



FACULTAD DE CIENCIAS

PROGRAMA DE LICENCIATURA EN CIENCIAS MENCIÓN BIOLOGÍA

**“POTENCIACIÓN A LARGO PLAZO DE LA TRANSMISIÓN GABAérgica
MEDIADA POR ACETILCOLINA”.**

**UNIDAD DE INVESTIGACIÓN II PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIADA EN CIENCIAS MENCIÓN BIOLOGÍA.**

MACARENA GIPSY MORENO FERNÁNDEZ.

**DIRECTOR
DR. MARCO FUENZALIDA.**

VALPARAÍSO, CHILE

2012

Agradecimientos

A mis Profesores

Dr Marco Fuenzalida, por su apoyo, paciencia para la culminación de mis estudios y elaboración de esta tesis; al Dr Christian Bonansco, por su apoyo ofrecido en este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio

Gracias por hacer del lugar de trabajo un ambiente grato, por la disposición de siempre ayudar, en especial a Juanito, por la paciencia que tuvo todo el año.

A mi Familia y amigos

Que durante este último año, fueron el pilar importante para el término de este proceso, gracias por el amor, contención y confianza.

A mi padre

Quizás no estuviste presente en de forma física, pero gracias a ti, tuve la oportunidad de realizar mis estudios y gracias a tus enseñanzas logre seguir adelante y finalizar este proceso que tu tanto anhelabas.

Índice

I.	Abreviaturas.....	4
II.	Resumen.....	7
III.	Marco teórico.....	9
IV.	Planteamiento del problema.....	15
V.	Hipótesis y objetivos.....	18
VI.	Metodología.....	20
VII.	Resultados.....	25
VIII.	Discusión.....	38
IX.	Conclusiones.....	41
X.	Financiamiento.....	43
XI.	Referencias.....	45

I. Abreviaturas

Abreviaturas

ACh: Acetilcolina

AM251: antagonista específico de CB1R.

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

Atropina: antagonista competitivo de mACh-R.

cAMP: AMP cíclico.

CB1-R: receptor de endocannabinoides tipo 1.

CCK: neuropéptido colecistoquinina

CNQX: antagonista del receptor AMPA/Kainato.

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.

GABA_A-R: receptor ionotrópico de GABA tipo A.

GABA_B-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 cefaloraquídeo artificial.

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

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

mACh-R: receptor de Acetilcolina del tipo muscarínico.

MCPG: antagonista no selectivo para receptores mGlu del tipo I y II.

mGlu-R: receptor metabotrópico de Glutamato.

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.

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

II. Resumen

Resumen

El concepto de plasticidad sináptica implica la capacidad del sistema nervioso (SN) para modificar sus circuitos de acuerdo con los requisitos del entorno. Numerosas evidencias sugieren que las modificaciones a largo plazo de la eficacia sináptica dependiente de actividad, como la potenciación o la depresión a largo plazo (LTP o LTD, respectivamente) es el sustrato celular del aprendizaje y la memoria. El estudio de los mecanismos celulares y moleculares, involucrados en la inducción, expresión, regulación y mantención de la eficacia sináptica, han sido centrados principalmente en la transmisión excitatoria. Sin embargo, los mecanismos celulares y circuitales involucrados en la inducción y expresión de la plasticidad sináptica inhibitoria han sido hasta ahora menos estudiados. Se ha demostrado que cambios en la eficacia de la transmisión inhibitoria es fundamental para el control de la excitabilidad de un circuito neuronal. Diferentes tipos de neurotransmisores y sustancias neuromoduladoras (Acetilcolina (ACh), endocannabinoides (eCBs) o Glutamato) pueden regular la eficacia de las sinapsis inhibitorias. Aunque la ACh, juega un papel fundamental en la modulación de la eficacia sináptica excitatoria, excitabilidad y la sincronización de los circuitos neuronales, su papel sobre la eficacia de la transmisión GABAérgica es menos conocida. Previamente hemos, mostrado que la co-activación de receptores muscarínicos y para eCBs tipo 1 (CB1-R) induce una depresión a largo plazo (LTD) en un subgrupo de interneuronas inhibitorias de hipocampo. Los resultados de esta tesis muestran que la activación conjunta de receptores metabotrópicos para ACh y Glutamato pueden inducir potenciación a largo plazo (LTP) en la sinapsis inhibitoria entre interneuronas y neuronas piramidales de CA1 de hipocampo.

Nuestros resultados sugieren que la activación de las vías colinérgicas parece ser esencial para mantener un correcto balance "inhibición-inhibición", fenómeno que actúa como mecanismo de metaplasticidad local, regulando la inducción de plasticidad a largo plazo en sinapsis excitatorias y controlar procesos cognitivos como el aprendizaje y memoria.

III. Marco teórico

Marco teórico

Se ha sugerido que procesos cognitivos, como el aprendizaje y memoria, dependen en gran medida de la eficacia de la transmisión de sinapsis existentes y de la generación de nuevas conexiones (Dan and Poo, 2006; Malenka and Bear, 2004) . Numerosas evidencias han demostrado que los cambios en la eficacia sináptica tanto a corto como largo plazo, representan el sustrato celular del aprendizaje y memoria (Gruart et al., 2006; Whitlock et al., 2006).

A partir de los trabajos de Bliss y Lomo en 1973, una gran cantidad de trabajos científicos han estudiado los mecanismos implicados en la inducción, expresión y mantención de la plasticidad a largo plazo en sinapsis Glutamatérgicas. Sin embargo, los procesos celulares y moleculares implicados en la inducción y expresión de plasticidad a largo plazo en sinapsis GABAérgicas han sido menos estudiados. (Ivshitz and Segal, 2006; Kawaguchi and Hirano, 2007; McLean et al., 1996; Nugent and Kauer, 2008).

Transmisión Inhibitoria

El ácido gamma-aminobutírico (GABA), es el principal neurotransmisor inhibitorio, en el sistema nervioso central adulto (SNC). GABA es liberado desde distintos grupos de interneuronas y neuronas GABAérgicas en el SNC, activando tres receptores: ionotrópicos GABA_A y GABA_C; metabotrópicos GABA_B (Luscher et al., 2011). La actividad de receptores GABA (GABA_A-R), está constituido por cinco subunidades distintas, que al ensamblarse, forman un poro o canal específico para Cl⁻, jugando un papel fundamental en la inhibición sináptica rápida. La transmisión inhibitoria juega un rol fundamental en la regulación de la excitabilidad de circuitos neuronales (Freund and Buzsaki, 1996; McBain et al., 1999). En distintas áreas cerebrales incluyendo al hipocampo, existe una gran diversidad de neuronas e interneuronas GABAérgicas, que inervan diferentes dominios sub-celulares, presentando diferentes funciones, dependiendo de la región neuronal que estas inerven (Ascoli et al., 2008). La mayoría de los estudios se centran principalmente en la innervación de interneuronas GABAérgicas, en dendritas de células piramidales de la región de CA1 hipocampal. En general las interneuronas se han clasificado en dos grandes grupos: interneuronas que expresan proteína ligando de Calcio, Parvalbuminas (PV+) e interneuronas que expresan neuropéptidos de colecistoquinina (CCK+),

(Klausberger and Somogyi, 2008). Las interneuronas CCK+, se caracterizan por poseer una frecuencia de disparo lenta (*slow-spiking*), mientras que las interneuronas PV+ presentan una frecuencia de disparo rápido (*Fast-spiking*). Resulta interesante que funcionalmente estas interneuronas sean diferentes y que la actividad de distintos neuromoduladores y neurotransmisores, sean capaces de modificar la eficacia de la transmisión inhibitoria.

Modificaciones a largo plazo de la eficacia de sinapsis GABAérgicas.

El estudio de los fenómenos de plasticidad sináptica a largo plazo LTP y LTD han sido centrados fundamentalmente en sinapsis de tipo excitatorio, en registros de neuronas piramidales e interneuronas, en diferentes estructuras cerebrales (Kullmann and Lamsa, 2007; Laezza and Dingledine, 2004; Lamsa et al., 2005; Malenka and Bear, 2004; Malinow and Malenka, 2002). Estos estudios se han realizado bajo el bloqueo selectivo de GABA_AR, fenómeno que está muy alejado de lo que sucede a nivel fisiológico en un circuito neuronal intacto (Freund and Buzsaki, 1996; Steele and Mauk, 1999).

Se ha demostrado que la eficacia sináptica en la transmisión GABAérgica puede experimentar cambios a corto y largo plazo. Esta forma de plasticidad sináptica están vinculados, con una modificación del número de receptores funcionales, un aumento o disminución en la probabilidad de liberación del neurotransmisor o el incremento en el número de sinapsis. Todos estos cambios están íntimamente ligados con la acción pre y/o postsináptica de diferentes neurotransmisores y sustancias neuromoduladoras (Cachope., 2011; Mukherjee and Manahan-Vaughan., 2012 ; Picciotto et al., 2012).

Acetilcolina, endocannabinoides y plasticidad sináptica.

