



**FACULTAD DE CIENCIAS**

**PROGRAMA DE LICENCIATURA EN CIENCIAS MENCIÓN  
BIOLOGÍA O QUÍMICA**

**LA ACETILCOLINA REGULA EL UMBRAL DE INDUCCIÓN DE  
PLASTICIDAD SINÁPTICA GABAÉRGICA EN NEURONAS  
PIRAMIDALES DE CA1 DEL HIPOCAMPO**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADO EN CIENCIAS  
MENCIÓN BIOLOGÍA**

**KOYAM MORALES WEIL**

**DIRECTOR  
DR. MARCO FUENZALIDA NUÑEZ**

**Valparaíso, Chile  
2013**

Esta tesis se la dedico a mi familia:

A mis hermanos Damián y Ángel por la felicidad que siempre me dan cada vez que estoy con ellos.

A mi padre Armando por darme siempre tanto amor y cariño desde que esta conmigo.

A mi madre Gabriela por apoyarme, aconsejarme y ayudarme siempre de forma incondicional.

A mi novia Valentina por ser mi amor y compañera en el viaje de la vida.

## Índice

- I. Abreviaturas
- II. Resumen
- III. Marco teórico
- IV. Planteamiento del problema
- V. Hipótesis y objetivos
- VI. Metodología
- VII. Resultados
- VIII. Discusión
- IX. Conclusiones
- X. Financiamiento
- XI. Referencias

# 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: colecistoquinina (neuropéptido).

CNQX: antagonista del receptor AMPA.

DHPG: (S)-3,5-Dihydroxyphenylglycine, agonista del grupo 1 de los receptores metabotrópicos (mGluR<sub>1</sub> y mGluR<sub>5</sub>) de glutamato.

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

eCBs: endocannabinoides.

fIPSP: potenciales post-sinápticas inhibitorias de campo.

GABA: ácido  $\gamma$ -Aminobutírico, principal neurotransmisor inhibitorio.

GABA<sub>A</sub> -R: receptor ionotrópico de GABA tipo A.

GABA<sub>B</sub> -R: receptor metabotrópico de GABA tipo B.

GABA<sub>C</sub>-R: receptor ionotrópico de GABA tipo C.

iLTD: depresión a largo plazo de sinapsis inhibitorias (i.e. inhibitory Long Term

Depression).

IPSC: corrientes inhibitorias postsinapticas (i.e. inhibitory postsynaptic currents).

sIPSC: corrientes inhibitorias postsinapticas espontaneas (i.e. spontaneous inhibitory postsynaptic currents).

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. proteine kinase A).

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

PV: parvalbúmina.

SNC: Sistema Nervioso Central.

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

# **II. Resumen**

## Resumen

El adecuado balance entre la transmisión inhibitoria y excitatoria es fundamental para el funcionamiento del sistema nervioso central (SNC). Los cambios en la eficacia con que se transmite la información entre neuronas ha sido propuesto como el sustrato neuronal de distintos procesos cognitivos como el aprendizaje y la memoria. Aunque la transmisión GABAérgica es esencial para el funcionamiento del sistema nervioso central, los mecanismos celulares y circuitales involucrados en la inducción y expresión de la plasticidad sináptica inhibitoria han sido poco estudiados. Diferentes tipos de neurotransmisores y sustancias neuromoduladoras, tales como Acetilcolina (ACh), endocannabinoides (eCBs) o Glutamato pueden regular la eficacia de las sinapsis inhibitorias de interneuronas. La activación de las vías colinérgicas provenientes del septum medial y la banda diagonal de Broca pueden modular la excitabilidad y plasticidad sináptica en hipocampo. En nuestro laboratorio hemos demostrado que la activación de receptores muscarínicos y para eCBs induce depresión de la transmisión GABAérgica de un subgrupo de interneuronas de hipocampo de rata. Usando técnicas de electrofisiología y farmacología hemos observado que la aplicación exógena de ACh induce sólo una depresión transitoria de la transmisión GABAérgica. Interesantemente, observamos que la aplicación de un tren de estimulación tetánica en el *stratum radiatum* (el cual permite estimular las vías glutamatérgicas proveniente desde la región de CA3) o la activación farmacológica de receptores metabotrópicos para glutamato es capaz de generar potenciación a largo plazo (LTP) de la transmisión GABAérgica. Estos resultados demuestran que activación de las vías colinérgicas puede regular la inducción de plasticidad a largo plazo en circuitos neuronales inhibitorios GABAérgicos.

# **III. Marco teórico**

## **Marco Teórico**

Cuando se habla de plasticidad, se hace referencia a la capacidad del sistema nervioso de cambiar tanto a nivel morfológico como funcional frente a diferentes circunstancias. Esta plasticidad a nivel celular está determinada por cambios en la eficacia sináptica neuronal, la cual ha sido sugerida como el sustrato celular de procesos cognitivos como el aprendizaje y memoria (Gruart et al., 2006; Whitlock et al., 2006). Cambios ocurridos en la eficacia sináptica pueden modular la excitación o inhibición de un circuito neuronal, siendo esta modulación fundamental para el correcto funcionamiento del sistema nervioso central (SNC) (Field et al., 2011; Lewis et al., 2008).

### **Hipocampo y Sinapsis inhibitoria**

Uno de los modelos experimentales más utilizados para estudiar los mecanismos celulares y moleculares que determinan la inducción y expresión de plasticidad sináptica es el hipocampo, una estructura subcortical que es parte del sistema límbico (Bortolotto et al., 2001). En 1973, Bliss y Lomo describieron el fenómeno de LTP en sinapsis excitatorias hipocampales. Desde entonces, hasta la fecha existe una gran cantidad de trabajos focalizados en determinar los mecanismos celulares y moleculares implicados en la plasticidad sináptica de tipo glutamatérgica, sin embargo hay muchos menos estudios sobre la plasticidad GABAérgica (Ivshitz and Segal, 2006; Kawaguchi and Hirano, 2007; McLean et al., 1996; Nugent and Kauer, 2008).

Una gran cantidad de estudios evidencian que para el funcionamiento normal del sistema nervioso es necesario un balance correcto entre la excitación e inhibición de los circuitos sinápticos. Se ha determinado que un desbalance excitación-inhibición está relacionado con la etiología de una serie de neuropatologías (Dingledine And Gjerstad, 1980; Chevaleyre and Castillo, 2004; Kullmann and Lamsa, 2007). En el sistema nervioso central GABA es el principal neurotransmisor de tipo inhibitorio y en el hipocampo los principales receptores para GABA son los de tipo A ( $GABA_A$ ) (ionotrópicos) y tipo B ( $GABA_B$ ) (metabotrópicos) (Luscher et al., 2011). Los receptores  $GABA_A$  están conformados por cinco subunidades que componen un canal de  $Cl^-$ , siendo un importante mediador de la inhibición sináptica por medio de aumento en conductancias al ion  $Cl^-$ .

(Cherubini et al, 1991; Romo-Parra et al, 2008). Por otra parte los receptores GABA<sub>B</sub> están acoplados a proteína G<sub>s</sub> la cual aumenta las conductancias de K<sup>+</sup>, también contribuyendo a la inhibición de la sinapsis (Deisz and Prince, 1989; Newberry and Nicoll, 1985).

