



**Facultad de Medicina
Escuela de Medicina**

“Inhibición de los receptores de ryanodina previene los cambios presinápticos en la depresión a largo plazo”

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Médicas, mención en Biología Celular y Molecular

Tatiana Estefanía Guncay Sangurima

Director de Tesis: Dr. Pablo Muñoz Carvajal

Codirector de Tesis: Dr. Genaro C. Barrientos Briones

MARZO / 2020



**Facultad de Medicina
Escuela de Medicina**

“Inhibición de los receptores de ryanodina previene los cambios presinápticos en la depresión a largo plazo”

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Médicas, mención en Biología Celular y Molecular

Tatiana Estefanía Guncay Sangurima

Director de Tesis: Dr. Pablo Muñoz Carvajal

Codirector de Tesis: Dr. Genaro Barrientos Briones

FECHA: 27 de Marzo, 2020



Facultad de Medicina
Escuela de Medicina

Magíster en Ciencias Médicas Mención Biología Celular y Molecular

“Inhibición de los receptores de ryanodina previene los cambios
presinápticos en la depresión a largo plazo”

Tatiana Estefanía Guncay Sangurima

Este trabajo se realizó bajo la supervisión del Dr. Pablo Muñoz Carvajal en el Laboratorio de Plasticidad Celular y Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso, y ha sido aprobado por los miembros de la Comisión:

Dr. José Luis Bucarey Presidente Comisión	Dra. Tatiana Adasme Profesor Informante	Dra. Arlek González Profesor Informante
--	--	--

Dr. Pablo Muñoz Carvajal
Director de Tesis

Valparaíso, Chile
2020

DEDICATORIA

*"La ciencia dice que estamos hechos de átomos,
pero un pajarito me contó que estamos hechos de historias"*

Eduardo Galeano

Para las mujeres de mi vida, Leticia y Ana Belén.

iNena, lo logramos! Sin duda todo el esfuerzo y perseverancia que me han llevado a cumplir esta meta tan anhelada, son resultado de todo el cariño, comprensión y correcciones recibidos de mi Madre Leticia, tan bella mujer que logra inspirar mi mejor versión.

A mi hermana Ana Belén, eres la única que hace que mi corazón tiemble cuando me voy. Eres mi mayor orgullo.

A mi padre Galo y mi hermano Byron por demostrar que uno siempre puede mejorar cuando se tiene la inspiración correcta.

A mi sobrino Thiago, jugar contigo me recarga el alma.

A Santiago y la Pimi, mis cómplices de mar.

AGRADECIMIENTOS.

A la Virgen del Quinche, mi eterna consejera y
compañera en esta aventura de vivir.

Un enorme ¡Gracias! y abrazo al Dr. Pablo Muñoz, sus consejos y enseñanzas multiplicaron mis logros, su forma de ver la vida me demostró que la inspiración en la ciencia existe, pero tiene que encontrarse trabajando, y que el logro más grande de un científico siempre será mantener su humanidad e impartirla en los demás.

Al Dr. Genaro Barrientos, por su apoyo y correcciones.

A mi familia, y mis suegros, su amor y apoyo es incondicional y gracias a el hoy puedo decir ¡Lo logramos!

A Santiago, yo sé que te conozco de otra vida, de lo contrario, tu mirada no pudiera brindarme tanta paz. Gracias amor, tu apoyo y tus consejos reforzaron mis convicciones.

A Nohela (Bexi), nunca tuvimos una amistad que destruir, si no, una que construir.
¡Gracias!

A Débora, quién sino un ángel como tú podría guiar mi camino. Eres excepcional, y una mujer que derrocha inspiración y gracia. Estas destinada a brillar.

A Macarena Aguilera y Gloria Pino, dos mujeres extraordinarias que con su amabilidad y amistad me hicieron sentir en familia.

Al Dr. Álvaro Ardiles y su equipo de trabajo, Caro y Paula. Gracias por los incontables consejos y apoyo. De igual manera al equipo del Centro de Investigaciones Biomédicas (CIB), y el equipo de trabajo de la Dra. Cecilia Hidalgo, dos grandes instituciones que supieron abrir sus puertas en el transcurso de este proyecto.

Finalmente, gracias a todos aquellos que con una palabra de aliento o una mano amiga me apoyaron a culminar este logro.

ABREVIATURAS

μl: micro litro

μM: micro molar

ACSF: fluido cefalorraquídeo artificial

Ca⁺²: Cación calcio

CO₂: Dióxido de carbono gaseoso

I/O: input/output

ISI: intervalo entre estímulo

LFS: estimulación de baja frecuencia

LTD: depresión de largo plazo

LTD: potenciación de largo plazo

ml: mililitro

mM: mili molar

NT: neurotransmisor

O₂: oxígeno gaseoso

PPF: facilitación de pulso pareado

RE: retículo endoplásmico

RyR: Receptor de Ryanodina

RyR1: Receptor de Ryanodina tipo 1

RyR2: Receptor de Ryanodina tipo 2

RyR3: Receptor de Ryanodina tipo 3

SEM: error estándar de la media

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	4
1 INTRODUCCIÓN.....	5
1.1 NEURONAS Y SINAPSIS.	5
1.1.1 TIPOS DE SINAPSIS.....	6
1.2 PLASTICIDAD SINÁPTICA	7
1.2.1 PLASTICIDAD SINÁPTICA EN ELHIPOCAMPO	8
1.2.2 PROTOCOLOS DE INDUCCIÓN.....	10
1.2.3 REGISTRO ELECTROFISIOLÓGICO: RESPUESTA POSTSINÁPTICA	10
1.3 PLASTICIDAD SINÁPTICA A CORTO PLAZO: FACILITACIÓN DE PULSO PAREADO	11
1.4 LA PLASTICIDAD SINÁPTICA A LARGO PLAZO.....	13
1.4.1 LTP dependiente de NMDAR	15
1.4.2 LTD dependiente de NMDAR	16
1.5 LA LIBERACIÓN DE CA ²⁺ A TRAVÉS DEL RECEPTOR DE RYANODINA.	17
1.5.1 REGULACIÓN DEL RECEPTOR DE RYANODINA	19
1.6 MECANISMOS PRESINÁPTICOS VERSUS POSTSINÁPTICOS	20
2 HIPÓTESIS.....	21
2.1 OBJETIVO GENERAL	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3 METODOLOGÍA	23
3.1 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	23
3.2 MATERIALES.....	25
3.3 ANIMALES	25
3.4 OBTENCIÓN DE REBANADAS DE HIPOCAMPO	25
3.4.1 INCUBACIÓN CON RYANODINA [20 µM]	27
3.5 REGISTRO ELECTROFISIOLÓGICO DEL HIPOCAMPO	27
3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	30
4 RESULTADOS	31
5 DISCUSIÓN.....	39
6 CONCLUSIONES	44
7 BIBLIOGRAFÍA.....	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Estructura de la neurona y la sinapsis..	6
Figura 2	Inducción y expresión de la plasticidad sináptica (PS)..	8
Figura 3	Diagrama del circuito trisináptico del hipocampo..	9
Figura 4	Registro electrofisiológico extracelular típico.	11
Figura 5	Representación gráfica de la facilitación del pulso pareado (PPF)..	12
Figura 6	Modelo para la inducción de LTP y LTD.....	13
Figura 7	Modelo del tráfico de AMPAR durante LTP y LTD.....	15
Figura 8	Influencia de la liberación de Ca^{2+} a través del RyR	19
Figura 9	Representación esquemática del diseño experimental.	24
Figura 10	Representación gráfica de la disección del hipocampo.	27
Figura 11	Esquema del procedimiento electrofisiológico.....	29
Figura 12	El tratamiento con ryanodina [20 μ M]	32
Figura 13	Comparación de trazas representativas de PPF.....	33
Figura 14	Comparación de PPF pre-LTD en el grupo control y el grupo ryanodina...	34
Figura 15	El bloqueo de la liberación de Ca^{2+} a través del RyR.	36
Figura 16	Curso temporal de los cambios en PPF asociados a LTD.....	37

RESUMEN

La plasticidad sináptica se define como cambios dependientes de la actividad en la eficacia sináptica. En particular, la depresión a largo plazo (LTD) requiere de la entrada y amplificación de señales de Ca^{2+} . El receptor de ryanodina (RyR), un canal que permite la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR) desde el retículo endoplásmico, juega un papel crítico en la LTD; sin embargo, su contribución a nivel presináptico ha sido poco estudiado. En este trabajo, estudiamos la participación de los RyRs en los mecanismos presinápticos de la LTD. Nosotros planteamos la siguiente hipótesis: a nivel presináptico, CICR mediada por RyR contribuye a la LTD. Como objetivo general: evaluar la contribución de CICR, en la plasticidad presináptica a largo plazo. Como objetivos específicos: i) determinar si la LTD induce cambios a largo plazo en la facilitación de pulso pareado (PPF), un tipo de plasticidad presináptica; ii) determinar si la inhibición de los RyRs afecta este comportamiento. Usando técnicas electrofisiológicas y rebanadas de hipocampo de rata, encontramos que, en el grupo control se induce depresión en la transmisión sináptica posterior a la inducción de LTD, la cual se acompaña por un aumento significativo en la PPF; mientras que, la inhibición de los RyRs bloquea tanto la LTD como los cambios a largo plazo en PPF. Los datos sugieren que la inducción de la LTD activa mecanismos presinápticos que involucran la salida de Ca^{2+} mediada por RyR en las sinapsis CA3-CA1 de las rebanadas de hipocampo de ratas.