El sistema Colinérgico juega un papel fundamental en el procesamiento de la información y funciones cognitivas. Sin embargo los mecanismos celulares y moleculares subyacentes son en gran parte desconocidos (Fernandez de Sevilla et al., 2008). El neurotransmisor Acetilcolina (ACh), es un importante neuromodulador de la transmisión sináptica excitatoria e inhibitoria en el SNC. Las principales vías colinérgicas centrales,

que inervan tanto la neocorteza e hipocampo provienen del Septum medial y banda diagonal de Broca (Givens and Olton, 1990; Mesulam et al., 1983). La acetilcolina regula la excitabilidad y sincronización de circuitos neuronales, activando dos tipos de receptores: ionotrópicos denominados receptores nicotínicos y del tipo metabotrópicos denominados muscarínicos. Se han determinado 5 tipos de receptores muscarínicos (mACh-R), los cuales se caracterizan por estar acoplados a proteína G, lo que les confiere diferentes propiedades. Por ejemplo, la activación continua del receptor muscarínico tipo 1 (mACh1-R) de acetilcolina, aumenta la excitabilidad en neuronas piramidales, mientras que la activación transitoria de este receptor, genera respuestas inhibitorias o excitatorias regulando la excitabilidad en los circuitos neuronales (Gulledge AT, Bucci DJ 2009). Además, se ha demostrado que la activación de receptores tipo M2 y nicotínicos, que están implicados en la disminución de las corrientes post-sinápticas inhibitorias, aumentando de la excitabilidad del circuito neuronal (Nunez et al., 2012 ; Zheng et al., 2012).

En los últimos años se ha establecido que el sistema endocannabinoides es uno de los sistemas moduladores más importantes involucrado en funciones fisiológicas (Freund et al., 2003; Piomelli, 2003), en procesos tales como coordinación motora, aprendizaje y memoria, control de emociones y desarrollo neuronal. Hasta el momento, han sido identificados dos tipos de receptores para endocannabinoides CB1-R y CB2-R, ambos pertenecen a una superfamilia de receptores acoplados a proteína G, caracterizados por presentar siete dominios transmembrana. Los receptores del tipo CB1-R se localizan principalmente en el SNC, la mayor densidad de CB1-R se encuentra en los ganglios basales, cerebelo y en hipocampo. Gracias a su amplia distribución en el SNC, el sistema de endocannabinoides ejerce importantes funciones, tales como la inhibición retrograda de la liberación de neurotransmisores (Chevalleyre et al., 2006; Kim et al., 2002; Marsicano and Lutz, 2006), control de la excitabilidad neuronal (Azad et al., 2003) y la regulación de diversas formas de plasticidad sináptica a largo plazo (Abush and Akirav, ; Chevalleyre and Castillo, 2004).

Cabe destacar que en áreas corticales, los CB1-R se expresan principalmente en subpoblaciones específicas de interneuronas GABAérgicas (Freund et al., 2003; Kim et al., 2002). La activación de CB1-R produce la inhibición de la adenilato ciclasa y provoca un descenso en los niveles de AMPc intracelular, de esta forma se ve afectada la

capacidad de fosforilación de proteínas quinasas dependientes de este nucleótido cíclico. El efecto combinado sobre ambos tipos de canales parece ser la base de la inhibición que los endocannabinoides ejercen sobre la liberación de neurotransmisores (Heifets et al., 2008).

Interacción entre los sistemas de eCBs y ACh

Uno de los mejores ejemplos para explicar la interacción entre sistemas eCBs y ACh, es la plasticidad sináptica a corto plazo en sinapsis GABAérgicas, la cual es mediada por eCBs, fenómeno denominado supresión de la inhibición inducida por despolarización. (Depolarization-induced suppression of inhibition, DSI) (Llano et al., 1991; Pitler and Alger, 1994; Wilson and Nicoll, 2002). Ha sido descrito que la activación del sistema colinérgico facilita la inducción de DSI por activación de receptores muscarínicos M1 y M3 post-sinápticos (Kim et al., 2002; Ohno-Shosaku et al., 2003), estos receptores al igual que los mGluRs activan cascadas intracelulares de síntesis y liberación de eCBs (Ohno-Shosaku et al., 2002; Varma et al., 2001). Se ha mostrado que terminales colinérgicos de algunas regiones del cerebro expresan el receptor CB1 (Harkany et al., 2005) y en hipocampo la liberación de ACh parece estar tónicamente regulada por el sistema de eCBs, cuya activación disminuye su concentración y el bloqueo de este sistema la aumenta (Gessa et al., 1997; Tzavara et al., 2003). Estos resultados, sugieren que la activación del sistema de eCBs puede modificar la eficacia de la transmisión colinérgica y por otro lado la ACh puede controlar la síntesis y liberación de eCBs.

Receptores metabotrópicos de Glutamato y plasticidad sináptica.

Glutamato es uno de los más importantes neurotransmisores excitatorios del SNC, el cual juega un papel fundamental en varias funciones del cerebro. Esta vía de señalización está formada por dos tipos de receptores ionotrópicos (de actividad rápida) y metabotrópicos (de actividad lenta), este último acoplado a proteína G (Sladeczek et al., 1985; Sugiyama et al., 1987). Varios trabajos han mostrado que la activación de mGlu-R puede ser determinante en la inducción de plasticidad sináptica a largo plazo en varias estructuras cerebrales (Neyman and Manahan-Vaughan, 2008; Wilsch et al., 1998).

En hipocampo y principalmente en interneuronas, están presentes receptores del tipo mGlu-R (Ferraguti et al., 1998; Mateos et al., 1998). La activación de estos receptores induce un aumento de Calcio intracelular contribuyendo en la despolarización de la neurona piramidal (Mannaioni et al., 2001). Se ha mostrado que la interacción entre el sistema colinérgico y glutamatérgico, puede inducir cambios en la transmisión sináptica excitatoria (Navakkode and Korte, 2012 ; Park and Spruston, 2012), lo que indica que la activación de receptores mGlu, puede contribuir en la generación de varias formas de modulación de eficacia sináptica.

IV. Planteamiento del problema.

Planteamiento del problema

La mayoría de los estudios sobre los mecanismos celulares de la plasticidad sináptica han estado centrados principalmente en sinapsis de tipo Glutamatérgicas, en neuronas piramidales así como en interneuronas en varias estructuras cerebrales (Laezza and Dingledine, 2004; Malenka and Bear, 2004; Malinow and Malenka, 2002; Zhou and Poo, 2004). En estos experimentos se bloquea selectivamente la transmisión inhibitoria, mediante el uso de antagonistas GABAérgicos, lo que está muy alejado de lo que ocurre a nivel fisiológico, donde la transmisión GABAérgica, cumple un rol esencial sobre la excitabilidad de los circuitos neuronales.

Aunque los mecanismos que subyacen a la modulación de la transmisión GABAérgica han sido poco estudiados, se ha sugerido que puede ser regulada por neuromoduladores, como la Acetilcolina y endocannabinoides, los cuales son capaces de generar cambios en la eficacia de sinapsis GABAérgica, contribuyendo así, a la mantención y regulación de la excitabilidad del circuito neuronal, generando un balance excitación-inhibición. Dado estos antecedentes, es posible resumir el planteamiento del problema en los siguientes puntos:

1- La inducción y expresión de la Potenciación a largo plazo de la transmisión GABAérgica implica procesos celulares pre y post sinápticos.

2- Acetilcolina, como neuromodulador, puede inducir tanto depresión y potenciación de la transmisión GABAérgica.

3- En nuestro laboratorio, se demostró que la co-activación de receptores muscarínicos tipo 2 (M2-R) y de eCBs del tipo 1 (CB1-R) induce una LTD en interneuronas hipocampales (probablemente CCK+), mediante la inactivación de la proteína Kinasa A (PKA) pre-sináptica.

Sin embargo se desconoce el efecto que ejerce la ACh sobre otro grupo mayoritario de interneuronas, Parvalbuminas (PV+) y los cambios generados en la eficacia sináptica inhibitoria en estas sinapsis y su contribución al balance "inhibición-inhibición" fenómeno que actúa como mecanismo de metaplasticidad local, regulando la inducción de plasticidad a largo plazo en sinapsis excitatorias y controlar procesos cognitivos como el aprendizaje y memoria.

V.Hipótesis y Objetivos

Hipótesis

La activación de receptores Colinérgicos y Glutamatérgicos induce LTP en las sinapsis inhibitorias entre interneuronas y neuronas piramidales de la región CA1 del Hipocampo.

Objetivo General

Determinar si la activación de receptores Colinérgicos (muscarinicos y/o nicotínicos) y metabotrópicos de Glutamato inducen LTP en sinapsis GABAérgicas hipocampales.

Objetivos específicos

Establecer la participación de receptores ACh y mGlu en la generación de iLTP (potenciación a largo plazo de la transmisión inhibitoria).

Identificar si la inducción de iLTP mediante la activación de receptores Colinérgicos y Glutamatérgicos ocurre a nivel pre y/o post sinápticos.

Determinar si la co-activación de receptores colinérgicos y glutamatérgicos, están implicados en la inducción de iLTP.

VI. Metodología

Metodología

Para estudiar los efectos provocados por la activación de receptores colinérgicos y mGlu-R, sobre la actividad inhibitoria en neuronas piramidales de CA1 de hipocampo de ratas, se utilizaron técnicas farmacológicas y electrofisiológicas, en registros inhibitorios de campo (fIPSP).

Animales

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley, para la obtención de rodajas de hipocampo. Estas fueron sacrificadas en un rango de 20-40 días post-natal.