En el hipocampo las interneuronas representan un bajo porcentaje del total de las células del hipocampo (~10%) aun así tiene un papel esencial en la fisiología hipocampal (Cobb et al. 1995; Buzsaki, 1997). Existe una gran diversidad de interneuronas en el hipocampo. Por ejemplo en la región CA1 existen 19 tipos distintos de interneuronas (Klausberger and Somogyi, 2008). Para su identificación existen varios métodos, entre ellos morfológico, neuroquímico y electrofisiológico (Kullman and Lamsa, 2007). En este trabajo las principales interneuronas estudiadas son las de tipo canasto, ubicadas en el estrato piramidal de CA1, que representan las principales fuentes de inhibición de las neuronas piramidales de este estrato. Existen 2 tipos de interneuronas de canasto, ambos tipos son idénticas morfológicamente; para diferenciarlas se deben realizar estudios neuroquímicos o electrofisiológicos. Se denominan PV aquellas interneuronas de canasto que tienen un ligando de calcio Parvalbuminas (PV+) y son de disparo rápido, por otra parte se denominan CCK las interneuronas que expresan el neuropéptido colecistoquinina (CCK+) y disparo lento (Armstrong and Soltesz, 2012).

La eficacia sináptica de las interneuronas puede ser modulada por diferentes patrones de actividad neuronal. Se han descrito una serie de mecanismos que modulan la eficacia sináptica en la transmisión GABAérgica, ya sea por señalización retrógrada a través del sistema de eCBs, o por fosforilación de receptores de GABA por aumento de calcio intracelular post sináptico (Armstrong and Soltesz, 2012; Kullmann and Lamsa, 2007; Kullmann et al., 2012). Además existen una serie moléculas que pueden modificar la eficacia en sinapsis GABAérgicas. Es interesante que algunos neuromoduladores como la ACh pueden modificar fuertemente la eficacia sináptica hipocampal (Aigner, 1995; Fernandez de Sevilla et al., 2002; Fernandez de Sevilla and Buño, 2003; Ovsepian et al., 2004; Fernandez de Sevilla et al., 2008). En nuestro laboratorio, recientemente se ha demostrado que la transmisión colinérgica, actuando en conjunto con otros sistemas como el de aCBs, pueden inducir LTD de la transmisión inhibitoria GABAérgicas (Ahumada et al., 2013).

## Transmisión colinérgica

Dada su importante participación en procesos neuroplásticos, en aprendizaje y memoria, numerosos trabajos se han dedicado a determinar el papel de la ACh sobre la fisiología cerebral (Takahashi et al., 2013; Fernandez de Sevilla, 2002 ) Existen diversos tipos de receptores para la ACh, tanto del tipo metabotrópicos (muscarínicos) como inotrópicos (nicotínicos). Dentro de los receptores muscarínicos de ACh se han descrito 5 tipos: M1, M2, M3, M4 y M5. Los receptores M1, M3 y M5 acoplados a proteínas  $G_q$ ; y los receptores M2 y M4 acoplados a proteínas  $G_i$ . Por otra parte los receptores nicotínicos de ACh más preponderantes en el hipocampo son los subtipos  $\alpha 7$  y  $\alpha 4\beta 2$ , se ha evidenciado que ellos contribuyen a la excitabilidad neuronal puesto que conforman un canales iónicos de cationes permeando  $Ca^{2+}$  entre otros cationes (Itier and Bertrand, 2001; Marrion, 1997; Griguoli and Cherubini, 2012; Yakel, 2012). Fisiológicamente la principal fuente de ACh en el hipocampo proviene desde neuronas de núcleos del septum y la banda diagonal de Broca, ubicados en la base de la corteza frontal (Givens and Olton, 1990; Mesulam et al., 1983). Se ha evidenciado que la ACh es un neurotransmisor que puede modular la eficacia sináptica del estrato piramidal tanto a niveles post como pre sinápticos (Caulfield and Birdsall, 1998; Shinoe et al, 2005). Uno de los efectos de la ACh es aumentar la excitabilidad neuronal por medio del bloqueo de una corriente de potasio denominada “M-Current”, llamada así por su bloqueo al activarse el receptor muscarínico M1. El bloqueo de esta corriente de potasio genera una despolarización de la membrana que facilita el disparo de potenciales de acción de neuronas piramidales (Brown et al, 1989).

## **Transmisión glutamatérgica**

Glutamato es un importante neurotransmisor excitatorio del SNC que juega un papel fundamental en varias funciones cerebrales. Esta vía de señalización está formada por dos tipos de receptores inotrópicos (Acoplados a un canal iónico) y metabotrópicos (acoplados a una proteína G) (Sladeczek et al., 1985; Sugiyama et al., 1987). Varios trabajos han mostrado que la activación de mGlu-R (receptores metabotrópicos de glutamato) 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). Se ha demostrado que los receptores inotrópicos de glutamato son responsables de la inducción de plasticidad sináptica del tipo hebbiana en procesos de aprendizaje y memoria (Feldman, 2009). Los receptores del tipo mGlu-R, se encuentran agrupados en tres tipos y ocho sub-tipos (Ferraguti et al., 1998; Mateos et al., 1998). Estos receptores han sido vinculados a la inducción y modulación de distintos tipos de plasticidad sináptica. Por ejemplo, la activación de los mGlu-R del tipo M1 induce un aumento de Calcio intracelular contribuyendo en la despolarización de neuronas piramidal y participando en la inducción de plasticidad sináptica en la región de CA1 de hipocampo (Feldman, 2009; Willard and Koochekpou, 2013).

Se ha mostrado que la interacción entre el sistema colinérgico y glutamatérgico, induce cambios en la transmisión sináptica excitatoria (Navakkode and Korte,2012; Park and Spruston,2012), lo que indica que la activación de receptores mGlu pueden contribuir en la generación de varias formas de modulación de eficacia sináptica, siendo muy relevante en procesos cognitivos como el aprendizaje y la memoria (Mukherjee and Manahan-Vaughan, 2013).

# **IV. Planteamiento del problema**

## **Planteamiento del problema**

El hecho de que la mayoría de los estudios estén centrados en la sinapsis excitatoria deja muchas preguntas abiertas sobre los fenómenos que pueden ocurrir en las sinapsis inhibitorias (McLean et al 1996; Ivenshitz and Segal, 2006; Kawaguchi and Hirano, 2007; Nugent and Kauer, 2008). Asimismo, existen muchos estudios sobre la ACh y sus efectos en diferentes áreas cerebrales. De hecho se ha demostrado que la activación de receptores metabotrópicos para ACh pueden inducir LTP en circuitos excitatorios glutamatérgicos (Fernandez de Sevilla et al., 2008, 2010). Estudios realizados en este laboratorio han demostrado como la coactivación de receptores para ACh y eCBs pueden inducir LTD en un subgrupo de sinapsis inhibitorias (Ahumada et al., 2013). Sin embargo hasta la fecha se desconoce si la ACh puede modular a largo plazo la eficacia sináptica en sinapsis GABAérgicas insensibles a eCBs.

# **V.Hipótesis y Objetivos**

## **Hipótesis**

La activación de receptores colinérgicos regula el umbral de inducción de plasticidad sináptica GABAérgica en la región de CA1 en el hipocampo

### **Objetivo General**

Determinar si los receptores colinérgicos participan en la inducción de la LTP en sinapsis GABAérgicas hipocampales.

### **Objetivos específicos**

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

Estudiar si la inducción de la LTP de la transmisión inhibitoria, dependiente de la activación de receptores colinérgicos y glutamatérgicos ocurre a nivel pre y/o post sinápticos.

# **VI. Metodología**

## **Metodología**

Para evaluar los mecanismos de plasticidad sináptica mediada por la ACh y glutamato, se utilizarán técnicas de farmacología y electrofisiología en rodajas de hipocampo de ratas.

### **Animales**

Las rodajas de hipocampo serán obtenidas de ratas Sprague-Dawley sacrificadas entre los 15 y 30 días postnatal.

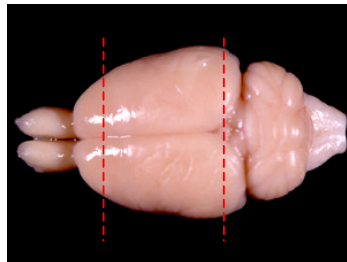
### **Obtención de rodajas de hipocampo**

Las rodajas de hipocampo serán obtenidas mediante técnicas ampliamente descritas en literatura (Le Ray et al., 2004; Bonansco et al., 2007; Fernández de Sevilla et al., 2007).