Palabras claves: plasticidad sináptica, depresión de largo plazo, facilitación de pulso pareado, receptor de ryanodina, hipocampo.

1| INTRODUCCIÓN

Las experiencias, los hábitos y las conductas que se generan y almacenan en nuestro cerebro, son resultado de los cambios en la actividad y conectividad de los circuitos neuronales específicos (1, 2). El mecanismo por el cual la actividad neuronal generada por una experiencia modifica la función cerebral es mediante cambios en la transmisión sináptica; característica denominada plasticidad sináptica (PS). Durante las últimas décadas la PS ha sido objeto de una intensa investigación, pues se considera que su entendimiento proporcionaría una mejor comprensión de los mecanismos celulares y moleculares del aprendizaje y la memoria en el cerebro (3-6).

En este estudio, revisaremos los principales conceptos básicos detrás de la PS para luego continuar con la descripción de algunos tipos de PS centrándonos en la depresión a largo plazo (LTD), ya que, los mecanismos presinápticos que operan, así como también, la importancia del Ca^{2+} desde reservas intracelulares sensibles a ryanodina en estos mecanismos, no son del todo comprendidos.

1.1 NEURONAS Y SINAPSI.

Las neuronas son células especializadas del sistema nervioso, que, junto con las células gliales, representan las unidades básicas estructurales y funcionales del cerebro. Las neuronas se encuentran organizadas en grandes y complejas redes denominadas circuitos neuronales, cuya función principal es procesar la información proveniente de estímulos externos e internos, y codificarlos en patrones de actividad eléctrica que se puedan retransmitir entre las distintas regiones del cerebro (7, 8).

En su estructura están conformadas por tres componentes principales, las dendritas, el soma y el axón. Las dendritas son ramificaciones procedentes del soma, que captan las señales provenientes de otras neuronas y las dirigen hacia el soma, éste procesa la información y genera una señal de salida, que viaja a través del axón y es retransmitida hacia otras neuronas (9, 10). La zona de comunicación entre dos neuronas se denomina sinapsis, la neurona que transmite la señal recibe el nombre de neurona presináptica y la que la recibe se denomina neurona postsináptica, mientras que, el espacio que separa los compartimientos pre y post sináptico se denomina hendidura

sináptica (10), los detalles se muestran en la figura 1.

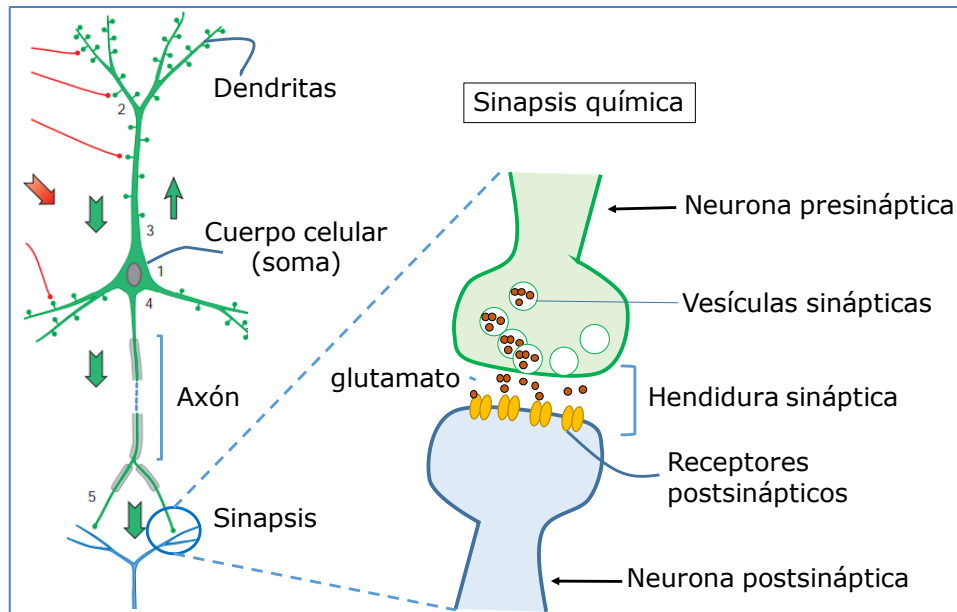


Figura 1 | Estructura de la neurona y la sinapsis. Izquierda: Las células nerviosas tienen 3 regiones principales: dendrita, cuerpo celular y axón. Derecha: Ilustración de la unión de sinapsis entre la neurona presináptica y la neurona postsináptica, y su estructura esquemática en sinapsis química y sinapsis eléctrica.

TIPOS DE SINAPSIS

Existen dos tipos principales de sinapsis: química y eléctrica. Por un lado, las células conectadas a través de sinapsis eléctricas están unidas directamente por unas estructuras intercelulares llamadas uniones gap. Las uniones gap son canales intercelulares que permiten el flujo directo de iones a través de las células interconectadas. Por el contrario, la comunicación en las sinapsis químicas implica la liberación de sustancias químicas, conocidos como neurotransmisores (NT), desde el terminal presináptico, su difusión a través de la hendidura sináptica y su unión a los receptores de la membrana postsináptica (10, 11), refiérase a la figura 1. La unión de los NT a los receptores postsinápticos provoca la despolarización de la membrana en el caso de las sinapsis excitadoras cuyo NT es el glutamato (12), o la hiperpolarización de la membrana en el caso de las sinapsis inhibitorias (13).

1.2 PLASTICIDAD SINÁPTICA

La PS se refiere principalmente al fortalecimiento o debilitamiento en la estructura, función y eficacia sináptica (fuerza de conexión) entre las neuronas pre y postsinápticas, en una forma dependiente de actividad (14). Este tipo de plasticidad puede implicar cambios en la eficacia de los contactos sinápticos existentes, formación de nuevos contactos sinápticos, y/o eliminación de los contactos ya existentes (9, 15, 16). Dichos cambios dependen a su vez de la coordinación espacio-temporal de (a) el número de receptores en la membrana postsináptica, (b) la cantidad de NT liberados desde la neurona presináptica, y (c) la sensibilidad de los receptores postsinápticos hacia los NT liberados (15, 17, 18), obsérvese la figura 2.

La PS se puede desarrollar a diferentes escalas de tiempo que van desde fracciones de segundos a minutos, conocida como PS a corto plazo (STP: *short-term plasticity*) (19), hasta periodos más largos como horas, días e incluso semanas (20), conocida como PS a largo plazo. De este último grupo, las formas mejor estudiadas son la potenciación a largo plazo (LTP: *long-term potentiation*), y la depresión a largo plazo (LTD: *long-term depression*) (21, 22).