Obtención de rodajas transversales de hipocampo

Los animales son previamente anestesiados, con isoflurano (anestésico inhalatorio), posteriormente se procede a la decapitación y la exposición del cerebro mediante craneotomía, este paso de extracción del cerebro debe realizarse rápidamente (menos de 1 minuto), siendo sumergido en líquido cefalorraquídeo artificial (LCA) el cual debe ser utilizado a una temperatura no mayor a 4°C, mediante esta temperatura se logra mantener la viabilidad celular, al detener los diferentes metabolismos presentes, este medio provee lo necesario y apropiado para la mantención del cerebro extraído. El 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, las cantidades están medidas en mM.

Posterior a su extracción, se realizan dos cortes uno anterior y posterior (figura I), de forma paralela entre ambos cortes, lo más recto posible, una vez realizado este paso, el cerebro es fijado en la base de cámara de corte, en orientación coronal-frontal, adherido con pegamento de cianocrilato, se sumerge nuevamente con el LCA a 4 °C siendo constantemente burbujeado con carbógeno (95% O₂ y 5%CO₂). Posteriormente se procede a la obtención de rebanadas transversales de hipocampo de 350-400 µm en un vibratomo motorizado (Campden instruments, model MA752). Las rodajas obtenidas de hipocampo son traspasadas a una cámara de incubación, donde se mantienen durante 30-60 minutos en LCA a temperatura ambiente (23-25°C), pH de 7,4 y burbujeado constantemente con carbógeno, para la recuperación del metabolismo neuronal.

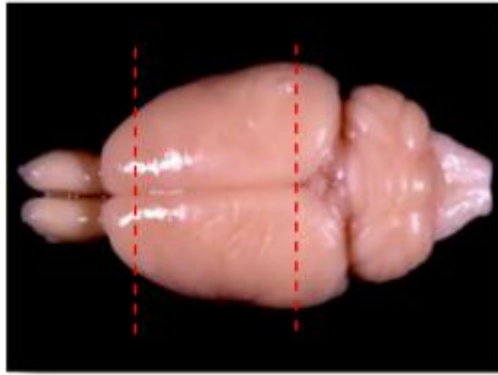


Figura 1: Cerebro extraído por craneotomía, se muestran los cortes realizados en el eje anterior-posterior.

Registro de campo

Una vez esperado el tiempo para la estabilización del metabolismo, la rodaja de hipocampo es llevada a una cámara de registro, la cual se encuentra adaptada con un microscopio (NIKON, made in Japan, modelo stereoscopic Zoom microscope SMZ-2). Montado, sobre una mesa anti-vibratoria, para la obtención de registros estables a largo plazo, el sistema debe ser aislado de la transmisión de vibraciones ambientales, para impedir la transferencia de artefactos eléctricos externos, esto se logra mediante la instalación de este sistema dentro de una cámara de Faraday. Además se posee un electrodo de registro, formado por un alambre de cloruro de plata (Ag/Ag Cl), el cual está dentro de una pipeta de vidrio/borosilicato, rellena con LCA, para lograr continuidad entre el electrodo y el medio donde se encuentra sumergida la rodaja de hipocampo. Estas pipetas se llevan a cabo en un estirador de pipetas (Sutter instrumentCo.Model P-27). En estos experimentos se utilizaron dos electrodos de estimulación donde uno está posicionado en el *stratum radiatum* (región de colaterales de Shaffer), el otro electrodo fue posicionado en el *stratum pyramidale*, para la estimulación de interneuronas. El electrodo de registro, fue posicionado también en el *stratum pyramidale*. Las rodajas fueron perfundidas con LCA a temperatura ambiente (23-25°C) con un flujo constante de aproximadamente 1 mL/minuto, de forma que el recambio completo de LCA en la cámara de registro es aproximadamente de 5 minutos, el LCA se utiliza para la perfusión de fármacos para posteriores estudios.

Farmacología

Las sustancias utilizadas para, perfundir las rodajas de hipocampo en el registro de campo, fueron añadidas al LCA, el cual es igual al utilizado para la obtención de los cortes transversales, a su vez acá juega un papel de “vehículo” para la acción de diferentes fármacos y como solución control.

Para el análisis de la modulación de ACh en la transmisión inhibitoria, las rodajas de hipocampo fueron perfundidas con APV y CNQX antagonistas de receptores inotrópicos de Glutamato NMDA-R y AMPA-R respectivamente, bloqueando así la vía excitatoria, además los análisis se realizaron en presencia de AM251 sustancia antagonista de receptores de endocannabinoides del tipo CB1-R, esta es la solución base a la cual fueron perfundidos las rodajas al momento del análisis de transmisión inhibitoria.

Para la comprobación de las moléculas implicadas en nuestro modelo de potenciación a largo plazo de la transmisión inhibitoria, por activación de receptores Colinérgicos y Glutamatérgicos, mediante la perfusión de ACh exógena, estos experimentos fueron realizados en presencia de antagonista de receptores colinérgicos del tipo muscarínicos, en nuestro caso, se utilizo Atropina, y además la utilización de un antagonista no selectivo para receptores metabotrópicos de Glutamato del tipo I/II MCPG.

Protocolo de HFS

Es un protocolo estándar utilizado por la mayoría de los investigadores para inducir LTP, la estimulación de alta frecuencia (HFS) consta de un tren de pulsos a frecuencias de 100-400 Hz capaces de inducir LTP (Buzsaki and Eidelberg, 1982; Muller and Kubie, 1989; Otto et al., 1991), este protocolo es capaz de generar diversos cambios plásticos en la actividad neural. Nosotros nos centramos en la estimulación del *stratum radiatum*, realizando un protocolo de HFS que consta de tres trenes de estimulación a 100 Hz (100 pulsos de 1 segundo repetido 3 veces, es decir se realizan 300 pulsos).

Índice de Pulsos Pareados (PPR)

Para reconocer si los cambios en la amplitud de las fIPSP en nuestros experimentos, correspondían a procesos pre o post sinápticos, se cálculo el índice o razón de pulsos pareados (PPR). Las sinapsis inhibitorias, se caracterizan por poseer un PPR, que representa una alta probabilidad de liberación, se denomina como depresión por pulsos pareados, la cual se caracteriza en que el primer pulso es de mayor amplitud que el segundo, el cual fue calculado por la siguiente formula.

$$DPP = 1 - \left(\frac{R2}{R1} \right)$$

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 en la probabilidad de liberación en el transcurso de los ensayos experimentales, permitiéndonos, poder identificar si estos procesos, están vinculados con mecanismos a nivel pre o post sinápticos (Marat et al ., 2006).

Análisis

El análisis de los registros fue llevado a cabo, con el programa Clampfit perteneciente al conjunto de programas denominado "pCLAMP 9" (Molecular Device, Chicago, IL. USA). Para la representación de las gráficas se utilizo el software computacional "Origin" (versión 6.0, Origin Lab Corp, MA, USA). El análisis estadístico y representación gráfica de los resultados se realizo mediante el programa Origin 6.0. Finalmente, se procedió a realizar análisis estadísticos usando la prueba t-student, considerándose como un parámetro de diferencias estadísticamente significativas a los resultados con P<0.05.

VII. Resultados

Resultados

La activación de receptores colinérgicos induce depresión a corto plazo (iSTD), en la transmisión inhibitoria, actuando a nivel pre-sináptico.

Para estudiar los efectos que genera la activación de receptores colinérgicos e identificar si este proceso ocurre a nivel pre o post sináptico, se realizó el siguiente protocolo: Para aislar solo la transmisión inhibitoria, se utilizaron dos antagonistas CNQX (10 μ M) y APV (25 μ M) para receptores AMPA y NMDA respectivamente, cabe destacar que todos nuestros protocolos fueron realizados bajo estas condiciones, una vez bloqueada la transmisión excitatoria, se utilizó un antagonista AM251 (10 μ M) de receptores eCB1-R, con la finalidad de dejar inactiva esta vía de señalización presente en algunos tipos celulares específicos (probablemente interneuronas CCK+). Se procede a registrar una línea basal durante 15 minutos y posterior a ello, luego de perfundir con ACh (5 μ M) durante 10 minutos, se puede observar (ver, figura 2A) que durante la perfusión de ACh, ocurre una depresión a corto plazo (iSTD), posteriormente se procede a lavar la acetilcolina del medio de perfusión, y la amplitud de los fIPSP vuelve al valor basal (101.0 \pm 101.2(control); 76.0 \pm 13.8 (ACh) ; 103.4 \pm 8.6 (post ACh) p < 0,05; n=5; figura 2A).

Para reconocer si los cambios generados en la activación de receptores colinérgicos durante la iSTD son generados a nivel pre o post sinápticos, se utilizó la prueba de modificaciones en los pulsos pareados (PP) (Creager et al., 1980) . El signo y magnitud de la razón por pulsos pareados, depende de la probabilidad de liberación del neurotransmisor, la sinapsis con mayor probabilidad de liberación, muestra una depresión por pulsos pareados (DPP), mientras que la sinapsis con menor probabilidad de liberación muestra una facilitación por pulsos pareados (FPP) (Buno et al., 2006). Se observa que todas los fIPSP analizados, mostraron DPP, mientras el índice de PP (ver figura 2C), lo que indica que hay una disminución en la probabilidad de liberación, además señala que es un proceso que ocurre a nivel pre-sináptico, en el periodo post ACh, se observa una DPP, la cual no muestra cambios significativos comparados con la situación control, (61.0 \pm 4.1(control) ; 69.2 \pm 3.6(ACh); 58.0 \pm 1.8 (post ACh) p< 0,05; n=5 figura 2C) entre la situación control y perfusión con ACh.