Los animales serán decapitados y su cerebro expuesto por craneotomía. El encéfalo deberá ser extraído rápidamente (<1min) y sumergido en líquido cefalorraquídeo artificial (LCA), cuya temperatura no deberá superar los 4°C, para favorecer la viabilidad celular. La composición iónica del LCA en mM será de: 124.00 NaCl, 2.69 KCl, 1.25 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.00 Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 26.00 NaHCO<sub>3</sub>, 2.00 CaCl<sub>2</sub> y 10.00 Glucosa.

Una vez extraído el encéfalo, se le realizarán dos cortes, unos anterior y otro posterior paralelos entre si (fig1) y fijado en el plano coronal-frontal a una cámara de corte con pegamento de cianocrilato, sumergido en el mismo LCA a 4°C, el cual es permanentemente burbujeado con carbógeno (95% O<sub>2</sub> – 5% CO<sub>2</sub>). En estas condiciones, se procederá a obtener cortes transversales de hipocampo con un espesor de entre 350-400 µm mediante un vibrátomo motorizado (Campden Instruments, model MA752). Posterior al corte, las rodajas obtenidas deberán ser traspasadas a la cámara de incubación, en las que se mantendrán durante 30 a 60 minutos en LCA a temperatura ambiente (23-25°C) con un pH estable (7.4) y burbujeado permanentemente con carbógeno (95% O<sub>2</sub> – 5 % CO<sub>2</sub>), favoreciendo de esta manera la estabilización del metabolismo. Una vez incubadas, las rodajas serán transferidas a una cámara de registro, adaptada con un microscopio (NIKON, modelo Eclipse FN1). El sistema se encontrará sobre una mesa anti-vibratoria para permitir la obtención de registros estables a largo

plazo impidiendo la transmisión de vibraciones ambientales a la preparación. La transmisión de artefactos eléctricos externos al registro será evitada con la disposición del sistema de registro al interior de una jaula de Faraday. Las rodajas deberán ser perfundidas con LCA a temperatura ambiente, con un flujo ~ 1 ml/minuto, de forma que el recambio completo de LCA en la cámara de registro se realizara aproximadamente cada 5 minutos.



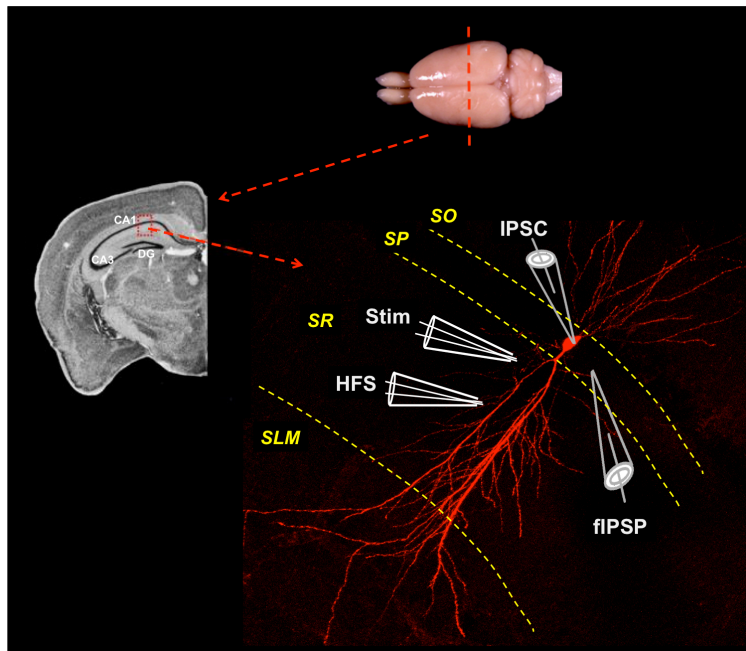
**Figura 1.** Encéfalo expuesto por craneotomía, se muestran los cortes anterior y posterior.

### **Soluciones de registro y farmacología**

La composición iónica del LCR de registro será idéntica a la que se utilizará durante los procesos de obtención e incubación de las rodajas de hipocampo, sin embargo este LCR tendrá adicionalmente los siguientes fármacos: APV (50 $\mu$ M), CNQX (50 $\mu$ M) y AM251 (25 $\mu$ M) para bloquear los receptores inotrópicos de glutamato (AMPA y NMDA) y los receptores de tipo CB1 de eCBs. Por su parte, la composición en mM de la solución intracelular que se utilizara en la pipeta de registro sera de: 120 K-Gluconate, 10 KCl, 10 HEPES, 1 MgCl<sub>2</sub>-6H<sub>2</sub>O, 5EGTA y 4Na<sup>2+</sup>-ATP.

### **Registros electrofisiológicos**

Los registros electrofisiológicos serán obtenidos mediante la técnica de patch-clamp en su configuración de célula entera. Según el diseño experimental, se utilizarán las modalidades de fijación de voltaje para el registro de corrientes post-sinápticas inhibitorias (IPSCs). También realizaremos registros inhibitorios de potenciales de campo local (fIPSP)



**Figura 2.** Visualización del cerebro, el hipocampo de rata y un esquema del montaje experimental para los registros electrofisiológicos en CA1. SO (*stratum oriens*); SP (*stratum pyramidale*); SLM (*stratum lacunosum moleculare*)

### Registros de Patch-clamp

Se realizara la técnica de Patch-Clamp a ciegas, en la cual se busca la célula piramidal de la región CA1 mediante los cambios en la resistencia de la pipeta de registro. Las pipetas de registros que se utilizarán constarán de un alambre de plata clorurada (Ag/AgCl) incluido en una micropipeta de vidrio/borosilicato (diámetro externo-interno: 1.5-0.84mm) con capilar interno. Las pipetas serán fabricadas con un estirador de pipetas (SutterInstrument Co., P-97) y rellenas con la solución intracelular (ver soluciones de registro). La resistencia de las pipetas deberá estar en un rango de 3-8 MΩ. Los electrodos en la pipeta de registro se encontraran conectados a un amplificador EPC-7 (HEKA Instruments).

En fijación de voltaje las neuronas serán aceptadas solo cuando la resistencia del sello sea  $> 1G\Omega$  y la resistencia en serie no cambie más de un 20% durante el experimento. Los registros en fijación de voltaje serán filtrados a 3 KHz y muestreados entre 6 y 10 KHz, a través de un conversor análogo-digital (ITC-16; *Intrutech*) y guardados con el

software *Pulse FIT* (Heka Instruments). Como electrodo de referencia se empleará un electrodo epoxy relleno de KCl y con una resistencia de 2.7 K $\Omega$  (WorldPrecision Instruments, Inc.).

### **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, modelo 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, e instalado 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 (SutterInstrumentCo.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 (figura 2).

### **Bolo de ACh y DHPG**

Para aplicar el bolo de ACh se agregan 15  $\mu$ L de ACh (415 $\mu$ M) sobre la cámara de registro cuyo volumen es de 1mL para obtener una concentración final de 5 $\mu$ M, que consecutivamente es lavado con 5 ml de LCR (y la farmacología correspondiente) durante 5 minutos.

Para aplicar el bolo de DHPG se agregan 25  $\mu$ L de DHPG (5 mM) sobre el en la cámara de registro cuyo volumen es de 1mL para obtener una concentración final de 50  $\mu$ M, que

consecutivamente es lavado con 5 ml de LCR (y la farmacología correspondiente) durante 5 minutos.

### **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).

### **Estimulación**

Se obtendrán registros de neuronas piramidales en patch-clamp de la región CA1 de hipocampo mediante la estimulación de las interneuronas con un electrodo extracelular bipolar posicionado en *stratum pyramidal* (SP) a una distancia aproximada de 50  $\mu\text{m}$  de la neurona piramidal de CA1 (figura 2).