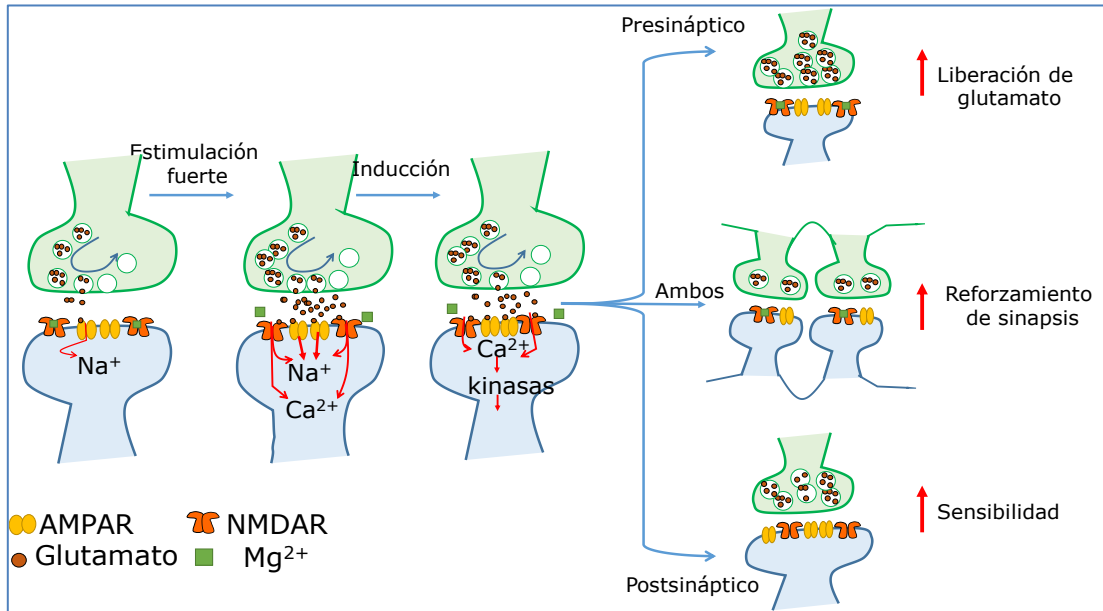


Figura 2 | Inducción y expresión de la plasticidad sináptica (PS). La estimulación fuerte y repetitiva sobre la neurona presináptica provoca la liberación del glutamato, una vez libre en la hendidura sináptica, el glutamato, puede activar los receptores postsinápticos: AMPA y NMDA. La activación del canal NMDA permite la entrada de Ca^{2+} , que es un paso crítico en la inducción de la PS, direccionando hacia la LTP o la LTD, dependiendo del patrón de la entrada de Ca^{2+} . En este caso se muestra una activación preferente de proteínas quinasas. Entre los pasos que conducen a la expresión de PS, están: un aumento en la liberación de glutamato, reclutamiento de los nuevos receptores AMPA para aumentar la sensibilidad de la respuesta postsináptica, y cambios estructurales que podrían incluir la formación de nuevas sinapsis.

La PS a largo plazo, su observación en distintas regiones del cerebro (23-26) y la capacidad de bloquear su inducción con agentes farmacológicos junto con interrumpir la adquisición del aprendizaje (4, 27, 28), son consistentes con la idea de que la PS puede desempeñar un rol importante tanto en el desarrollo impulsado por la actividad de las redes neuronales como en el almacenamiento de memoria.

1.2.1 PLASTICIDAD SINÁPTICA EN EL HIPOCAMPO

El hipocampo se reconoce como una estructura clave en el desarrollo del aprendizaje y la memoria tanto en los humanos como en otros mamíferos (7). El circuito principal de procesamiento de información en el hipocampo es la vía excitatoria

trisináptica (29) que parte con la estimulación de las fibras nerviosas de la vía perforante provenientes de la corteza entorrinal, a su vez, éstas activan a las células granulares del giro dentado que, a través de sus axones (fibras musgosas), activan a las células piramidales de la región CA3, por su parte, una rama colateral de los axones de las células piramidales CA3 (colaterales de Schaffer) hacen sinapsis con las dendritas apicales de las células pirámides CA1 (10, 14). Finalmente, las células de CA1 envían sus axones al subículum y a las capas profundas de la corteza entorrinal cerrando el circuito, en la figura 3.

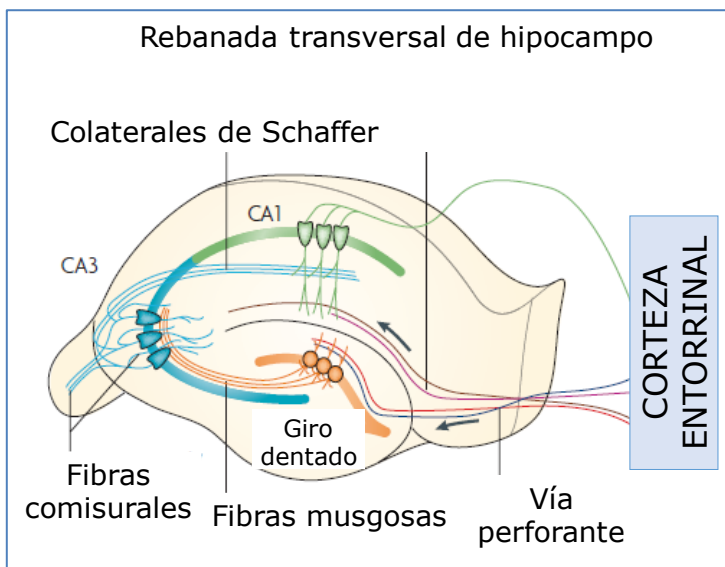


Figura 3 | Diagrama del circuito trisináptico del hipocampo. El estímulo llega al hipocampo a través de los axones de la vía perforante, hacia las células granulares del giro dentado, éstas proyectan sus axones (fibras musgosas) hacia CA3 que, a su vez, se proyectan hacia las células piramidales CA1 a través de colaterales Schaffer. Nótese que los tres sub campos principales tienen una organización laminar en la que los cuerpos celulares están

fuertemente empaquetados en una disposición en forma de C entrelazada, con fibras aferentes que terminan en regiones selectivas del árbol dendrítico. Modificada de *Neves y col*, 2008.

Gran parte de este circuito básico se conserva en los cortes transversales del hipocampo, y se han caracterizado ampliamente mediante técnicas electrofisiológicas, bioquímicas y moleculares (7, 30-32); siendo, la sinapsis de las células piramidales colaterales de Schaffer-CA1, una de las sinapsis mejor entendidas en el cerebro de los mamíferos (33-36) . Por ende, un gran número de investigaciones utilizan los cortes transversales de hipocampo mantenidas *in vitro* como modelo experimental para el estudio electrofisiológico de la PS.

1.2.2 PROTOCOLOS DE INDUCCIÓN

La principal característica de un protocolo de inducción de PS es el número de pulsos (estímulos) y la frecuencia con las que se aplican sobre la sinapsis, a esto se le conoce como un tren de estímulos (37). Los trenes de estímulos son muy importantes dado que la información que una neurona debe transmitir se encuentra codificada en ellos. En este contexto, para inducir una LTP se aplican, por ejemplo, protocolos de estimulación theta (TBS: *theta-burst stimulation*) consistentes en cuatro trenes de estímulos administrados a intervalos de 20 segundos durante 1 minuto (37, 38). Mientras que, los protocolos de estimulación de baja frecuencia (LFS: *low-frequency stimulation*), consistentes en 900 pulsos aplicados a 1 Hz durante 15 minutos, representan un método eficaz para inducir LTD en los cortes transversales de hipocampo (6, 21). Cabe destacar que estos protocolos de estimulación son los que mejor imitan los patrones de activación neuronal fisiológica (21, 37).

1.2.3 REGISTRO ELECTROFISIOLÓGICO: RESPUESTA POSTSINÁPTICA

En cuanto al registro electrofisiológico, puede ser de tipo extracelular o intracelular dependiendo de si la respuesta se registra fuera (3, 39) o dentro de la célula (40), respectivamente. En los registros extracelulares, la estimulación se aplica sobre la neurona presináptica, y se registra la respuesta sobre la neurona postsináptica. La respuesta postsináptica típica consiste en una traza compuesta por un "*fiber volley*", que es una medida de la respuesta presináptica evocada por el estímulo en el sitio de registro, y el potencial excitatorio postsináptico de campo (fEPSP: *field excitatory postsynaptic potential*) que es una medida del cambio de potencial en el tiempo (despolarización) en las neuronas postsinápticas (41), véase el esquema en la figura 4. En este caso, el parámetro típicamente medido es la pendiente inicial de la curva del fEPSP, la amplitud máxima absoluta de los EPSP también se puede medir, sin embargo, ésta es más propensa a la contaminación con otras fuentes de flujo de corriente como señales inhibitorias compensatorias y/o potenciales de acción que se puedan evocar

durante el estímulo (21, 41).