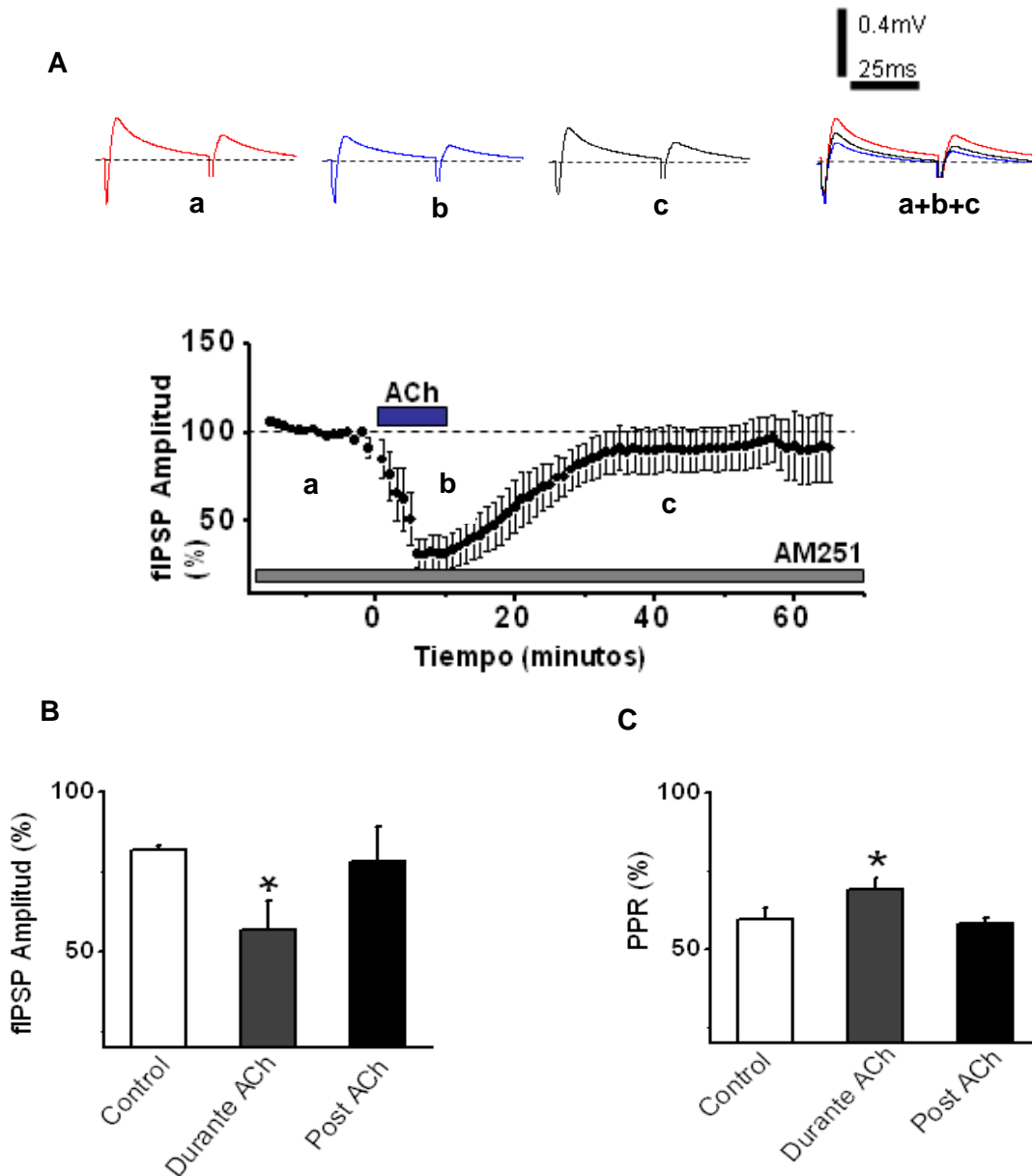


Figura 2. **ISTD depende de la activación de receptores colinérgicos pre-sinápticos.** En A (arriba) se muestran los registros de fIPSP (n=5) en situación control (rojo), en presencia de ACh (5 μ M) (azul) y post lavado de ACh (negro). Abajo, los promedios de las amplitudes de los fIPSP en función del tiempo. En B se muestra la grafica de los promedios de las amplitudes de los fIPSP durante la situación control, en presencia de ACh y post ACh. En C, se muestran los promedios de la PPR en situación control y los pasos antes mencionados, de este protocolo.

Protocolo de HFS induce iLTD en sinapsis Gabaérgica entre interneuronas y neuronas piramidales

Como ha sido descrito la activación de receptores metabotrópicos de Glutamato (mGlu-R), induce la síntesis y liberación de eCBs (Castillo et al., 2006). Una vez liberado el eCBs se une a su receptor CB1-R (en la membrana pre-sináptica). Se ha determinado que la activación de CB1-R puede activar vías de señalización e inducir una disminución en la probabilidad de liberación (Freund, 2003; Lovinger, 2008). En la figura 3A se muestra el protocolo de HFS (100Hz), realizado en solución control (APV y CNQX), en el cual se estimulan fibras Glutamatérgicas del *stratum radiatum*, observándose una disminución en la amplitud de los fIPSP, lo que nos sugiere la activación de mGlu-R y liberación de eCBs. (100.8 ± 1.5 (control); 81.64 ± 2.5 (post HFS) $p < 0,05$; $n= 3$, figura 3 A, círculos negros).

Para demostrar que la iLTD es dependiente de la activación de CB1-R, se realizó el mismo protocolo de HFS, en presencia de AM251 ($10\mu\text{M}$), un antagonista de CB1-R, donde se puede observar que el fenómeno fue completamente bloqueado (Figura 3A, círculos blancos). La amplitud de los fIPSP (100.7 ± 1.1 (control); 102.8 ± 3.6 (post HFS) $p < 0,05$; $n=3$, figura 3 A, círculos blancos).

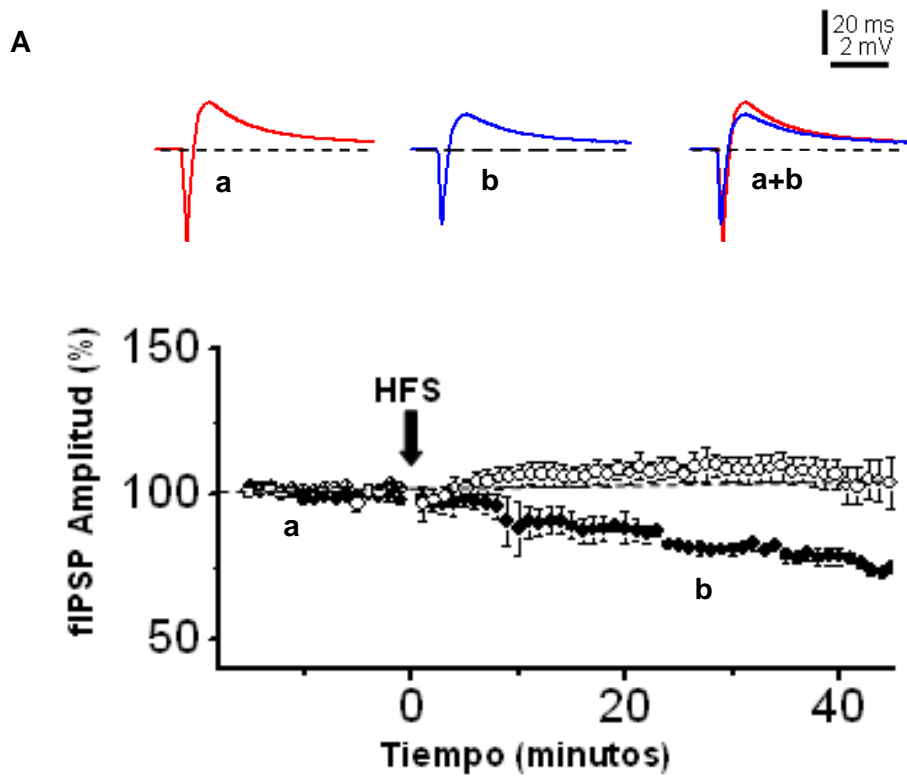


Figura 3. La activación de CB1-R induce iLTD en sinapsis sensibles a eCBs. En A arriba, se muestran los registros en situación control (rojo) y post HFS (sin AM251) (negro). Abajo, se muestran los promedios de las fIPSP en función al tiempo, donde los círculos blancos representa al protocolo en presencia de AM251 (10 μ M) y los círculos negros, representa al protocolo, realizado en la solución control (APV y CNQX).

La activación de receptores Colinérgicos y metabotrópicos de Glutamato, inducen iLTP.

Estudios previos en nuestro laboratorio, se demostró que la co-actividad de receptores CB1-R y mACh-R induce iLTD, actuando sobre interneuronas que expresan CB1-R, probablemente interneuronas CCK+. A partir de ello, nuestro estudio se centro, en la activación de receptores ACh-R y mGlu-R, donde bloqueamos selectivamente la señalización mediada por eCBs, mediante la presencia de AM251, durante todo el experimento este constaba de la activación de receptores colinérgicos, mediante la presencia de ACh exógena durante 10 minutos, posterior a ello esta es sacada del medio de perfusión, después de 20 minutos, se aplica el protocolo de HFS, se puede observar (figura 4A) que posterior al HFS, hay una significativa potenciación de la transmisión GABAérgica denominada aquí iLTP. Los valores alcanzados fueron 82.5 ± 7.3 % (durante ACh) y 155.3 ± 7.2 % post (HFS) $p < 0,05$; $n=7$ figura 4A).