### **Protocolo de pulsos pareados**

Este protocolo consiste en estimular mediante 2 pulsos eléctricos separados por 100ms en las interneuronas GABAérgicas registrando a 0mV, potencial de reversión para la sinapsis excitatoria registrando los cambios en la transmisión inhibitoria. Debido a la alta probabilidad de liberación que poseen estas sinapsis, presentan un fenómeno denominado depresión por pulsos pareados, donde el primer pulso es de mayor amplitud que el segundo, debido a que con el primer estímulo se liberan tantas vesículas con neurotransmisor, que el terminal axónico se queda sin el stock suficiente de vesículas cargadas para la liberación inducida por el segundo pulso.

## **Índice de Pulsos Pareados (PPR)**

Con el fin de estudiar si los cambios en la amplitud de las IPSCs son de origen pre o post-sinápticos se calculara el índice de pulsos pareados (PPR). El PPR para sinapsis inhibitorias que presentan una alta probabilidad de liberación, se denomina depresión por pulsos pareados (DPP), en donde el primer pulso es de mayor amplitud que el segundo, y se calculará mediante la siguiente formula:

$$DPP=1-(R2/R1)$$

Donde R1 y R2 son los picos de amplitud de la primera y segunda corriente inhibitoria respectivamente.

## **Análisis**

El análisis de los registros será realizado con el programa Clampfit perteneciente al conjunto de programas denominado "pCLAMP 9" (Molecular Device, Chicago, IL USA). Para la representación de las gráficas se utilizara el software computacional "Origin" (versión 6.0, OriginLabCorp, MA, USA). El análisis estadístico y representación gráfica de los resultados se realizara mediante el programa "Origin 6.0". Para análisis de los registros de las sIPSCs será utilizado el software Minianalysis (Synaptosoft, Decatur, GA, USA).

Finalmente, se procederá a realizar el análisis estadístico usando la prueba t (t-student) de dos colas, considerándose como diferencias estadísticamente significativas los resultados con  $P < 0.05$ .

# **VII. Resultados**

## Resultados

### La activación de receptores de ACh induce depresión a corto plazo (iSTD), en la transmisión inhibitoria

El efecto de la activación de receptores de ACh en el hipocampo se analiza en la amplitud de las IPSC (ver, figura 3A) durante la perfusión de ACh, ocurriendo una iSTD, y posteriormente la amplitud de las IPSC evocadas vuelve al valor basal ( $101.2 \pm 2.3$  % (control);  $38.6 \pm 8.9$  % (ACh) y  $102.2 \pm 15.0$  % (post ACh)  $p < 0,05$ ;  $n=7$ ; figura 3C).

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 pulsos pareados (PPR) (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) (Buño et al., 2006). Se observa que todos los registros de IPSC analizados mostraron DPP (ver figura 3B). Analizando los registros de forma individual se observan cambios en la probabilidad de liberación durante la ACh, habiendo casos en que la probabilidad de liberación aumenta y otros en que disminuye, separándolos en 2 grupos (Figura 3C y 3D). Luego de 30 minutos se observa que el PPR para ambos grupos de neuronas vuelve al valor basal ( $68.1 \pm 4.2$  % (control) ;  $53.0 \pm 3.5$  % (ACh);  $68.2 \pm 4.9$  % (post ACh)  $p < 0,05$ ;  $n=4$  figura 3C) ( $68.8 \pm 5.8$  % (control) ;  $82.8 \pm 17.1$  % (ACh);  $65.7 \pm 8.4$  % (post ACh)  $p < 0,05$ ;  $n=2$  figura 3D).

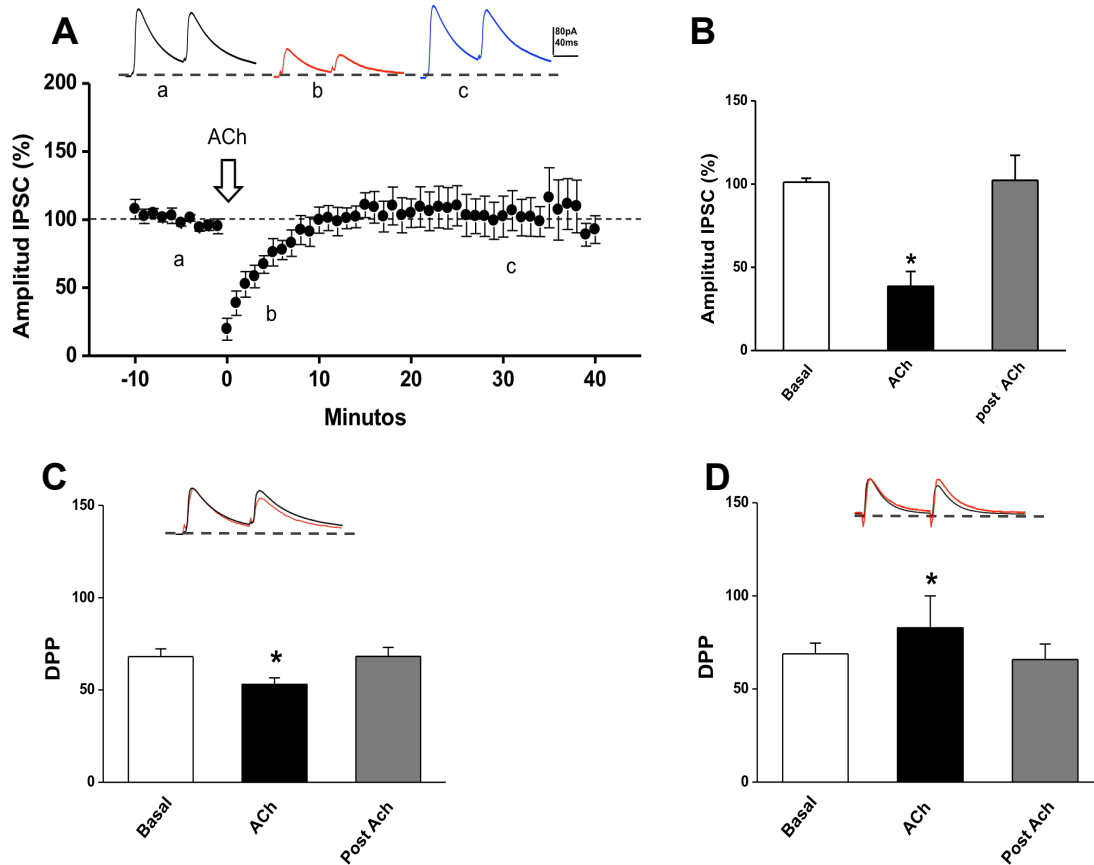


Figura 3. **La activación de receptores colinérgicos pre-sinápticos induce iSTD.** En A (arriba) se muestran los registros de IPSC evocados (n=6) en situación control (negro), durante la de ACh (5  $\mu$ M) (rojo) y 30 minutos post ACh (azul). Abajo, los promedios de las amplitudes de los IPSC evocados en función del tiempo. En B se muestra la gráfica de los promedios de las amplitudes de las IPSC evocados durante la situación control, en presencia de ACh y 30 minutos post ACh. En C, se muestra una comparación entre la RPP de una neurona (arriba), siendo el color negro el basal y el rojo durante la ACh, se observan un aumento en la DPP. también se muestran los promedios de la PPR de los registros que muestran un aumento en la DPP, en situación control, durante ACh y post ACh (abajo). En D se realiza el mismo análisis que en C, pero para células que muestran una disminución en la DPP.