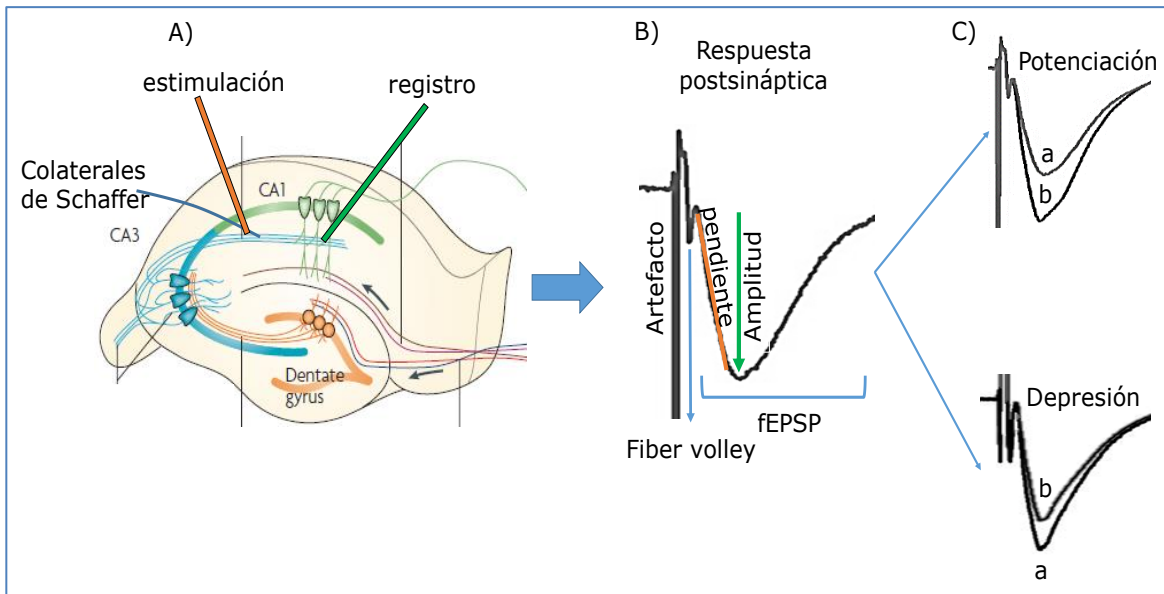


Figura 4| Registro electrofisiológico extracelular típico en un corte transversal del hipocampo. A) circuito hipocámpal CA3-CA1 que muestra la ubicación de los electrodos de estimulación y registro. B) Ejemplo de un registro de potencial excitatorio postsináptico de campo (fEPSP), indicando su fiber volley y el artefacto de estímulo. También se muestra la medida de la amplitud de la curva (línea verde), y la pendiente inicial (línea naranja). C) ejemplos de dos respuestas prototípicas superpuestas siendo (a) la respuesta inicial y (b) la respuesta posterior al protocolo de estimulación. Arriba muestra una respuesta potenciada, mientras que en la parte inferior se muestra una respuesta deprimida.

1.3 PLASTICIDAD SINÁPTICA A CORTO PLAZO: FACILITACIÓN DE PULSO PAREADO

En la región del hipocampo, si la neurona presináptica recibe estimulación pareada con intervalos de tiempo en milisegundos, la respuesta postsináptica evocada por el segundo estímulo tiende a presentar mayor amplitud (facilitación) que la respuesta evocada por el primer estímulo, a esto se conoce como facilitación de pulso pareado (PPF: *paired-pulse facilitation*), que gráficamente se representa como la relación entre la segunda respuesta sobre la primera (42-44), véase la figura 5.

El PPF ha sido utilizado ampliamente como un indicador de actividad pr

esináptica, ya que, se relaciona indirectamente con **Pr**. De esta forma, las sinapsis con una baja probabilidad de liberar el NT tienden a exhibir un PPF más alta, como es caso del hipocampo (33, 45).

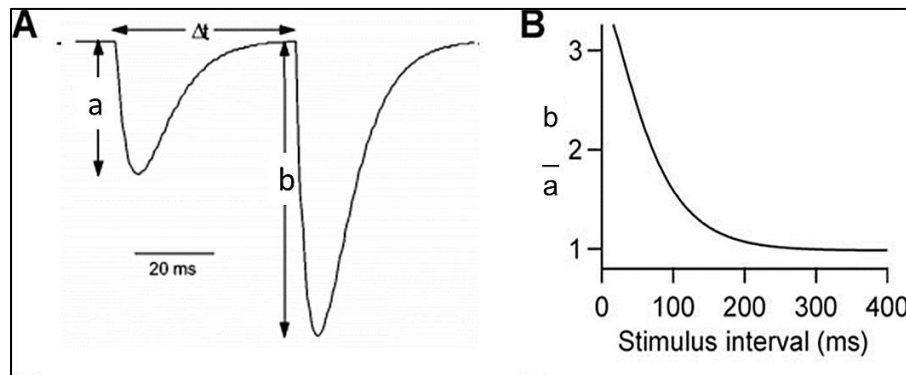


Figura 5| Representación gráfica de la facilitación del pulso pareado (PPF). A) la activación con pares de estímulos separados por un tiempo (Δt) evoca un fEPSP con la segunda respuesta (b) más grande que la primera (a). B) la gráfica de (b/a) vs. Δt , muestra el curso de tiempo típico de la PPF donde la magnitud de la facilitación disminuye a medida que aumenta el intervalo entre pulsos. Modificado de *Jackman SL & Regehr WG, 2017*.

El fenómeno de PPF es explicado generalmente por la hipótesis de Ca^{2+} residual propuesta por *Katz y Miledi (46)*, donde se afirma que la facilitación de pulso se debe a que una fracción del flujo de Ca^{2+} presináptico, generado por el primer estímulo, podría persistir en las terminales nerviosas después de la primera descarga, sumarse al Ca^{2+} local evocado por el segundo estímulo, y generar una señal de Ca^{2+} más grande que conlleve a una mayor liberación del NT, con el correspondiente aumento de la respuesta postsináptica (46-48). Sin embargo, la facilitación de pulso se presenta solo a intervalos de tiempo muy cortos (20-200 ms), ya que conforme aumenta el intervalo de tiempo, dentro de la neurona comienzan a surgir los mecanismos de regulación y secuestro del Ca^{2+} , así como, la respuesta inhibitoria complementaria (42), ver figura 5, panel izquierdo.

1.4 LA PLASTICIDAD SINÁPTICA A LARGO PLAZO

Se cree que tanto los mecanismos que subyacen a la LTP como a la LTD son responsables de codificar los recuerdos duraderos que se almacenan en los circuitos cerebrales (26, 49, 50). En estos tipos de PS se considera que la actividad de la fuerza sináptica está controlada, al menos parcialmente, por el equilibrio entre las actividades de las proteínas quinasas y fosfatasa, críticas para la inducción de LTP o LTD (51-53). A su vez, esta bidireccionalidad dependerá en gran parte del patrón de entrada del Ca^{2+} durante la estimulación repetida, como se muestra en la figura 6.

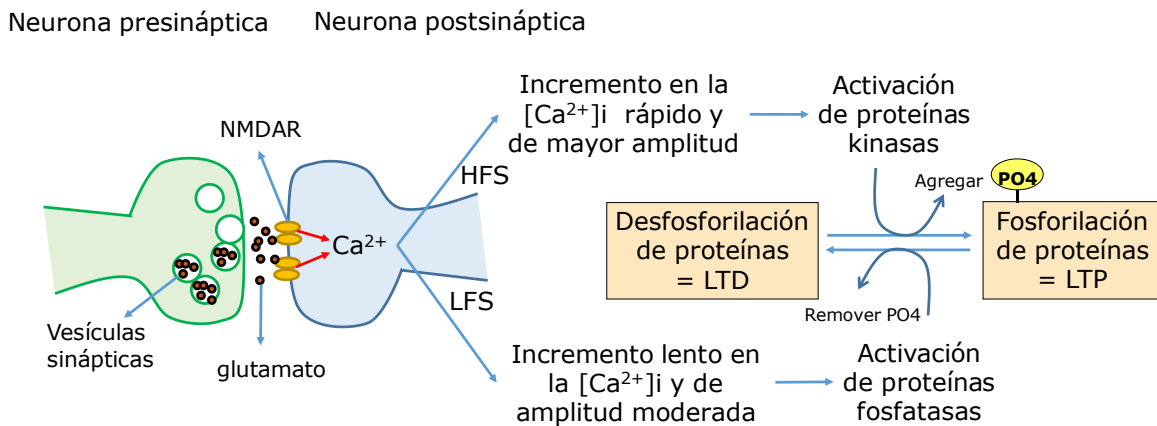


Figura 6 | Modelo para la inducción de LTP y LTD. Durante la estimulación, el Ca^{2+} ingresa a las espinas dendríticas a través de los receptores NMDA. La estimulación de alta frecuencia (HFS) causa la fosforilación (a través de proteínas quinasas) de una proteína de sinapsis, y la estimulación de baja frecuencia (LFS) causa la desfosforilación (a través de proteínas fosfatasa) de la misma proteína sináptica. El estado de fosforilación de esta proteína ayuda a controlar la fuerza sináptica. HFS: estimulación de alta frecuencia, LFS: estimulación de baja frecuencia, $[\text{Ca}^{2+}]_i$: concentración de calcio intracelular.