Para identificar si la inducción de este fenómeno de plasticidad sináptica, es generado a nivel pre o post sinápticos, o si esta vinculado en un cambio a nivel de la probabilidad de liberación del neurotransmisor, se analizó la PPR, donde se observa (figura 4C), que en presencia de la aplicación de acetilcolina induce una una disminución de la DPP, la cual nos indica que hay una disminución en la probabilidad de liberación del neurotransmisor, señalando que la expresión de este fenómeno nivel pre-sináptico, corroborando lo visto en el experimento anterior (figura 2), al analizar la PPR post HFS, se observa que no hay cambios significativos, en comparación con el control, lo que nos indica que hay una recuperación de la liberación o los cambios son a nivel post-sináptico (53.1 ± 3.9 (control); 60.6 ± 3.1 (ACh); 52.2 ± 3.0 (post HFS) $p < 0,05$ figura 4C).

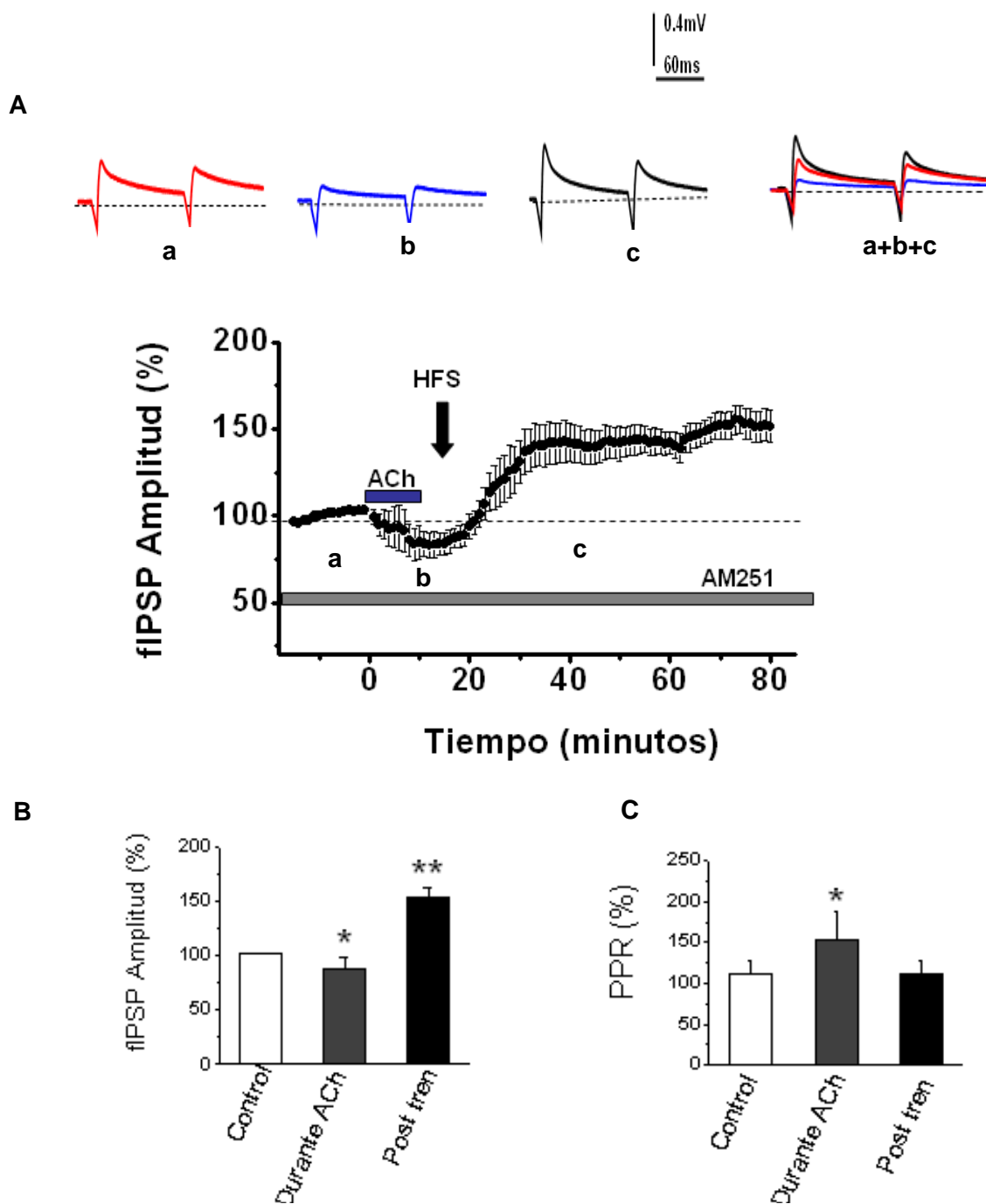


Figura 4. La activación de ACh-Rs y Glu-Rs induce iLTP. En A, arriba se observan los registros en situación control (rojo); en presencia de ACh (azul) y post HFS (negro). Abajo se muestran los promedios de los fIPSP en función al tiempo, el protocolo se llevo a cabo en presencia de AM251 (10 μ M), además el tiempo en que fue profundida la ACh (5 μ M) durante 10 minutos, flecha negra indica el momento donde fue aplicado el HFS. En B, se muestra el grafico promedio de las amplitudes de los fIPSP, en situación control, con ACh y post HFS. En C, se muestran los promedios de los PPR, durante las distintas fases del protocolo.

Balance inhibición-inhibición, generado por la activación de interneuronas sensibles e insensibles a eCBs.

Para demostrar que la generación de iLTP (figura 4A), se produce en células insensibles a eCBs, realizamos el mismo protocolo anterior, pero esta vez sin bloquear al CB1-R. Observamos que la iSTD inducida por la activación de ACh-R es independiente de la activación de eCB-R, en cambio al realizar el protocolo HFS, no se genera iLTP. La amplitud de los fIPSP, vuelve a su valor basal. (101.7 ± 1.4 (control); 62.4 ± 17.4 (ACh); 98.3 ± 17.2 (post HFS) $p < 0.05$; $n=5$ figura 5A). Además al analizar los promedios obtenidos en la PPR, se observan cambios en la probabilidad de liberación al igual que en el experimento en presencia de AM251 (figura 4C), (59.6 ± 3.5 (control); 76.6 ± 4.2 (ACh) ; 58.7 ± 3.7 (post HFS) $p < 0,05$; $n=6$; figura 5C).

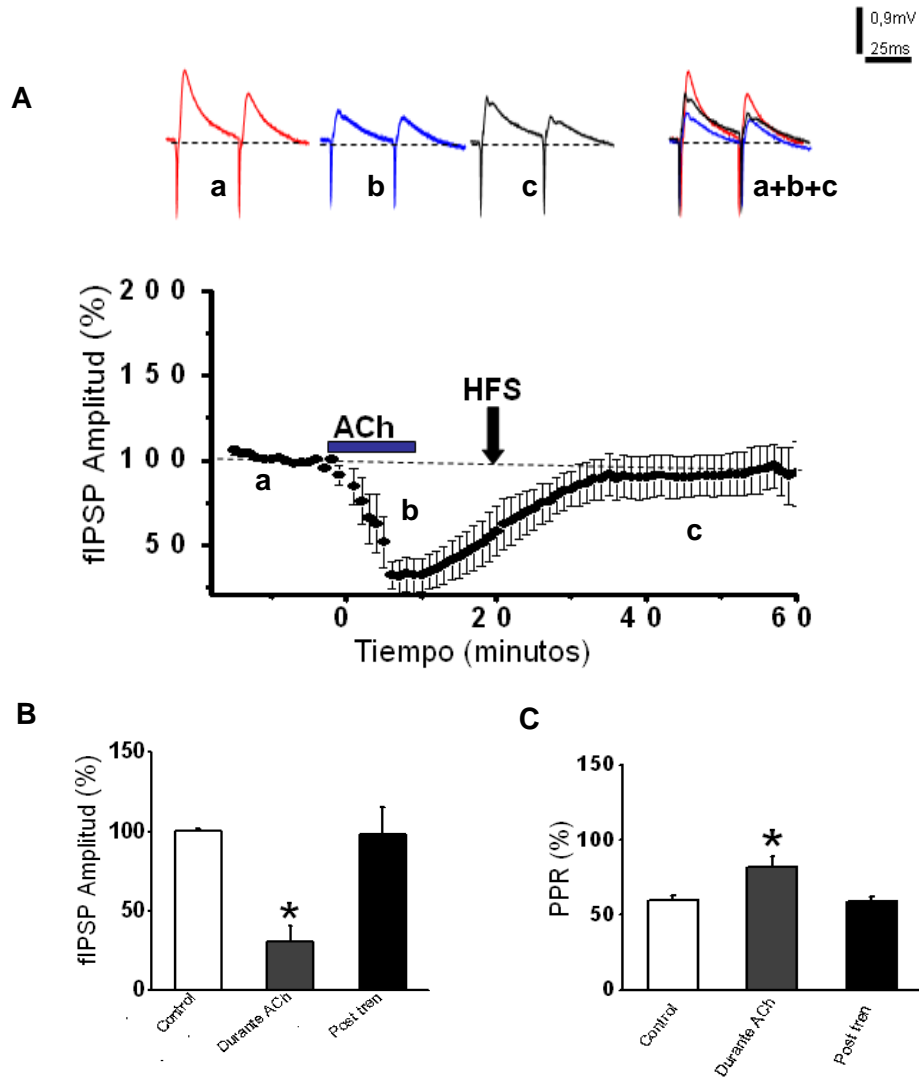


Figura 5. **Balance inhibición- inhibición, por activación de interneuronas sensibles e insensibles a eCBs.** En A, arriba se muestran los registros, control (rojo), en presencia de ACh (azul) y post HFS (negro). Abajo, grafico del promedio de las amplitudes de los fIPSP en función al tiempo, donde se muestra el tiempo de perfusión con ACh (5 μ M) durante 10 minutos, flecha negra indica el momento donde fue aplicado el protocolo de HFS. En B, se muestra los gráficos de los promedios de las amplitudes, en situación control, durante la perfusión de ACh y post HFS. En C, grafico de los promedios de la PPR, durante las fases del protocolo.

