(2):225-33.

McBain CJ, Freund TF, Mody I. 1999. Glutamatergic synapses onto hippocampal interneurons: precision timing without lasting plasticity. *Trends Neurosci* 22(5):228-35.

McQuiston AR, Madison DV. 1999. Muscarinic receptor activity has multiple effects on the resting membrane potentials of CA1 hippocampal interneurons. *J Neurosci* 19(14):5693-702.

Mesulam MM, Mufson EJ, Levey AI, Wainer BH. 1983. Cholinergic innervation of cortex by the basal forebrain: cytochemistry and cortical connections of the septal area,

diagonal band nuclei, nucleus basalis (substantia innominata), and hypothalamus in the rhesus monkey. *J Comp Neurol* 214(2):170-97.

Moss SJ & Smart TG (1996). Modulation of amino acid-gated ion channels by protein phosphorylation. *Int Rev Neurobiol* 39, 1–52.

Mohler H. 2006. GABA(A) receptor diversity and pharmacology. *Cell Tissue Res* 326(2):505-16.

Mukherjee S, Manahan-Vaughan D. 2012. Role of metabotropic glutamate receptors in persistent forms of hippocampal plasticity and learning. *Neuropharmacology* 66:65-81.

Moreno M, Tesis licenciatura : “Potenciación a largo plazo de la transmisión GABAérgica mediado por Acetilcolina, Universidad de Valparaíso, 2013.

Muller W, Misgeld U. 1989. Carbachol and pirenzepine discriminate effects mediated by two muscarinic receptor subtypes on hippocampal neurons in vitro. *Exs* 57:114-22. Navakkode S.

Korte M. 2012. Cooperation between cholinergic and glutamatergic receptors are essential to induce BDNF-dependent long-lasting memory storage. *Hippocampus* 22(2):335-46.

Neyman S, Manahan-Vaughan D. 2008. Metabotropic glutamate receptor 1 (mGluR1) and 5 (mGluR5) regulate late phases of LTP and LTD in the hippocampal CA1 region in vitro. *Eur J Neurosci* 27(6):1345-52.

Nugent FS, Hwong AR, Udaka Y, Kauer JA. 2008. High-frequency afferent stimulation induces long-term potentiation of field potentials in the ventral tegmental area. *Neuropsychopharmacology* 33(7):1704-12.

Olmos C, Sandoval R, Rozas C, Navarro S, Wyneken U, Zeise M, Morales B, Pancetti F.

2009. Effect of short-term exposure to dichlorvos on synaptic plasticity of rat hippocampal slices: involvement of acylpeptide hydrolase and alpha(7) nicotinic receptors. *Toxicol Appl Pharmacol* 238(1):37-46.

Park JY, Spruston N. 2012. Synergistic actions of metabotropic acetylcholine and glutamate receptors on the excitability of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* 32(18):6081-91.

Picciotto MR, Higley MJ, Mineur YS. 2012. Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior. *Neuron* 76(1):116-29.

Pitler TA, Alger BE. 1992. Cholinergic excitation of GABAergic interneurons in the rat hippocampal slice. *J Physiol* 450:127-42.

Pin, J.-P., & Acher, F. (2002). The metabotropic glutamate receptors: structure, activation mechanism and pharmacology. *Current Drug Targets. CNS and Neurological Disorders*, 1(3), 297–317. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12769621>

Prestori F, Bonardi C, Mapelli L, Lombardo P, Goselink R, De Stefano ME, Gandolfi D, Mapelli J, Bertrand D, Schonewille M and others. 2013. Gating of long-term potentiation by nicotinic acetylcholine receptors at the cerebellum input stage. *PLoS One* 8(5):e64828.

Rosato-Siri M, Cattaneo A, Cherubini E. 2006. Nicotine-induced enhancement of synaptic plasticity at CA3-CA1 synapses requires GABAergic interneurons in adult anti- NGF mice. *J Physiol* 576(Pt 2):361-77.

Sarihi A, Jiang B, Komaki A, Sohya K, Yanagawa Y, Tsumoto T. 2008. Metabotropic glutamate receptor type 5-dependent long-term potentiation of excitatory synapses on fast-spiking GABAergic neurons in mouse visual cortex. *J Neurosci* 28(5):1224- 35.