Tanto para la LTP como la LTD los mecanismos mejor estudiados son los postsinápticos, que constan de la sincronización de los receptores ionotrópicos de glutamato: el receptor de ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico (AMPA) y, el receptor de N-metil-D-aspartato (NMDAR) (12). Por el contrario, siendo aún poco estudiada, los cambios a largo plazo que ocurren a nivel presináptico se han asociado a cambios en la probabilidad de liberación de glutamato y el movimiento de

vesículas (28, 50, 54).

1.4.1 LTP dependiente de NMDAR

La forma más ampliamente estudiada de la PS es la LTP en la sinapsis CA3-CA1 del hipocampo (55, 56). La LTP se considera como un reforzamiento sostenido de la fuerza de conexión sináptica, que requiere la movilización de los receptores de AMPA hacia la superficie de la membrana postsináptica, en conjunto con la activación de los receptores de NMDA durante la despolarización postsináptica fuerte (39, 57).

El receptor de AMPA tiene un canal permeable a cationes monovalentes (Na^+ y K^+) y su activación, mediante la unión del glutamato, proporciona la mayor parte de la corriente interna de iones que genera un cambio eléctrico y por ende la despolarización de la membrana (58). Por otro lado, en estado basal de transmisión los NMDAR presentan un bloqueo del canal iónico con Mg^{2+} ; sin embargo, durante la despolarización postsináptica fuerte, debido al ingreso de iones a través del AMPAR, el Mg^{2+} es disociado del canal, lo que permite la entrada de Ca^{2+} al terminal postsináptico (23, 59). Debido a que su contribución a las respuestas postsinápticas requiere tanto la liberación presináptica de glutamato como la despolarización postsináptica debido a la activación de AMPAR, el NMDAR a menudo se conoce como un "detector de coincidencia" (60).

Una vez activado el NMDAR, el aumento en la concentración de Ca^{2+} dentro del terminal postsináptico activa principalmente proteínas quinasas, como la calmodulina-quinasa II (CaMKII), cuya señalización conduce a un aumento en la conductancia del canal de AMPAR, además de promover la incorporación de AMPAR adicionales en la superficie de la membrana postsináptica (61, 62), el esquema se detalla en la figura 7.

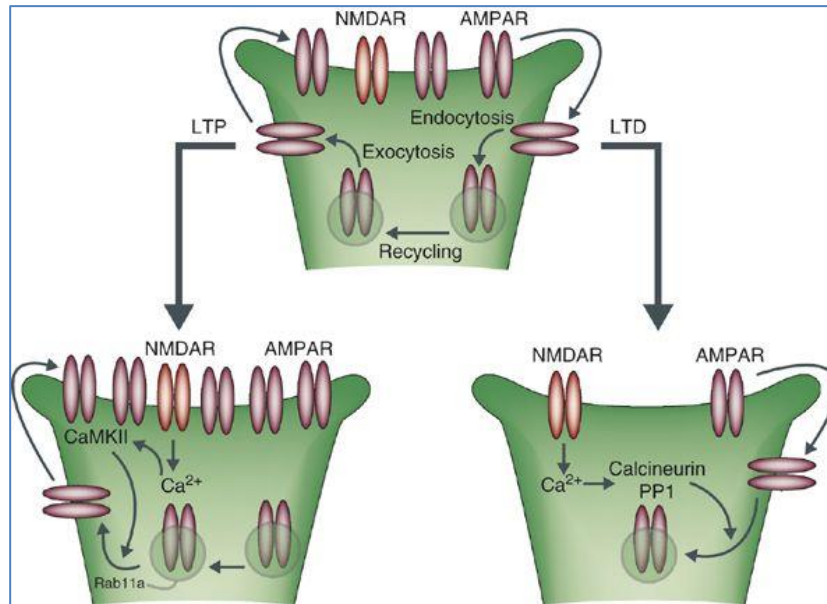


Figura 7 | Modelo del tráfico de AMPAR durante LTP y LTD. En el estado basal (parte superior), los AMPAR circulan entre la membrana postsináptica y los compartimentos intracelulares. Después de la inducción de LTP, hay una mayor exocitosis y estabilización del receptor en la sinapsis a través de un proceso que involucra CAMKII. Después de la inducción de LTD, se produce una endocitosis mejorada del receptor que involucra proteínas fosfatasas, principalmente calcineurina y proteínas fosfatasas 1 (PP1). Tomada de *Citri & Malenka, 2008*.

1.4.2 LTD dependiente de NMDAR

En contraste con la LTP, la LTD abarca un debilitamiento robusto y sostenido en la eficacia sináptica, cuya intensidad se relaciona directamente con la disminución en la probabilidad de liberar el glutamato (22, 63). La LTD se ha observado en muchas sinapsis, incluyendo el hipocampo (63, 64), amígdala (24, 65), y cerebelo (66). La creciente evidencia sugiere que la LTD podría representar un proceso crítico para los mecanismos como: prevenir la saturación sináptica en redes neuronales (6), y aumentar la capacidad de almacenamiento de memoria (67).

Post sinápticamente, la LTD implica incrementos moderados en la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) (21, 68), inducidos por la aplicación de protocolos de LFS, que promueve una activación preferencial de enzimas fosfatasas (53, 69). Un ejemplo,

es la calcineurina que desfosforila el inhibidor-1 que conduce a la activación de la proteína fosfatasa 1 (PP1) (69), responsables de las desfosforilaciones en subunidades AMPAR que terminarán en su endocitosis con la consecuente expresión de LTD (22, 70), refiérase a la figura 7. Por el contrario, a nivel presináptico la LTD se asocia con la disminución en la **Pr** del glutamato (68, 71). El proceso preciso mediante el cual la liberación del NT se altera de manera duradera sigue siendo en gran parte desconocido, y entre los posibles mecanismos los mejor establecidos son los relacionados con el movimiento de vesículas (SV: *synaptic vesicle*) (72, 73) y los incrementos transitorios de las $[Ca^{2+}]_i$ (74-76).

1.4.2.1 FACTORES PRESINÁPTICOS RELEVANTES EN LA LTD

a) Cambios en la exocitosis de vesículas presinápticas

La exocitosis vesicular está estrechamente regulada en el terminal presináptico (77) y es un determinante importante de la probabilidad de liberación del NT (73, 78). La liberación del NT desde las vesículas sinápticas comienza con la llegada de los potenciales de acción a los extremos presinápticos, la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (VGCC), la entrada de Ca^{2+} y la exocitosis del NT (79-81) desde las zonas activas (AZ: *active zone*), zonas de la membrana presináptica, especializadas en la liberación del NT (82, 83).

En las sinapsis del hipocampo, la población de vesículas que soportan la liberación del NT puede dividirse funcionalmente en dos subgrupos: una fracción de reciclaje, que sufre fácilmente exocitosis y recambio de vesículas, y un grupo residual en reposo (82, 84). Si bien, el número total de vesículas sinápticas en el terminal presináptico no es un indicador confiable de la **Pr**, ya que no todas contribuyen al rendimiento sináptico impulsado por la actividad, es la movilización de vesículas desde el pool de vesículas fácilmente liberables hacia la AZ la que tiene una correlación positiva significativa con la **Pr** (85-87).

b) Señalización presináptica de Ca^{2+}

El Ca^{2+} desempeña un papel clave en la modulación de la PS. La hipótesis actual

predominante es que las propiedades cuantitativas de la señal de Ca^{2+} dentro del terminal presináptico, al igual que en el postsináptico, determinan si se desencadena la LTP o la LTD. Por un lado, la LTD requeriría un aumento moderado de Ca^{2+} (52, 88, 89), mientras que la LTP un aumento fuerte más allá de algún valor umbral crítico (21).