La activación de receptores muscarínicos, esta implicada en la inducción de iLTP.

Para demostrar que la activación de receptores muscarínicos de ACh están implicados en la inducción de iLTP, se realizó el mismo protocolo donde se perfunde con ACh (10 μ M) durante 10 minutos y después de 20 minutos de lavado se procede a realizar el protocolo de HFS, pero en este experimento se realizó en presencia de Atropina (10 μ M), la cual es un antagonista de receptores muscarínicos, además de la perfusión continua de AM251 (10Mm). Se observó que la generación de la iSTD, durante la perfusión de ACh disminuyo, la amplitud de los fIPSP, cae un 10% en comparación con la línea basal en presencia de Atropina (96.6 \pm 3.1 (control); 84.6 \pm 4.01 (ACh); 94.8 \pm 2.9 (post HFS) $p > 0,05$; $n = 7$ figura 6A). Al analizar los datos arrojados en la PPR, no se observan cambios significativos, durante las fases del protocolo (58.5 \pm 4.7 (control); 60.5 \pm 4.6 (ACh); 58.4 \pm 3.9 (post HFS) $p > 0,05$ $n = 7$ figura 2C). Además, después de aplicar el protocolo de HFS, no hay generación de la iLTP, lo que nos indica que la activación de receptores a nivel pre-sináptico es necesarios para la inducción de iLTP.

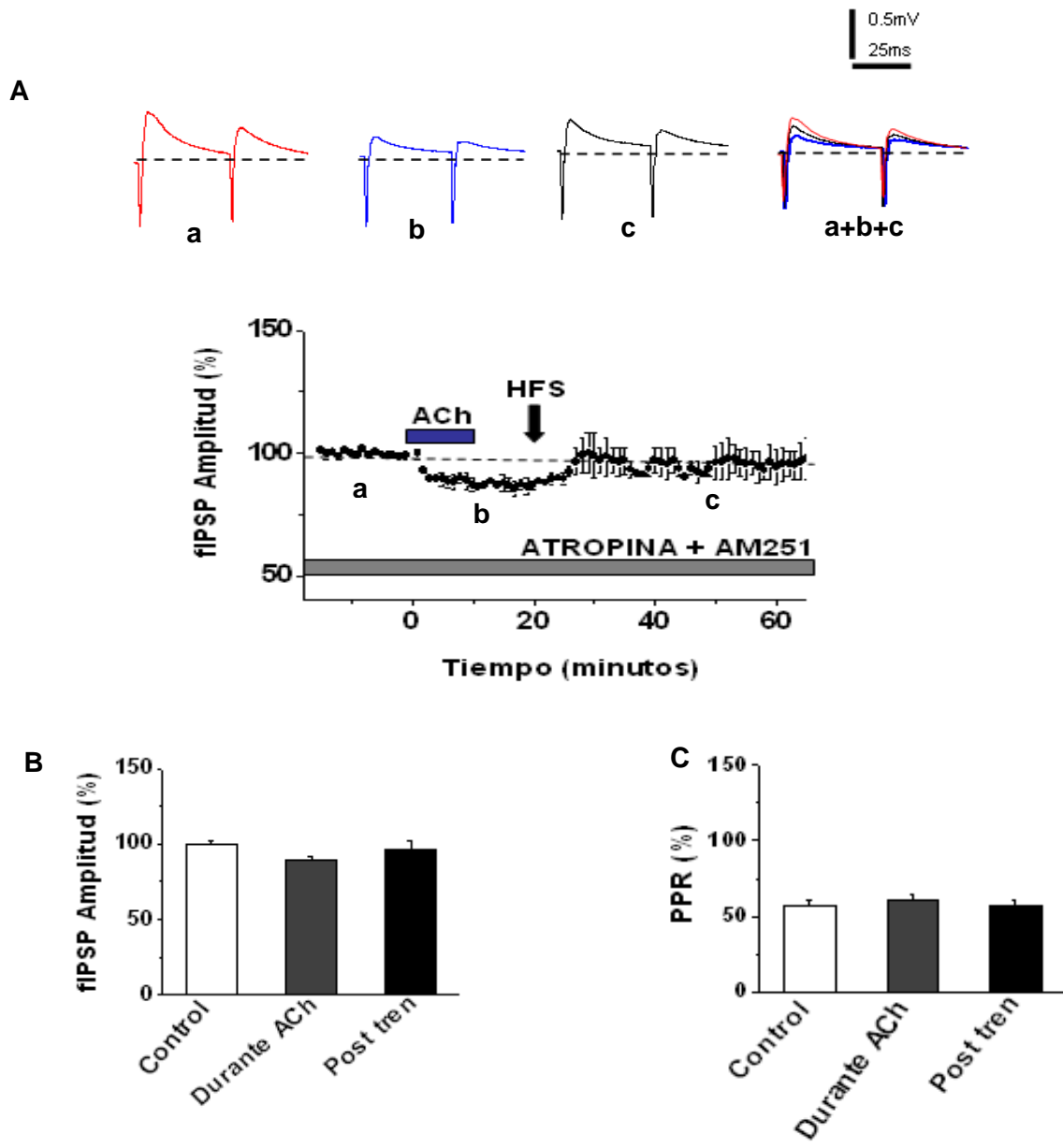


Figura 6. **La activación de receptores muscarínicos, es necesaria para la inducción de iLTP.** En A, arriba se muestran los registros, en situación control (rojo), en presencia de ACh (azul) y post HFS (negro). Abajo, se muestra el promedio de los fIPSP en función al tiempo, además se puede observar que el protocolo se llevo a cabo en presencia de Atropina (10 μ M), donde también es perfundida la ACh durante 10 minutos, la flecha indica el momento donde fue aplicado el protocolo de HFS. En B, grafico del promedio de las amplitudes de la fIPSP, en situación control, durante la presencia de ACh y post HFS. En C, se muestran los promedios de los PPR, durante las diferentes fases del protocolo.

La inducción de iLTP necesita de la activación de mGlu-R.

Para corroborar que el protocolo de HFS, sobre fibras Glutamatérgicas del *stratum radiatum*, provoca la activación de mGlu-R y a su vez, si estos receptores están implicados en la inducción de iLTP, se realizó el siguiente protocolo, en presencia de MCPG (50 μ M) y AM251 (10 μ M), el MCPG es un antagonista no selectivo para mGlu-R del grupo I y II. Se puede observar que la iSTD pre-sináptica, generada por la activación de mACh-R, no se ve afectada por la inactivación de mGlu-R, donde los valores de la PPR (52.5 \pm 3.2 (control); 74.5 \pm 11.2 (ACh); 48.3 \pm 2.7 (post HFS) $p < 0,05$ figura 7C) los cuales son semejantes a los obtenidos en los experimentos previos (figura 4C). Posterior a la aplicación del protocolo de HFS, se genera una recuperación de la amplitud de los potenciales fIPSP al valor de la línea base (100.4 \pm 1.7 (control); 64.8 \pm 17.4 (ACh); 102.3 \pm 9.0 (post HFS) $p > 0,05$ $n=3$ figura 7A), corroborando que la inducción de iLTP necesita tanto de la activación de mACh-R como mGlu-R.

Tomados en conjunto, nuestros resultados sugieren que la activación de CB1-R en interneuronas sensibles a eCBs, induce una depresión de la transmisión inhibitoria (figura 3 A), mientras otro grupo celular, insensible a eCBs tienden a potenciar, generándose un balance entre la potenciación y depresión. Tomando en cuenta nuestros datos, podemos proponer, que la ACh puede actuar como un regulador clave del balance inhibición-inhibición de la transmisión GABAérgica.