También se realizaron registros de corrientes de actividad espontánea (sIPSC) en neuronas piramidales de CA1, con una línea basal durante 10 minutos y luego se aplicó un bolo de ACh (5 $\mu$ M). De los registros obtuvimos la actividad espontánea inhibitoria en una solución perfundida con APV (25 $\mu$ M) y CNQX (10 $\mu$ M) para boquear la actividad de receptores ionotrópicos para glutamato y AM251 (10 $\mu$ M) (Figura 4A). Bajo estas condiciones se encontró que la frecuencia de las sIPSC disminuyeron durante la ACh (1.2  $\pm$  0.39 Hz (control) ; 69.77  $\pm$  0.22 Hz (ACh); 1.3 $\pm$  0.29 Hz (post ACh)  $p$ < 0,05;  $n$ =4 figura 4C). Por otra parte observamos que durante la ACh no hay cambios significativos en la amplitud de la sIPSC. Es destacable que la amplitud de la respuesta 30 minutos después de la aplicación del bolo de ACh muestra un aumento significativo respecto al control (56.7  $\pm$  14.1 pA (control) ; 36.9  $\pm$  7.9 pA (ACh); 76.0 $\pm$  12.2 pA (post ACh)  $p$ < 0,05;  $n$ =4 figura 4B).

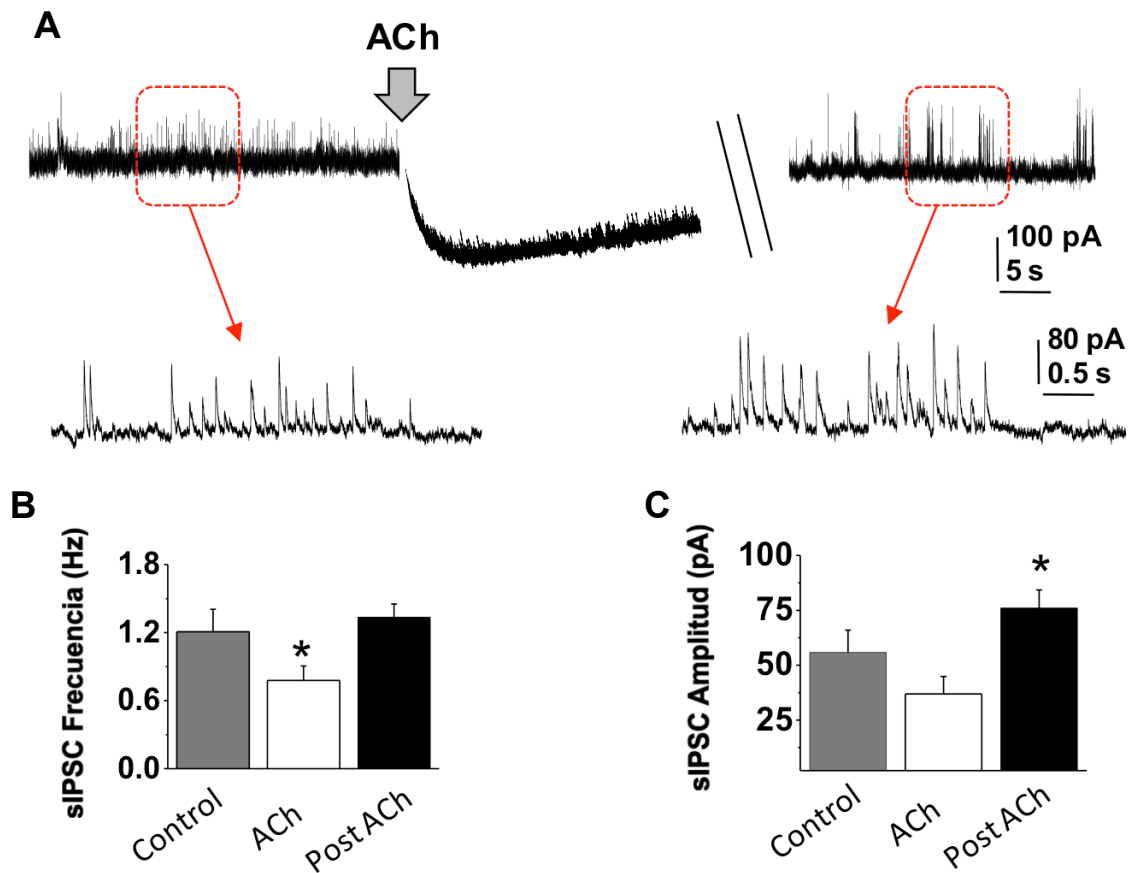


Figura 4. **Aumento en la amplitud a largo plazo y una disminución en la frecuencia a corto plazo de las sIPSC producido por activación de receptores de ACh.** En A, se muestran los registros representativos de las sIPSC antes y después de aplicar ACh (5  $\mu$ M). En B se observa la cuantificación de la frecuencia de los registros de sIPSC. En C, se muestra la amplitud de las sIPSC.

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

Estudios previos en nuestro laboratorio, demostraron que la co-activación 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 centró en la activación de receptores ACh-R y mGlu-R, donde bloqueamos selectivamente la señalización mediada por eCBs, en presencia del antagonista de receptores para endocannabinoides CB1, AM251. En primer lugar estudiamos la respuesta a ACh y la activación de mGlu-R de un grupo de neuronas piramidales, utilizando el protocolo de registro de la actividad sináptica de campo inhibitorio (fIPSP). Luego de un registro basal de 15 minutos, se aplicó sobre las rebanadas un bolo de ACh (5  $\mu$ M), observando se un reducción transitoria de la eficacia sináptica inhibitoria o iSTD (  $102.6 \pm 2.7\%$  (basal),  $89.2 \pm 3.7\%$  (durante ACh)  $p < 0,05$ ;  $n=8$  figura 5B). 15 minutos después de aplicado el bolo de ACh, se aplicó el protocolo de HFS sobre la Colaterales de Schaeffer y observamos que 15 minutos después la amplitud de los IPSP había aumentado significativamente y que este aumento se mantenía persistentemente por más de 40 minutos. ( $124.1 \pm 3.7$  (post ACh)  $p < 0,05$ ;  $n=8$  figura 5B).

Dado que en nuestras condiciones experimentales el protocolo de HFS puede estar activando no sólo fibras glutamatérgicas al estimular en *stratum radiatum*, reemplazamos dicha estimulación por la aplicación de un agonista de mGlu-R DHPG (50 $\mu$ M). Como se observa en la figura 6A la aplicación de DHPG, 15 minutos después de ACh induce una significativa potenciación de la transmisión GABAérgica o iLTP (figura 6). Los valores alcanzados fueron  $408.7 \pm 14.0$  pA (basal) ,  $52.7 \pm 5.0$  pA (durante ACh) y  $616.0 \pm 12.5$  pA (30 minutos post DHPG)  $p < 0,05$ ;  $n=1$  figura 6A).

Para identificar si la inducción de este fenómeno de plasticidad sináptica, es generado a nivel pre o post sinápticos, o si está vinculado en un cambio a nivel de la probabilidad de liberación del neurotransmisor, se analizó la PPR, donde se observa que la aplicación de ACh induce 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 a corto plazo es a nivel pre-sináptico ( $98.1 \pm 3.5\%$  (basal),  $120.4 \pm 14.4\%$  (durante ACh)  $p < 0,05$ ;  $n=8$  figura 5C) ( $57.6 \pm 1.6\%$  (basal),  $100.0 \pm 9.0\%$  (durante ACh)  $p < 0,05$ ;  $n=1$  figura 6B) , teniendo coincidencia con lo visto en el experimento anterior (figura 3D). Al analizar la RPP posterior a la aplicación del tren de HFS (para registros de fIPSP) ; o DHPG (para los registros de célula única), se observa que no hay cambios en la probabilidad de liberación, en comparación con el control, lo que nos indica que hay el cambio en la probabilidad de liberación es sólo transitorio y que el aumento en la amplitud de los fIPSP o IPSC son debidos a cambios a nivel post-sináptico.