En el terminal presináptico, al igual que en el postsináptico, la calmodulina, una proteína sensor de alta afinidad al Ca^{2+} , es la principal responsable de comunicar las variaciones en la concentración intracelular de Ca^{2+} , hacia otras proteínas (90-92), entre éstas, a la calmodulin-quinasa II dependiente de Ca^{2+} (CaMKII) (52, 93). Varios estudios, han demostrado que la CaMKII presináptica juega un rol importante en la inducción de la LTD, pues al inhibir la actividad presináptica de esta quinasa se ve afectada la depresión de la eficacia sináptica (93, 94). Entre los sustratos de la CaMKII se destaca la sinapsina I, una proteína vesicular sináptica que está involucrada directamente con la distribución de las vesículas dentro del compartimento presináptico (95, 96). Evidencia reciente ha demostrado que la fosforilación de sinapsina I, por parte de la CaMKII, conduce a un aumento en el conjunto de vesículas fácilmente liberables, lo que aumenta la disponibilidad de vesículas para exocitosis (95, 97). Sin embargo, estudios en ratones *knock-out* para las tres isoformas (I, II, III) de sinapsina encontraron que un cambio en la distribución del grupo de vesículas fácilmente liberables, no necesariamente se acompaña de cambios en la liberación del NT (97), y que la actividad presináptica de CaMKII puede potenciar o deprimir la transmisión sináptica dependiendo del patrón de estimulación sináptica (88).

Por su parte, los incrementos de Ca^{2+} dentro del compartimento presináptico tiene dos elementos importantes: a) el ingreso del Ca^{2+} extracelular que inicia el proceso de exocitosis (98) y, b) la salida de Ca^{2+} desde reservorios intracelulares que amplifican la señal de Ca^{2+} (91, 99). Para el segundo caso, se ha demostrado que la liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplásmico (RE), a través de los receptores de ryanodina (RyR) e inositol-3-fosfato (IP3), amplifican la señalización de Ca^{2+} (100-102) y, por lo tanto, podrían modular la maquinaria de liberación del NT (101).

1.5 LA LIBERACIÓN DE Ca^{2+} A TRAVÉS DEL RECEPTOR DE RYANODINA.

Los RyR toman su nombre de su unión de alta afinidad con la ryanodina, un

alcaloide vegetal, permeable a las células que tiene la particularidad de actuar como activador del canal en concentraciones menores a 10 μM y como inhibidor en concentraciones mayores a 10 μM (103-105). Las tres principales isoformas del receptor (RyR1, RyR2 y RyR3) se expresan ampliamente en el musculo esquelético, tejido cardíaco y cerebro, de los tres, la isoforma mejor estudiada y predominante en el hipocampo es los RyR2 (104, 106, 107). Una de sus principales funciones es modular los niveles intracelulares de Ca^{2+} a través del mecanismo de la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR) desde el RE (103).

CICR es un proceso de amplificación de la señal de Ca^{2+} que se inicia por la afluencia de Ca^{2+} a través de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje presentes en la membrana, o a través de la activación de la liberación de Ca^{2+} desde el RE mediada por los IP_3R , en este caso el Ca^{2+} liberado por los IP_3R estimula a los RyR que libera Ca^{2+} al citosol (45, 108, 109). Esta amplificación de la señal de Ca^{2+} presináptica influye en mecanismos como la liberación espontánea y provocada de NT (35, 110), la sincronía de la fusión de las SV (111, 112), cambios a nivel de **Pr** (74), todo esto en conjunto, involucraría cambios relevantes en la STP (113), como en la LTD (114, 115). La figura 8 muestra un esquema de estos eventos celulares.

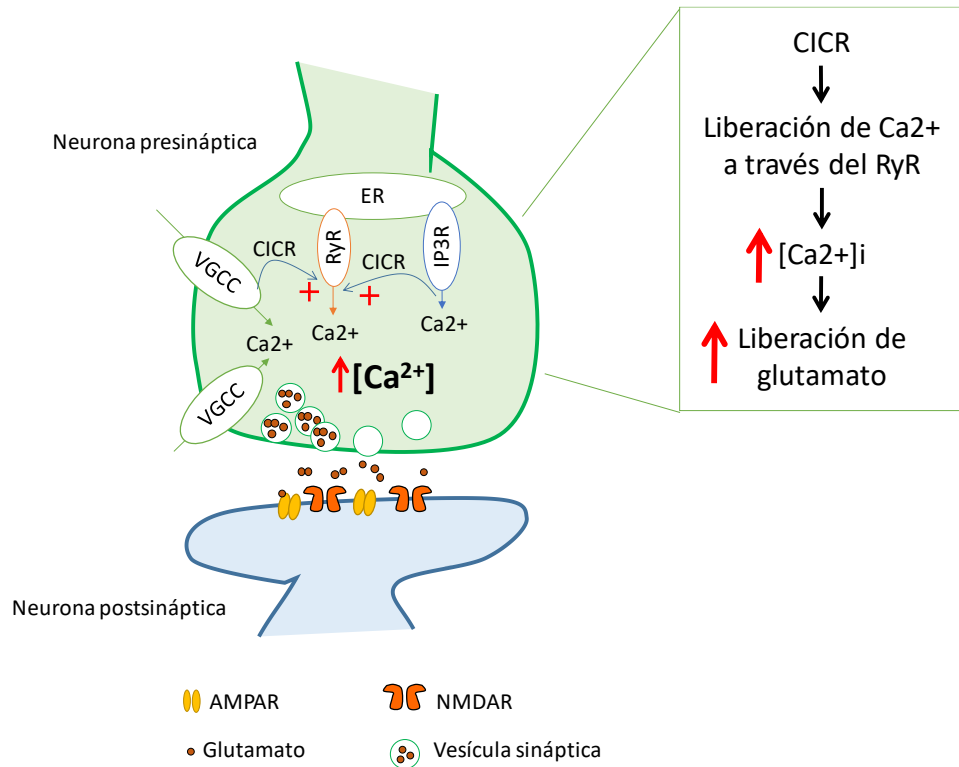


Figura 8 | Influencia de la liberación de Ca^{2+} a través del RyR en la liberación del neurotransmisor (NT). Tras la estimulación, la concentración de Ca^{2+} en el terminal presináptico se eleva drásticamente debido a la afluencia de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (VGCC) y la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR) desde el retículo endoplásmico (RE), mediada por los receptores de ryanodina (RyR). Dado que la elevación citosólica de Ca^{2+} dependiente de IP3R suele ser suficiente para estimular los RyR, se cree que IP3R y RyR cooperan en el inicio y la propagación de CICR. La liberación de Ca^{2+} , ya sea aumentada o disminuida, desde estos reservorios afecta a la concentración de Ca^{2+} citosólico presináptico $[\text{Ca}^{2+}]_i$, y esto a su vez, modifica la magnitud de la liberación de vesículas sinápticas.

1.5.1 REGULACIÓN DEL RECEPTOR DE RYANODINA

Los RyR presenta una estructura molecular compleja, que exhibe sitios de activación con alta afinidad de Ca^{2+} , que desencadenan la liberación del Ca^{2+} desde el lumen del RE, pero también sitios inhibidores de baja afinidad de Ca^{2+} , por lo que, presenta una dependencia bifásica al Ca^{2+} citosólico (116-119). Esto significa que, cuando la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ está por debajo de un umbral crítico, los iones Ca^{2+} activan los canales

del RyR para promover la liberación de Ca^{2+} desde el RE, pero cuando se excede este umbral crítico, hay más disponibilidad de Ca^{2+} para unirse a los sitios de inhibición, lo que conduce a la atenuación de la liberación de Ca^{2+} y la restauración de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a niveles de reposo (100). El canal de liberación también puede ser regulado indirectamente, por proteínas de unión a Ca^{2+} en ambos lados de la membrana del ER (101). Por ejemplo, la calmodulina puede activar o inhibir RyR dependiendo de las concentraciones de Ca^{2+} (120), mientras que la Ca^{2+} /CaMKII se asocia, fosforila y regula la actividad de RyR en el corazón y el músculo esquelético (111). Por el otro lado, la calsequestrina (CSQ) y la calreticulina, dos proteínas principales de unión al Ca^{2+} luminal en la luz del RE, están asociadas al funcionamiento del RyR y son responsables de aumentar el poder de amortiguamiento de Ca^{2+} dentro del RE (104, 121).

La liberación de Ca^{2+} desde el RE también está acoplada a los mecanismos de eliminación de Ca^{2+} . Mientras que la extrusión de Ca^{2+} a través de la bomba de Ca^{2+} de la membrana plasmática (PMCA: *Plasma membrane calcium pump*) sirve para reducir la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y limitar el CICR (100, 122), el secuestro de Ca^{2+} dependiente de la bomba de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (SERCA: *sarcoplasmic reticulum calcium pump*) promueve la absorción de Ca^{2+} dentro del RE para su liberación posterior (123).