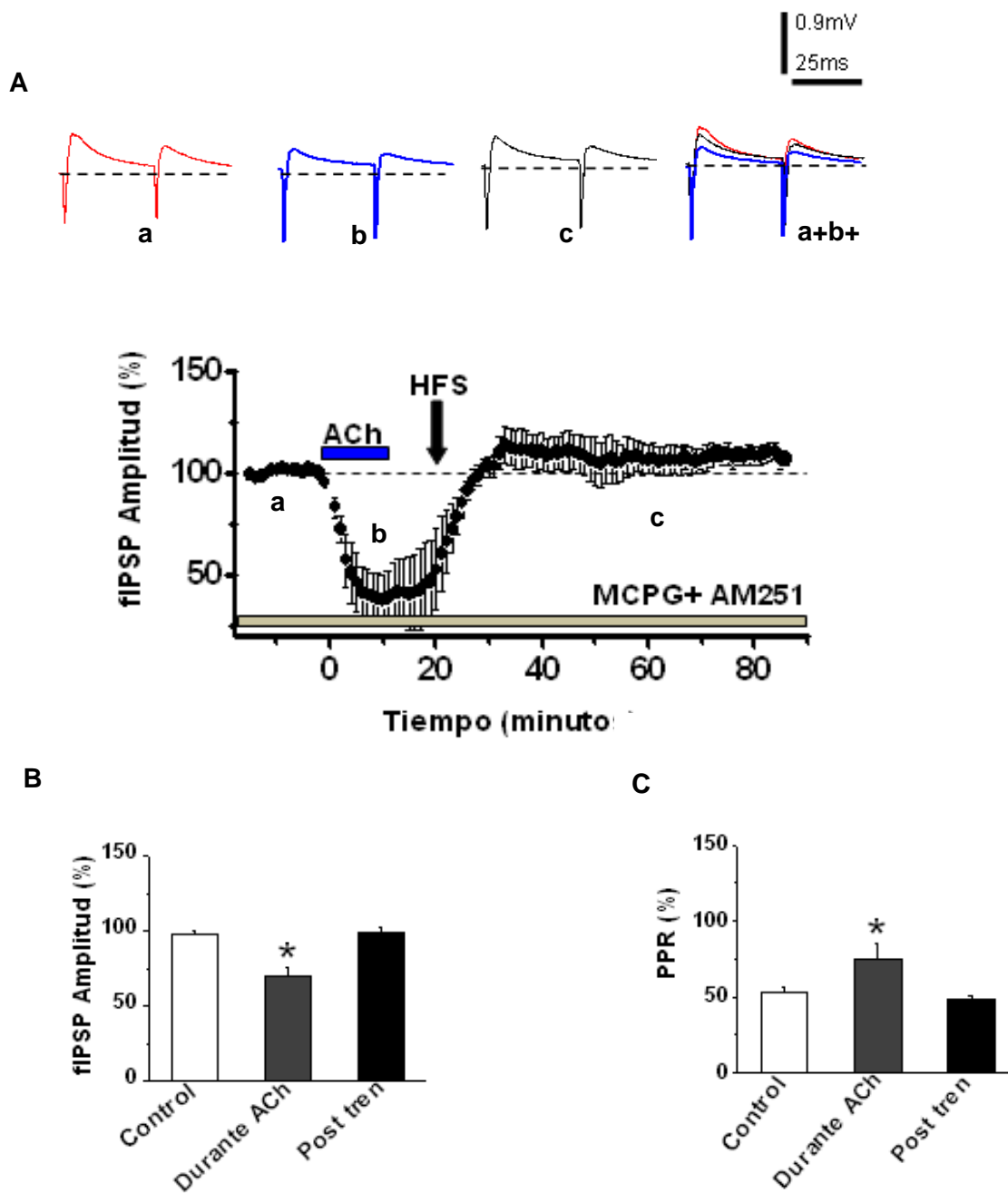


Figura 7. **La inducción de iLTP, necesita de la activación de receptores mGlu-R.** En A, arriba se muestran registros, en control (rojo), presencia de ACh (azul) y HFS (negro), se muestran los promedios de los fIPSP en función a tiempo, barra ploma, muestra que el protocolo se realizó en presencia de MCPG (50µM), además de la perusión de ACh por 10 minutos (barra azul) y el protocolo de HFS (flecha negra). En B, gráfico promedio de los fIPSP, durante las fases del protocolo, control, presencia de ACh y post HFS. En C, se observa el gráfico de PPR, en situación control, ACh y post HFS.

VIII. Discusión

Discusión

En este trabajo presentamos evidencia de una nueva forma de plasticidad sináptica a largo plazo en la transmisión GABAérgica, inducida por la activación de mACh-R y mGlu-R en sinapsis insensibles a la señalización por el sistema de eCBs.

La activación pre-sináptica de mACh-R seguida de la activación de mGlu-R, son necesarias para la inducción de iLTP.

La activación de mACh-R, generó la inducción de iSTD, acompañado de una disminución en la probabilidad de liberación de GABA, esto indica que la expresión de esta forma de plasticidad ocurre a nivel pre-sináptico (figura 2C). Es sabido que los mACh-R del tipo M2/M4, son expresados tanto en neuronas piramidales como en interneuronas del hipocampo, actuando a nivel presináptico (Douglas et al, 2002;. Raiteri et al, 1984, Bettina Pant et al., 2011), su activación provoca una disminución en la liberación de GABA, lo que explicaría el fenómeno de iSTD.

Además se ha demostrado que la estimulación alta frecuencia (protocolo de HFS) en las colaterales de Schaffer del *stratum radiatum*, puede activar un grupo de receptores mGlu-R el cual, al igual que los receptores mACh-R promueven la síntesis y liberación de eCBs (Varma et al., 2001). Por su parte, la liberación de eCBs, induce una iLTD (Castillo et al., 2011), lo que concuerda con nuestros resultados (figura 3A), donde se ve la inducción de iLTD post HFS, indicándonos que este protocolo es capaz de activar mGlu-R, contribuyendo a la síntesis y liberación de eCBs, el proceso de iLTD mediado por eCBs es completamente bloqueado por antagonistas de CB1-R (AM251).

Nuestros experimentos muestran que la activación de los receptores mACh-R y mGlu-R por separado (figuras 2 y 3), no son capaces de inducir iLTP en sinapsis independientes de la modulación por eCBs, indicando la importancia de la activación de ambas vías.

A partir de estos resultados, podemos sugerir que la generación de este fenómeno de plasticidad sináptica a largo plazo, necesita de la activación de mACh-R, la cual parece facilitar la inducción de la iLTP, a través de la estimulación de fibras glutamatérgicas. (Figura 4).

Datos obtenidos en nuestro laboratorio muestran que la activación del sistema eCBs y colinérgico, deprime la transmisión inhibitoria de interneuronas sensibles a eCBs, (CCK+), y a partir de el presente estudio, logramos conocer otro mecanismo de plasticidad a largo plazo, en este caso iLTP, modulado por la interacción entre el sistema Colinérgico y Glutamatérgico, el cual es independiente de la modulación por eCBs. Lo anterior indica, una interesante idea que implica, que las interneuronas GABAérgicas hipocampales pueden ser diferencialmente moduladas por el sistema colinérgico, dando paso a un nuevo mecanismo de regulación de la eficacia sináptica, que proponemos como “balance inhibición-inhibición”.

Actualmente es aceptado que la neuromodulación Glutamatérgica y GABAérgica es fundamental para la sincronización neuronal (Field et al., 2011; Lewis et al., 2008), ya que alteraciones en la transmisión GABAérgica, están estrechamente relacionada en varios trastornos neuro-psiquiátricos tales como la esquizofrenia, epilepsia y depresión, entre otros (Ford et al., 2007; Ford and Mathalon, 2008).

La modulación de la transmisión GABAérgica puede disminuir o aumentar su nivel de inhibición, la cual puede contribuir como un sistema de compensación, cuando se genera un incremento o disminución de la excitación en neuronas piramidales. Debido a que la actividad sincrónica entre sistemas moduladores (ACh, eCBS, Glu), son capaces de aumentar o disminuir la eficacia sináptica de la transmisión inhibitoria, pueden ser un blanco terapéutico, para diversas enfermedades neurodegenerativas y neurosiquiaticas.

Como desafíos futuros, no hemos propuesto el conocer los mecanismos celulares que subyacen este fenómeno de iLTP independiente de la actividad de eCBs.

IX. Conclusiones

Conclusiones

De nuestros resultados podemos concluir que:

- 1- La activación pre-sináptica de mACh-R induce una STD de la transmisión inhibitoria.

- 2- La activación de receptores mACh-R y mGlu-R son necesarios para la inducción de iLTP, entre interneuronas y neuronas piramidales de CA1.

- 3- La activación colinérgicas contribuye al balance inhibición-inhibición, fenómeno que actúa como un mecanismo de metaplasticidad que regula la excitabilidad e inducción de plasticidad a largo plazo en la función de salida de los circuitos neuronales excitatorios.

X. Financiamiento

Financiamiento

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

- Fondecyt 11090059 Dipuv 46/ 2007 Marco Fuenzalida.
- Fondecyt 1100385 Dipuv 03/2008 Christian Bonansco.

XI. Referencias

Referencias

- Abush H, Akirav I. 2010. Cannabinoids modulate hippocampal memory and plasticity. *Hippocampus* 20(10):1126-38.
- 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.
- Azad SC, Eder M, Marsicano G, Lutz B, Zieglansberger W, Rammes G. 2003. Activation of the cannabinoid receptor type 1 decreases glutamatergic and GABAergic synaptic transmission in the lateral amygdala of the mouse. *Learn Mem* 10(2):116-28.
- Bardo S, Cavazzini MG, Emptage N. 2006. The role of the endoplasmic reticulum Ca²⁺ store in the plasticity of central neurons. *Trends Pharmacol Sci* 27(2):78-84.
- Berton O, McClung CA, Dileone RJ, Krishnan V, Renthal W, Russo SJ, Graham D, Tsankova NM, Bolanos CA, Rios M and others. 2006. Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. *Science* 311(5762):864-8.
- Buno W, Cabezas C, Fernandez de Sevilla D. 2006. Presynaptic muscarinic control of glutamatergic synaptic transmission. *J Mol Neurosci* 30(1-2):161-4.
- 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, Eidelberg E. 1982. Direct afferent excitation and long-term potentiation of hippocampal interneurons. *J Neurophysiol* 48(3):597-607.
- Cachope R. 2012. Functional diversity on synaptic plasticity mediated by endocannabinoids. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 367(1607):3242-53.
- Castillo PE, Chiu CQ, Carroll RC. 2011. Long-term plasticity at inhibitory synapses. *Curr Opin Neurobiol*.
- Castillo PE, Chiu CQ, Carroll RC. 2011. Long-term plasticity at inhibitory synapses. *Curr Opin Neurobiol*.