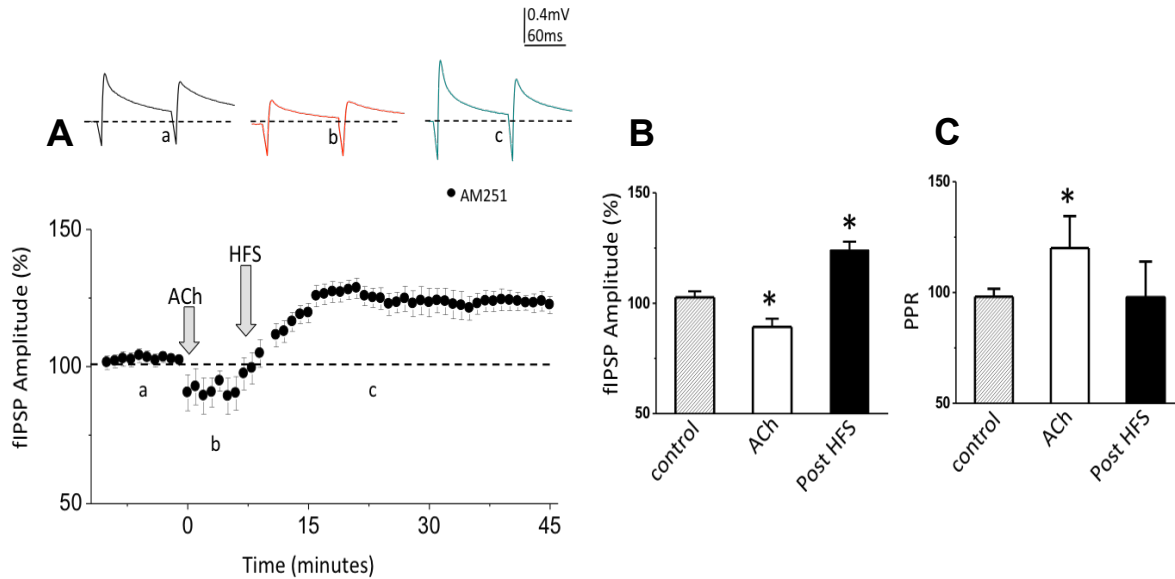


Figura 5. **La activación de ACh-Rs y Glu-Rs induce iLTP GABAérgica en fIPSP.** En A, arriba se observan los registros de fPSP en situación control (negro); en presencia de ACh (rojo) y post HFS (azul). Abajo se muestran los promedios de los fIPSP en función al tiempo, el momento en que se hace el bolo de ACh (5  $\mu$ M) se marca con una fleche gris (izquierda), otra fleche gris (derecha) indica el momento donde fue aplicado el HFS. En B, se muestra un grafico indicando el 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.

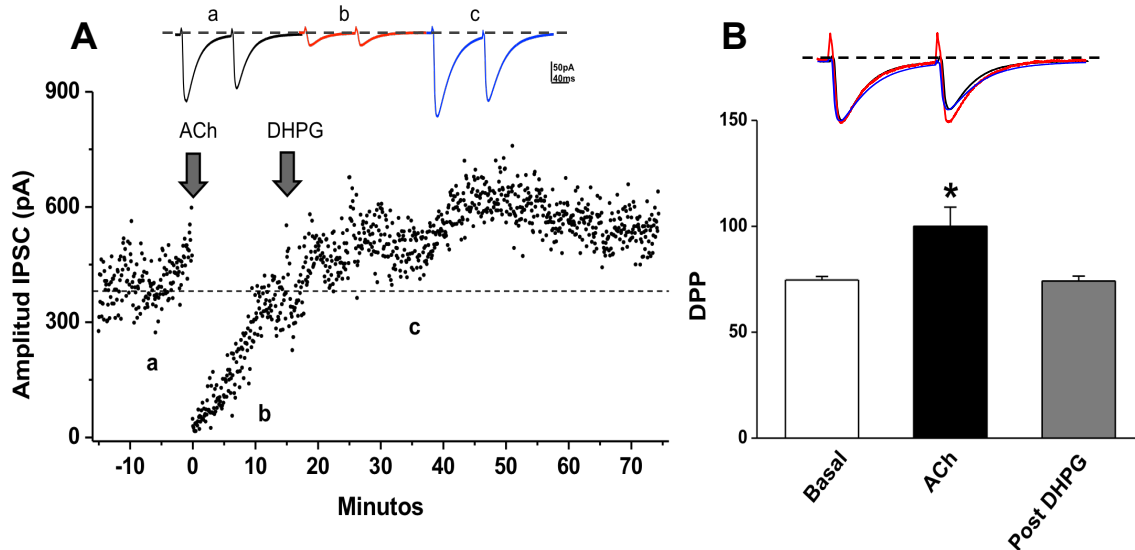
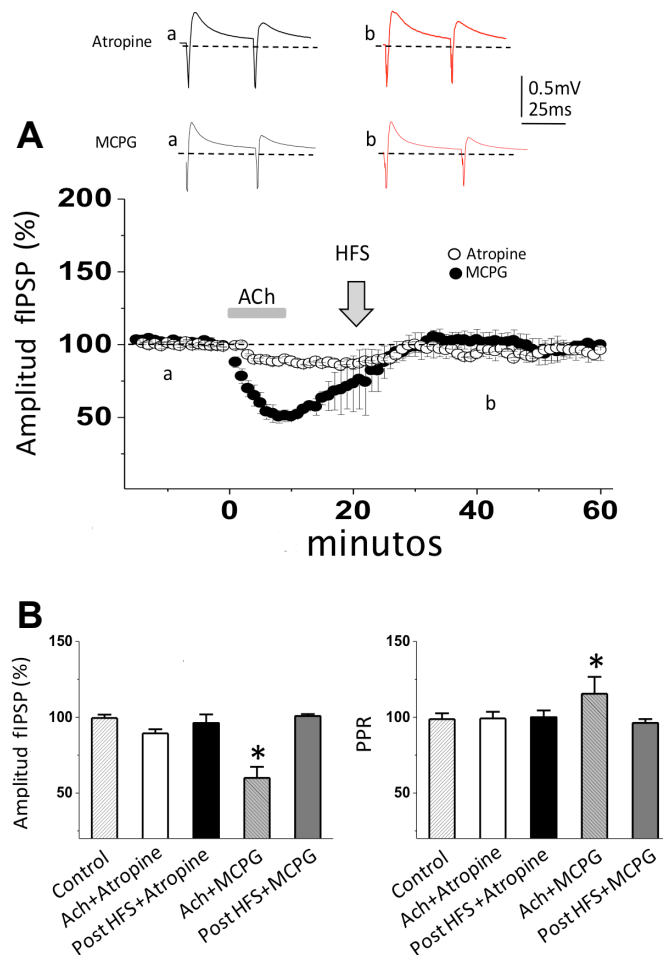


Figura 6. **La activación de ACh-Rs y Glu-Rs induce iLTP en IPSC.** En A, arriba se observa un registro en situación control (negro); en presencia de ACh (rojo) y post DHPG (azul). Abajo se muestra un registro de todos los valores obtenidos de corriente (en valor absoluto) medidos en pA en función al tiempo, el protocolo se llevo a cabo en presencia de APV (25 $\mu$ M), CNQX (10 $\mu$ M) y AM251 (10 $\mu$ M), la primera flecha gris (izquierda) indica el momento en que se aplica el bolo de ACh (5  $\mu$ M), la segunda flecha gris (derecha) indica el momento donde fue aplicado el bolo de DHPG ( 50  $\mu$ M). En B, se observa un ajuste escalar en los registros tomados en a, b y c para observar cambios en la probabilidad de liberación (arriba) en b, también se muestran los valores de los PPR, durante las distintas fases del protocolo (abajo).