Schneider AW, Conrad S, Busch R, Otto U. 1991. The cold-knife technique for endourological management of stenoses in the upper urinary tract. *J Urol* 146(4):961-5.

Séguéla, P., Wadiche, J., Dineley-Miller, K., Dani, J. A., & Patrick, J. W. (1993). Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain alpha 7: a nicotinic cation channel highly permeable to calcium. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 13(2), 596–604. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7678857>

Seo, M.-D., Enomoto, M., Ishiyama, N., Stathopoulos, P. B., & Ikura, M. (2014). Structural insights into endoplasmic reticulum stored calcium regulation by inositol 1,4,5-trisphosphate and ryanodine receptors. *Biochimica et Biophysica Acta*. <http://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.11.023>

Shinoe T, Matsui M, Taketo MM, Manabe T. 2005. Modulation of synaptic plasticity by physiological activation of M1 muscarinic acetylcholine receptors in the mouse hippocampus. *J Neurosci* 25(48):11194-200.

Sigel E, Steinmann ME. 2012. Structure, function, and modulation of GABA(A) receptors. *J Biol Chem* 287(48):40224-31.

- Sladeczek F, Pin JP, Recasens M, Bockaert J, Weiss S. 1985. Glutamate stimulates inositol phosphate formation in striatal neurones. *Nature* 317(6039):717-9.
- S. R. Glaum and P. A. Brooks, "Tetanus-induced sustained potentiation of monosynaptic inhibitory transmission in the rat medulla: evidence for a presynaptic locus," *Journal of Neurophysiology*, vol. 76, no. 1, pp. 30–38, 1996.
- Sugiyama H, Ito I, Hirono C. 1987. A new type of glutamate receptor linked to inositol phospholipid metabolism. *Nature* 325(6104):531-3.
- Tang, Z.-Q., Liu, Y.-W., Shi, W., Dinh, E. H., Hamlet, W. R., Curry, R. J., & Lu, Y. (2013). Activation of synaptic group II metabotropic glutamate receptors induces long-term depression at GABAergic synapses in CNS neurons. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 33(40), 15964–77. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0202-13.2013>
- Takkala P, Woodin MA. 2013. Muscarinic acetylcholine receptor activation prevents disinhibition-mediated LTP in the hippocampus. *Front Cell Neurosci* 7:16.
- Tzounopoulos, T., Janz, R., Südhof, T. C., Nicoll, R. A., & Malenka, R. C. (1998). A role for cAMP in long-term depression at hippocampal mossy fiber synapses. *Neuron*, 21(4), 837–45. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9808469>
- Varma N, Carlson GC, Ledent C, Alger BE. 2001. Metabotropic glutamate receptors drive the endocannabinoid system in hippocampus. *J Neurosci* 21(24):RC188.
- Vithlani M, Terunuma M, Moss SJ. 2011. The dynamic modulation of GABA(A) receptor trafficking and its role in regulating the plasticity of inhibitory synapses. *Physiol Rev* 91(3):1009-22.
- Widmer A, Panek I, Hoger U, Meisner S, French AS, Torkkeli PH. 2006. Acetylcholine receptors in spider peripheral mechanosensilla. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 192(1):85-95.
- Wilsch VW, Behnisch T, Jager T, Reymann KG, Balschun D. 1998. When are class I metabotropic glutamate receptors necessary for long-term potentiation? *J Neurosci* 18(16):6071-80.
- Wilson RI, Nicoll RA. 2001. Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature* 410(6828):588-92.
- Y. Komatsu and M. Iwakiri, "Long-term modification of inhibitory synaptic transmission in developing visual cortex," *NeuroReport*, vol. 4, no. 7, pp. 907–910, 1993.
- Zhou Q, Homma KJ, Poo MM. 2004. Shrinkage of dendritic spines associated with long-term depression of hippocampal synapses. *Neuron* 44(5):749-57.
- Zhu YY, Jing L, Duan TT, Yuan Q, Cao J, Zhou QX, Xu L. 2013. Patterned high-frequency stimulation induces a form of long-term depression dependent on GABAA and mACh receptors in the hippocampus. *Neuroscience* 250:658-63.