1.6 MECANISMOS PRESINÁPTICOS VERSUS POSTSINÁPTICOS

Uno de los aspectos de LTD más intensamente estudiados y menos resueltos se refiere al lugar de expresión de la LTD (33, 78). El debate "pre" versus "post" discute sobre si los cambios relevantes para la inducción y mantenimiento de la LTD residen pre-sinápticamente, manifestándose como un descenso en la liberación del NT o un fenómeno similar, o post-sinápticamente, como un cambio en la respuesta de los receptores AMPA y NMDA al glutamato. Numerosos estudios han abordado esta pregunta, y hasta el momento no hay una respuesta clara de consenso (18, 83, 124, 125). Sin embargo, durante los últimos años mayor evidencia se ha acumulado hacia la hipótesis "pre" frente a la hipótesis "post", revelando un rol importante para los RyRs. Sin embargo, aún no se ha identificado una señal específica de Ca^{2+} atribuible a la liberación de Ca^{2+} mediada por RyR o IP3R durante la inducción de LTD, ni se ha investigado directamente la contribución presináptica de estos receptores.

Con base en esto y los antecedentes antes presentados, en nuestro estudio pretendemos proporcionar información sobre un presumible rol presináptico para los RyR en la expresión de la LTD. Para lograrlo analizaremos los cambios que se puedan presentar en las respuestas de PPF evocadas antes y después de inducir una LTD en las sinapsis colaterales de Schaffer-CA1 y, examinaremos cómo la modificación de la actividad del RyR, mediante la aplicación de concentraciones inhibitorias de ryanodina, afecta este tipo de PS.

2| HIPÓTESIS

La liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} desde compartimentos intracelulares presinápticos sensibles a ryanodina contribuye a la inducción de la depresión sináptica a largo plazo en la región CA3-CA1 de rebanadas de hipocampo de ratas.

2.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la contribución de la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} , mediada por el receptor de ryanodina, en la plasticidad presináptica a largo plazo inducida por estimulación de baja frecuencia en rebanadas de hipocampo de ratas jóvenes.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Determinar cambios en la facilitación de pulso pareado veinte minutos antes y una hora después de aplicar un protocolo de baja frecuencia sobre las colaterales de Schaffer que inducen LTD en la sinapsis CA1 en rebanadas de hipocampo de rata.

Racional: Los experimentos propuestos nos permitirán evaluar, por medio de la estimulación de pulso pareado, si hay cambios en el componente presináptico durante la depresión sináptica a largo plazo.

- II. Determinar si la inhibición de la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} mediada por el receptor de ryanodina, afecta la facilitación de pulso pareado veinte minutos antes y una hora después de la aplicación de un protocolo de baja frecuencia sobre las colaterales de Schaffer que inducen LTD en rebanadas de hipocampo de rata.

Racional: Los experimentos propuestos en presencia y ausencia de concentraciones inhibitorias de ryanodina nos permitirán determinar la participación de la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} mediada por RyR en los procesos presinápticos que ocurren durante la depresión a largo plazo.

3| METODOLOGÍA

3.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

El presente estudio corresponde a un diseño experimental, no aleatorizado. Se trabajó con un tamaño muestral de 5 ratas *Sprague Dawley*, machos de entre 21 a 30 días de edad.

La parte experimental se realizó una vez obtenidas las rebanadas de hipocampo. Para esto, del grupo total de rebanadas obtenido de cada animal, se distribuyeron en un grupo control, y un grupo que fue incubado con ryanodina al menos una hora (grupo ryanodina). De tal forma, que los resultados obtenidos para cada set de experimentos (grupo control y grupo ryanodina) son provenientes del mismo animal, pero de rebanadas distintas. El diseño general se presenta en la figura 9, los detalles de cada proceso se describen más abajo.

Criterios de exclusión:

- En rebanadas: se descartaron todas aquellas rebanadas cuya integridad estuviera comprometida o que su grosor no fuera regular para toda la rebanada. Esto lo comprobamos a través de la una lupa que permitía diferenciar todas las zonas características del hipocampo.
- En Registros: fueron descartados todos aquellos registros cuya respuesta basal no se estabilizó en un máximo de una hora o cuyas respuestas se fueran incrementado o deprimiendo desproporcionalmente en el tiempo.

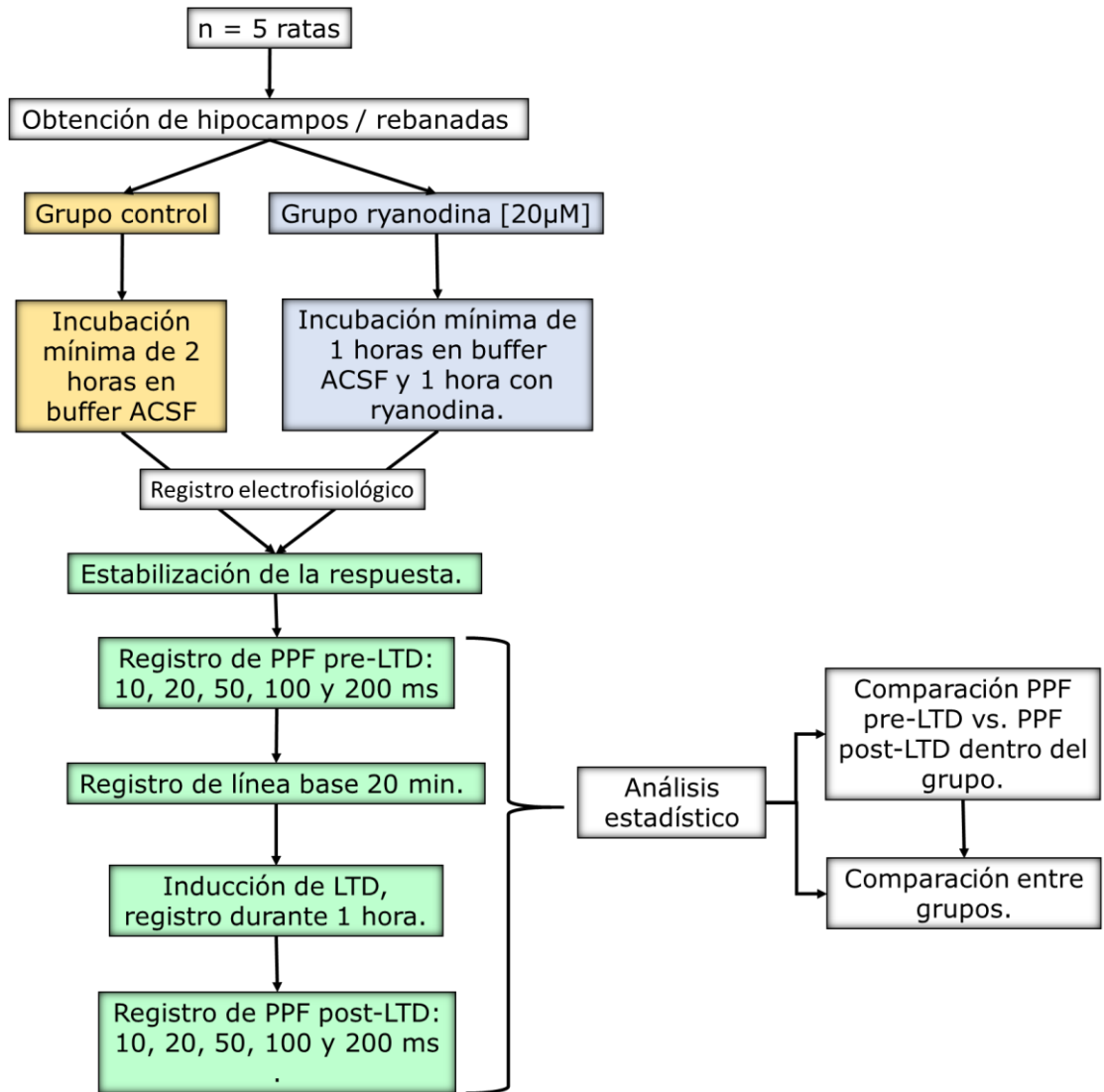


Figura 9 | Representación esquemática del diseño experimental.

3.2 MATERIALES

Todos los reactivos utilizados en este estudio fueron de grado analítico. Las soluciones stock de ryanodina fueron preparadas en agua y se almacenaron en alícuotas a -20 °C antes de la descongelación y dilución hasta sus concentraciones finales en solución de fluido cefalorraquídeo artificial (ACSF) (en mM: 124 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂, 2 CaCl₂, 1,25 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃, pH 7,4, 10 glucosa). La solución de ACSF se mantuvo en constante oxigenación en proporción 95% O₂ / 5% CO₂.