- 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.
- Chevaleyre V, Castillo PE. 2004. Endocannabinoid-mediated metaplasticity in the hippocampus. *Neuron* 43(6):871-81.
- Chevaleyre V, Takahashi KA, Castillo PE. 2006. Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity in the CNS. *Annu Rev Neurosci* 29:37-76.
- Fernandez de Sevilla D, Nunez A, Borde M, Malinow R, Buno W. 2008. Cholinergic-mediated IP3-receptor activation induces long-lasting synaptic enhancement in
- Ferraguti F, Conquet F, Corti C, Grandes P, Kuhn R, Knopfel T. 1998. Immunohistochemical localization of the mGluR1beta metabotropic glutamate receptor in the adult rodent forebrain: evidence for a differential distribution of mGluR1 splice variants. *J Comp Neurol* 400(3):391-407.
- Field JR, Walker AG, Conn PJ. 2011. Targeting glutamate synapses in schizophrenia. *Trends Mol Med* 17(12):689-98.
- Ford JM, Krystal JH, Mathalon DH. 2007. Neural synchrony in schizophrenia: from networks to new treatments. *Schizophr Bull* 33(4):848-52.
- Ford JM, Mathalon DH. 2008. Neural synchrony in schizophrenia. *Schizophr Bull* 34(5):904-6.
- Freund TF. 2003. Interneuron Diversity series: Rhythm and mood in perisomatic inhibition. *Trends Neurosci* 26(9):489-95.
- Freund TF, Buzsaki G. 1996. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6(4):347-470.
- Freund TF, Katona I, Piomelli D. 2003. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev* 83(3):1017-66.
- Gessa GL, Mascia MS, Casu MA, Carta G. 1997. Inhibition of hippocampal acetylcholine release by cannabinoids: reversal by SR 141716A. *Eur J Pharmacol* 327(1):R1-2.
- Givens BS, Olton DS. 1990. Cholinergic and GABAergic modulation of medial septal area: effect on working memory. *Behav Neurosci* 104(6):849-55.
- Gruart A, Munoz MD, Delgado-Garcia JM. 2006. Involvement of the CA3-CA1 synapse in the acquisition of associative learning in behaving mice. *J Neurosci* 26(4):1077-87.
- Harkany T, Dobszay MB, Cayetanot F, Hartig W, Siegemund T, Aujard F, Mackie K. 2005. Redistribution of CB1 cannabinoid receptors during evolution of cholinergic basal forebrain territories and their cortical projection areas: a comparison between the

- gray mouse lemur (*Microcebus murinus*, primates) and rat. *Neuroscience* 135(2):595-609.
- Heifets BD, Chevaleyre V, Castillo PE. 2008. Interneuron activity controls endocannabinoid-mediated presynaptic plasticity through calcineurin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(29):10250-5.
- 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.
- 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.
- Kim J, Isokawa M, Ledent C, Alger BE. 2002. Activation of muscarinic acetylcholine receptors enhances the release of endogenous cannabinoids in the hippocampus. *J Neurosci* 22(23):10182-91.
- Klausberger T, Somogyi P. 2008. Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. *Science* 321(5885):53-7.
- Kullmann DM, Lamsa KP. 2007. Long-term synaptic plasticity in hippocampal interneurons. *Nat Rev Neurosci* 8(9):687-99.
- Laezza F, Dingledine R. 2004. Voltage-controlled plasticity at GluR2-deficient synapses onto hippocampal interneurons. *J Neurophysiol* 92(6):3575-81.
- Lamsa K, Heeroma JH, Kullmann DM. 2005. Hebbian LTP in feed-forward inhibitory interneurons and the temporal fidelity of input discrimination. *Nat Neurosci* 8(7):916-24.
- Lewis DA, Cho RY, Carter CS, Eklund K, Forster S, Kelly MA, Montrose D. 2008. Subunit-selective modulation of GABA type A receptor neurotransmission and cognition in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 165(12):1585-93.
- Lovinger DM. 2008. Presynaptic modulation by endocannabinoids. *Handb Exp Pharmacol*(184):435-77.
- Lucas-Meunier E, Fossier P, Baux G, Amar M. 2003. Cholinergic modulation of the cortical neuronal network. *Pflugers Arch* 446(1):17-29.
- 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.
- Malenka RC, Bear MF. 2004. LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 44(1):5-21.
- Malinow R, Malenka RC. 2002. AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 25:103-26.
- Mannaioni G, Marino MJ, Valenti O, Traynelis SF, Conn PJ. 2001. Metabotropic glutamate receptors 1 and 5 differentially regulate CA1 pyramidal cell function. *J Neurosci* 21(16):5925-34.
- Marsicano G, Lutz B. 2006. Neuromodulatory functions of the endocannabinoid system. *J Endocrinol Invest* 29(3 Suppl):27-46.
- Marat A, Mukhamedyarov, Andrey L, Zefirov, András Palotás. 2006. Paired-Pulse Facilitation of Transmitter Release at Different Levels of Extracellular Calcium Concentration. *Neurochem Res* 31 pp 1055-1058.
- Mateos JM, Azkue J, Benitez R, Sarria R, Losada J, Conquet F, Ferraguti F, Kuhn R, Knöpfel 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.
- McLean HA, Caillard O, Khazipov R, Ben-Ari Y, Gaiarsa JL. 1996. Spontaneous release of GABA activates GABAB receptors and controls network activity in the neonatal rat hippocampus. *J Neurophysiol* 76(2):1036-46.
- 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.
- Muller RU, Kubie JL. 1989. The firing of hippocampal place cells predicts the future position of freely moving rats. *J Neurosci* 9(12):4101-10.

- Mukherjee S, Manahan-Vaughan D. 2012. Role of metabotropic glutamate receptors in persistent forms of hippocampal plasticity and learning. *Neuropharmacology* 66:65-81.
- 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, Kauer JA. 2008. LTP of GABAergic synapses in the ventral tegmental area and beyond. *J Physiol* 586(6):1487-93.
- Nunez A, Dominguez S, Buno W, Fernandez de Sevilla D. 2012. Cholinergic-mediated response enhancement in barrel cortex layer V pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 108(6):1656-68.
- Ohno-Shosaku T, Matsui M, Fukudome Y, Shosaku J, Tsubokawa H, Taketo MM, Manabe T, Kano M. 2003. Postsynaptic M1 and M3 receptors are responsible for the muscarinic enhancement of retrograde endocannabinoid signalling in the hippocampus. *Eur J Neurosci* 18(1):109-16.
- Ohno-Shosaku T, Shosaku J, Tsubokawa H, Kano M. 2002. Cooperative endocannabinoid production by neuronal depolarization and group I metabotropic glutamate receptor activation. *Eur J Neurosci* 15(6):953-61.
- Otto T, Eichenbaum H, Wiener SI, Wible CG. 1991. Learning-related patterns of CA1 spike trains parallel stimulation parameters optimal for inducing hippocampal long-term potentiation. *Hippocampus* 1(2):181-92
- 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.
- Piomelli D. 2003. The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci* 4(11):873-84.
- Pitler TA, Alger BE. 1994. Depolarization-induced suppression of GABAergic inhibition in rat hippocampal pyramidal cell.
- Picciotto MR, Higley MJ, Mineur YS. 2012. Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior. *Neuron* 76(1):116-29.

- Rose CR, Konnerth A. 2001. Stores not just for storage. intracellular calcium release and synaptic plasticity. *Neuron* 31(4):519-22.
- Sladeczek F, Pin JP, Recasens M, Bockaert J, Weiss S. 1985. Glutamate stimulates inositol phosphate formation in striatal neurones. *Nature* 317(6039):717-9.
- Steele PM, Mauk MD. 1999. Inhibitory control of LTP and LTD: stability of synapse strength. *J Neurophysiol* 81(4):1559-66.
- Sugiyama H, Ito I, Hirono C. 1987. A new type of glutamate receptor linked to inositol phospholipid metabolism. *Nature* 325(6104):531-3.
- Tzavara ET, Wade M, Nomikos GG. 2003. Biphasic effects of cannabinoids on acetylcholine release in the hippocampus: site and mechanism of action. *J Neurosci* 23(28):9374-84.
- Varma N, Carlson GC, Ledent C, Alger BE. 2001. Metabotropic glutamate receptors drive the endocannabinoid system in hippocampus. *J Neurosci* 21(24):RC188.
- Whitlock JR, Heynen AJ, Shuler MG, Bear MF. 2006. Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science* 313(5790):1093-7.
- 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. 2002. Endocannabinoid signaling in the brain. *Science* 296(5568):678-82.
- Zheng F, Wess J, Alzheimer C. 2012. M2 muscarinic acetylcholine receptors regulate long-term potentiation at hippocampal CA3 pyramidal cell synapses in an input-specific fashion. *J Neurophysiol* 108(1):91-100.
- Zhou Q, Poo MM. 2004. Reversal and consolidation of activity-induced synaptic modifications. *Trends Neurosci* 27(7):378-83.