## La inducción de iLTP GABAérgica requiere tanto la activación de receptores mGlu como mACh

Para demostrar que la activación de receptores muscarínicos de ACh están implicados en la inducción de iLTP, se aplicó ACh (10 $\mu$ M) durante 10 minutos y después de 20 minutos de lavado se procede a realizar el protocolo de HFS, pero en presencia de Atropina (10  $\mu$ M), un antagonista de receptores muscarínicos y de AM251 (10  $\mu$ m). Se observó que la presencia de atropina bloqueó la iSTD, (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 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 7). Además, después de aplicar el protocolo de HFS, no hay generación de iLTP, lo que nos indica que la activación de receptores metabotrópicos para ACh a nivel pre-sináptico es necesario para la inducción de iSTD e iLTP.

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 un experimento similar al anterior, pero esta vez en presencia de MCPG (50 $\mu$ M) un antagonista no selectivo para mGlu-R del grupo I y II y AM251 (10 $\mu$ M). Pudimos observar que la iSTD pre-sináptica, generada por la activación de mACh-R, no se ve afectada por bloque de mGlu-R. Los valores de valores de la PPR fueron 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). Tomados en conjunto estos datos muestran que para inducir la iSTD se requiere la activación de los mACh, mientras que para inducir iLTP se requiere la activación de mACh-R y mGlu-R.



**Figura 7. La inducción de GABA-LTP requiere la activación tanto de receptores mACh como de mGlu.** En A, arriba se observan los registros de fPSP para el registro con atropina (10  $\mu$ M) previo al protocolo de ACh y HFS (negro), para el registro con atropina posterior al protocolo de ACh y HFS (rojo oscuro), para el registro con MCPG (50 $\mu$ M) previo al protocolo de Ach y HFS (gris), y para el registro con MCPG posterior al protocolo de Ach y HFS (rojo claro). Abajo se muestran los promedios de los fPSP en función al tiempo, el protocolo se llevo a cabo en presencia de Atropina (blanco) y por otro lado en presencia de MCPG (negro), además el tiempo en que se agrega ACh (5  $\mu$ M) se marca con una barra gris (izquierda), y una flecha gris (derecha) indica el momento donde fue aplicado el HFS. En B, se resumen los resultados de fPSP (izquierda) y PPR (derecha), durante un protocolo de ACh y posteriormente HFS, bajo la farmacología de atropina y MCPG (estos experimentos estaban bajo los efectos de AM251 (10 $\mu$ M)).

# **VIII. Discusión**

## Discusión

En este trabajo presentamos evidencia de una forma de plasticidad sináptica a largo plazo en la transmisión GABAérgica, inducida por la activación de mACh-R y mGlu-R.

### La activación de mACh-R genera una iSTD mediada por los receptores pre-sinápticos M2 de ACh

La activación de mACh-R generó una iSTD, la que fue acompañada de un cambio en la probabilidad de liberación de GABA, indicando que la expresión de esta forma de plasticidad ocurre a nivel pre-sináptico (figura 3C, D y 5B). Se ha descrito que en hipocampo los mACh-R del tipo M2/M4 son expresados presinápticamente tanto en neuronas piramidales como en interneuronas (Caulfield, 1993; Chevaleyre et al., 2007), La activación de estos receptores, provoca una disminución en la liberación de GABA mediada por la activación de la proteína  $G_i$ , la cual activa la adenilato ciclasa (AC), que disminuye la activación de la PKA reduciendo la actividad de la maquinaria de liberación de GABA. Como se muestra en la figura 3, en un grupo de interneuronas, se observa un aumento de la probabilidad de liberación. Una posibilidad para explicar esta diferencia es que la activación de receptores muscarínicos y el bloqueo de corrientes de potasio puedan aumentar la excitabilidad, aumentando la frecuencia de disparo de potenciales de acción y liberando más neurotransmisor. Otra posibilidad es que la aplicación de ACh puede activar receptores nicotínicos permeables a calcio ( $\alpha 7$  o  $\alpha 4\beta 2$ ), los cuales puede aumentar la probabilidad de liberación de GABA (Marrion, 1997; Griguoli and Cherubini, 2012; Yakel, 2012). Este comportamiento no fue observado en los registros de campo, probablemente porque a nivel poblacional predomina el efecto de los receptores M2 presinápticos por sobre los otros receptores de ACh; es posiblemente por eso que se observa sólo una disminución en la probabilidad de liberación al agregar ACh. A pesar de los resultados anteriores aun se requiere realizar una serie de experimentos incluyendo registros dobles interneurona-piramidal y de farmacología que nos permitan discriminar entre estos efectos contrapuestos.

## La iLTP requiere una activación previa de mACh-R seguida de la activación de los mGlu-R

Se ha demostrado que la estimulación alta frecuencia (protocolo de HFS) en las colaterales de Schaffe, puede activar un grupo de receptores mGlu- R, al igual que los receptores mACh-R pueden inducir la síntesis y liberación de eCBs (Varma et al., 2001). Por otra parte se ha demostrado que la inducción de LTD inhibitoria en hipocampo puede depender de liberación de eCBs (Castillo et al., 2011), donde se observó que la aplicación de un tren de HFS, es capaz de activar mGlu-R, que finalmente induce la síntesis y liberación de eCBs que actúan de manera retrograda en la sinapsis. En nuestros experimentos el proceso de iLTD mediado por eCBs es completamente bloqueado por antagonistas de CB1-R (AM251). Los resultados obtenidos muestran que la activación de los receptores mACh-R y mGlu-R facilitan la inducción de la iLTP independiente del efecto de los eCBs (Figura 5A, 7A y 7B). Nuestros resultados sugieren la existencia de un fenómeno de inducción o “priming” mediado por activación de mACh-R, que actúa facilitando la inducción de iLTP inducida por la activación de mGlu-Rs. Este efecto de “priming” por ACh se ve evidenciado en un aumento en la amplitud de sIPSC luego de 30 minutos desde que se agregó la ACh, lo que indica que la ACh produce un efecto a nivel celular que perdura en el tiempo (Figura 4). Aunque hemos demostrado que este “priming” sináptico es dependiente de la activación de mACh-R (Figura 7), desconocemos el subtipo de receptores muscarínicos y metabotrópicos para glutamato que están implicados en esta forma de plasticidad sináptica a largo plazo.

Datos obtenidos en nuestro laboratorio muestran que la activación de los sistemas de eCBs y colinérgico, deprime la transmisión inhibitoria de interneuronas sensibles a eCBs (CCK+) (Ahumada et al., 2013). Los resultados presentados en esta tesis sugieren la existencia de otro mecanismo de plasticidad a largo plazo, en este caso la iLTP la cual depende de la interacción entre el sistema Colinérgico y Glutamatérgico. Estos resultados, nos sugieren la interesante idea que implica que interneuronas GABAérgicas hipocampales pueden ser diferencialmente moduladas por el sistema colinérgico: por un lado la activación del sistema colinérgico y de eCBs deprimen la transmisión GABAérgica y por otro lado la activación de receptores colinérgicos y glutamatérgicos pueden potenciar la transmisión GABAérgica. Este hallazgo permite sugerir que un nuevo mecanismo de regulación de la eficacia sináptica donde este "balance Inhibición-inhibición", la cual parece jugar un papel clave en la plasticidad de los circuitos inhibitorios.

Diversos estudios muestran que la neuromodulación glutamatérgica y GABAérgica es fundamental para la sincronización neuronal y el correcto funcionamiento del SNC (Field et al., 2011; Lewis et al., 2008). Alteraciones en la sinapsis inhibitoria están directamente relacionados con la etiología de varios trastornos neuropsiquiátricos tales como la esquizofrenia y depresión así como en enfermedades neurodegenerativas (Ford et al., 2007; Ford and Mathalon, 2008).

En conjunto estos hallazgos demuestran que la modulación de la transmisión GABAérgica puede disminuir o aumentar su nivel de inhibición, la cual puede servir como un sistema de compensación. Esta compensación requiere una reorganización y un re-balance de la excitación e inhibición en el cerebro, fenómeno llamado “plasticidad sináptica homeostática”. Este re-balance muchas veces es insuficiente para sostener la sincronización neuronal necesaria para procesar la información somatosensorial y las funciones cognitivas superiores. 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 neuronales.

# **IX. Conclusiones**

## Conclusiones

- 1- La ACh puede inducir depresión la cual depende de la activación de receptores presinápticos muscarínicos para ACh.
- 2- La activación de receptores muscarínicos facilita la inducción o "*priming*" de LTP de la transmisión GABAérgica, la cual puede ser fundamental para el funcionamiento de diferentes circuitos neuronales.
- 3- Para la fisiología cerebral el balance excitación-inhibición es de gran importancia. Nuestros datos sugieren, que la depresión de la transmisión GABAérgica observada en varias estructuras cerebrales, puede ser compensada por esta forma de potenciación inhibitoria a largo plazo. De esta manera, esta forma de balance "Inhibición-inhibición", puede jugar un papel clave en la fisiología cerebral y procesos cognitivos como el aprendizaje y memoria.

# **X. Financiamiento**

## **Financiamiento**

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

- ❖ **FONDECYT–CONICYT: No 11090059, No 1130614 M.F.N**
- ❖ **CID 01/2006 DIPUV. Universidad de Valparaíso.**

# **XI. Referencias**

## Referencias

Ahumada, J., de Sevilla, D. F., Couve, A., Buño, W. and 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: 1439–1452.

Aigner TG (1995) Pharmacology of memory: cholinergic-glutamatergic interactions. *Curr Opin Neurobiol*, 5(2):155-60.

Armstrong C., Soltesz I. (2012). Basket cell dichotomy in microcircuit function. *J. Physiol. (Lond.)* 590, 683–694.

Bortolotto, Z. A., Anderson, W. W., Isaac, J. T. and Collingridge, G. L. 2001. Synaptic Plasticity in the Hippocampal Slice Preparation. *Current Protocols in Neuroscience*. 16:6.13.1–6.13.23.

Brown DA, Marrion NV, Smart TG. (1989). On the transduction mechanism for muscarine-induced inhibition of M-current in cultured rat sympathetic neurons. *J. Physiol.* 413:469–88.

Buzsaki G. (1997) Functions for interneuronal nets in the hippocampus. *Can J Physiol Pharmacol*, 75: 508-515.

Castillo PE, Chiu CQ, Carroll RC. 2011. Long-term plasticity at inhibitory synapses. *Curr Opin Neurobiol*.

Caulfield M. P. and Birdsall N. J. (1998) Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev.* 50(2):279-90.

Cherubini E., Gaiarsa J. L. and Ben-Ari Y. (1991) GABA: an excitatory transmitter in early postnatal life. *Trends Neurosci* 14(12):515-9.

Chevalere V, Castillo PE (2004). Endocannabinoid-mediated metaplasticity in the hippocampus. *Neuron*. 16;43(6):871-81.

Cobb S. R., Buhl E. H., Halasy K., Paulsen O., Somogyi P. (1995) Synchronization of neuronal activity in hippocampus by individual GABAergic interneurons. *Nature*, 378(6552):75-8.

Dai Mitsushima, Akane Sano and Takuya Takahashi. 2013. A cholinergic trigger drives learning-induced plasticity at hippocampal synapses. *Nature Communications*. doi:10.1038/ncomms3760.

Daniel E. Feldman Synaptic Mechanisms for Plasticity in Neocortex. 2009. *Annu. Rev. Neurosci.* 32:33–55.

Dingledine R. And Gjerstad L. (1980) Reduced inhibition during epileptiform activity in the in vitro hippocampal slice. *J. Physiol.* 80. 305: 297-313.

Dimitri M. Kullmann, Alexandre W. Moreau, Yamina Bakiri, Elizabeth Nicholson. 2012. Plasticity of Inhibition. *Neuron* (Vol. 75, Issue 6, pp. 951-962).

Fernandez de Sevilla D, Cabezas C, de Prada AN, Sanchez-Jimenez A, Buño W (2002) Selective muscarinic regulation of functional glutamatergic Schaffer collateral synapses in rat CA1 pyramidal neurons. *J Physiol (Lond)* 545:51– 63.

Fernández de Sevilla D, Núñez A, Borde M, Malinow R, and Buño W (2008) Cholinergic-Mediated IP3-Receptor Activation Induces Long-Lasting Synaptic Enhancement in CA1 Pyramidal Neurons. *The Journal of Neuroscience* 28(6):1469 –1478 1469.

Fernández de Sevilla D. and Buño W (2003) Presynaptic inhibition of Schaffer collateral synapses by stimulation of hippocampal cholinergic afferent fibres. *Eur. J. Neurosci* 17(3):555-8.

Ferraguti F, Conquet F, Corti C, GrandesMP, 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.

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.

Itier V, Bertrand D (August 2001). "Neuronal nicotinic receptors: from protein structure to function". *FEBS Letters* 504 (3): 118–25.

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.

Klausberger T and Somogyi P. 2008. Neuronal Diversity and Temporal Dynamics: The Unity of Hippocampal Circuit Operations. *Science* 321, 53.

Kullmann D. M. and Lamsa K. P. (2007) Long-term synaptic plasticity in hippocampal interneurons. *Nature rev. neuroscience* 8: 687-699.

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.

Luscher B, Fuchs T, Kilpatrick CL. 2011. GABA<sub>A</sub> receptor trafficking-mediated plasticity of inhibitory synapses. *Neuron* 70(3):385-409.

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.

Marilena Griguoli and Enrico Cherubini. 2012. Regulation of hippocampal inhibitory circuits by nicotinic acetylcholine receptors. *J Physiol* 590.4 pp 655–666.

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.

Marrion N V. 1997. CONTROL OF M-CURRENT. *Annu. Rev. Physiol.* 59:483–504.

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.

Newberry NR and Nicoll RA (1985) Comparison of the action of baclofen with gamma-aminobutyric acid on rat hippocampal pyramidal cells in vitro. *J Physiol*. 360:161-85.

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.

Ovsepian S. V., Anwyl R. and Rowan M.J (2004) Endogenous acetylcholine lowers the threshold for long-term potentiation induction in the CA1 area through muscarinic receptor activation: in vivo study. *Eur. J Neurosci* 20(5):1267-75.

Romo-Parra H., Treviño M., Heinemann U. and Gutiérrez R. (2008) GABA Actions in Hippocampal Area CA3 During Postnatal Development: Differential Shift From Depolarizing to Hyperpolarizing in Somatic and Dendritic Compartments. *J Neurophysiol*, 99: 1523–1534.

R A Deisz and D A Prince.1989. Frequency-dependent depression of inhibition in guinea-pig neocortex in vitro by GABAB receptor feed-back on GABA release.*J Physiol*. 1989 May; 412: 513–541.

Sladeczek F, Pin JP, Recasens M, Bockaert J, Weiss S. 1985. Glutamate stimulates inositol phosphate formation in striatal neurones. *Nature* 317(6039):717-9.

Sreedeeep Mukherjee and Denise Manahan-Vaughan. 2013. Role of metabotropic glutamate receptors in persistent forms of hippocampal plasticity and learning. *Neuropharmacology* 66 65-81.

Stacey S. Willard and Shahriar Koochekpou. 2013. Glutamate, Glutamate Receptors, and

Downstream Signaling Pathways. *Int J Biol Sci.* 9(9): 948–959.

Sugiyama H, Ito I, Hirono C. 1987. A new type of glutamate receptor linked to inositol phospholipid metabolism. *Nature* 325(6104):531-3.

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.

Yakel JL. 2012. Nicotinic ACh receptors in the hippocampus: role in excitability and plasticity. *Nicotine Tob Res.* 14(11):1249-57.