3.3 ANIMALES

Se trabajó con ratas macho *Sprague Dawley* entre 21 y 30 días de edad provenientes de las instalaciones de animales de la Universidad de Valparaíso (n=5). La comida y el agua fueron provistas *ad libitum*; con ciclos de luz / oscuridad de 12 / 12 horas.

Todo el experimento se llevó a cabo siguiendo los lineamientos y reglamentos para el cuidado y uso de animales con fines científicos. Nos limitamos a seguir las pautas *ARRIVE* para informar sobre la investigación en animales del Centro Nacional para el Reemplazo, Refinamiento y Reducción de Animales en Investigación, Londres, Reino Unido (126), que es utilizado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Universidad de Valparaíso (CICUAL-UV)(127).

3.4 OBTENCIÓN DE REBANADAS DE HIPOCAMPO

En primera instancia los animales fueron sometidos a anestesia profunda por saturación, dentro de un recipiente de plástico con tapa hermética, con halotano (2-bromo-2-cloro-1,1,1-trifluoroetano, con 99% pureza de Sigma-Aldrich). Una vez que el animal estuvo sedado, se midieron los reflejos en sus extremidades posteriores, y posteriormente se les aplicó eutanasia por decapitación; el corte se realizó a nivel cervical usando una guillotina para ratas. Por un lado, el cuerpo del animal se envasó, etiquetó y eliminó como material biológico de acuerdo a los protocolos correspondientes. Por otro lado, utilizando material quirúrgico esterilizado se inició la rápida extracción de los cerebros para colocarlos en una placa Petri con papel absorbente impregnado de

buffer de disección en frío (en mM: 212,7 sacarosa, 10 glucosa, 5 KCl, 1,25 NaH₂PO₄, 2 MgCl₂, 1 CaCl₂, 26 NaHCO₃, pH 7,4, oxígeno (95% O₂ / 5% CO₂).

El cerebelo y una pequeña sección de la corteza frontal fueron removidos por corte de bisturí, y los cerebros fueron hemi seccionados a lo largo de la fisura longitudinal, los detalles se muestran en la figura 10. Mediante disección se obtuvo la región del hipocampo, se perfiló la forma del hipocampo a una disposición más rectangular, e inmediatamente después se montaron los hipocampos en forma vertical en la platina del vibratome VT 1200 S (Leica, Wetzlar, Alemania). Posteriormente, la platina fue sumergida en buffer de disección helado oxigenado (95% O₂ / 5% CO₂) y los hipocampos fueron cortados en rebanadas transversales de 400 μm de ancho. Se obtuvo un mínimo de ocho cortes, validando como primer corte aquel en el que todas las subregiones del hipocampo eran claramente distinguibles a fin de garantizar un buen estado de la rebanada. Finalmente, los cortes fueron transferidos a una cámara de inmersión provista con solución de ACSF y constante oxigenación (95% O₂ / 5% CO₂), dejando estabilizar las rebanadas a temperatura ambiente durante 1 h. El número de rebanadas obtenidas de cada animal se distribuyeron en dos grupos, un grupo control (sin tratamiento con ryanodina) y un grupo experimental (tratado con ryanodina en concentración 20 μM durante 1 hora).

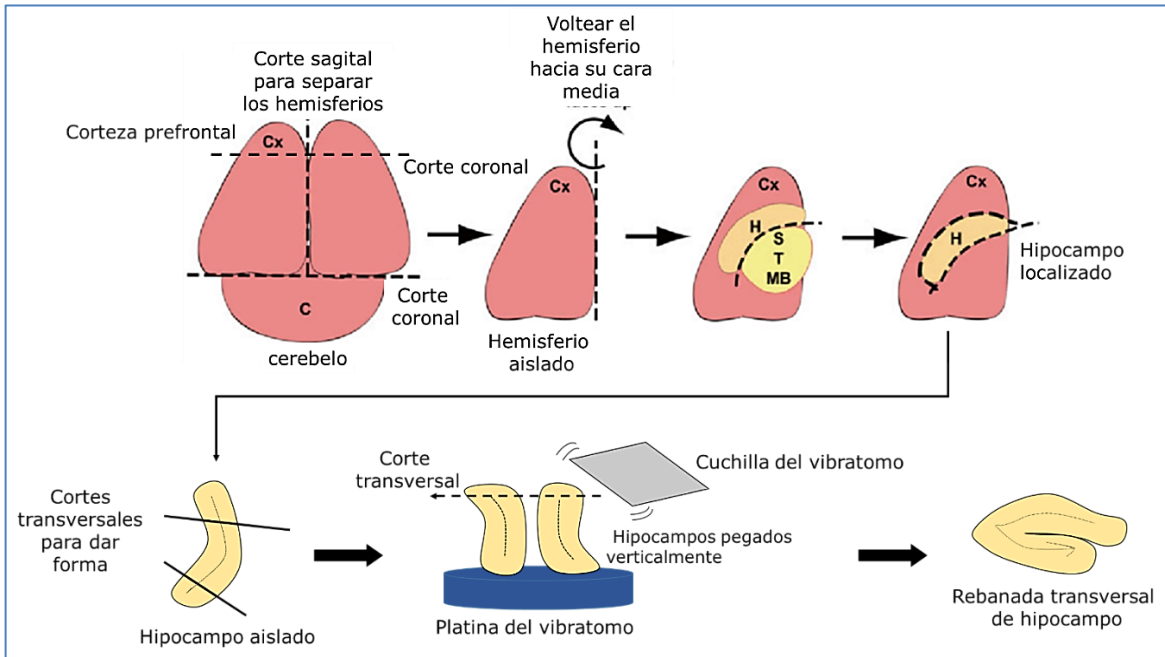


Figura 10| Representación gráfica de la disección del hipocampo y la obtención de las rebanadas de hipocampo.

3.4.1 INCUBACIÓN CON RYANODINA [20 μM]

Una vez obtenidas las rebanadas, las que fueron destinadas a incubación con ryanodina se colocaron dentro de la cámara de inmersión con una concentración de ryanodina de 20 μM en un volumen de 2 ml de buffer ACSF y se mantuvieron en incubación por un lapso de 1 hora, para posteriormente someterlas al registro electrofisiológico.

3.5 REGISTRO ELECTROFISIOLÓGICO DEL HIPOCAMPO

Los experimentos electrofisiológicos se realizaron como se describe en *Arias-Cavieres, et al.* 2017 (128). Se trabajó en equipo Set Up conformado por dos cámaras de registro de inmersión, cada una de ellas con la capacidad de estimular dos rebanadas dentro de la misma cámara. Por ende, fue posible estimular un total de 4 rebanadas simultáneamente. A su vez, cada cámara de registro de inmersión mantiene un flujo

constante (2 ml / min) de buffer ACSF con constante oxigenación (95% O₂ / 5% CO₂) y control de temperatura (30 ± 2 °C).

Los potenciales excitatorios postsinápticos de campo (fEPSP), se evocaron estimulando las fibras colaterales de Schaffer con pulsos cuadrados de corriente de 0.2 ms administrados a través de electrodos de estimulación bipolares concéntricos (Warner instruments), y se registraron extracelularmente con microelectrodos de vidrio rellenos de ACSF (2–3 MΩ) colocados a nivel *stratum radiatum* de la región CA1 del hipocampo.

Las respuestas basales se grabaron utilizando la intensidad de estimulación necesaria para evocar el 50 % de la respuesta máxima. Una vez establecido esto, se aplicaron tres procedimientos a cada rebanada, refiérase al esquema de la figura 11:

- **Primero:** se evaluó los componentes de la respuesta presináptica mediante el análisis de la facilitación de pulso pareado (PPF pre-LTD). Para esto, se aplicaron un par de pulsos (estímulos) cada 15 s con intervalos de tiempo entre estímulos (ISI: *inter-stimulus interval*) de 10, 20, 50, 100 y 200 ms. Se registraron tres respuestas en cada ISI y se promediaron juntos para obtener los potenciales de campo resultantes.

Los resultados de PPF se obtienen como la relación entre los valores de la pendiente inicial del fEPSP evocada por el segundo estímulo sobre la pendiente del fEPSP evocada por el primer estímulo, refiérase a la **Tabla 1**.

- **Segundo:** se evaluó la plasticidad sináptica a largo plazo, mediante el análisis de la LTD, ésta fue inducida mediante un protocolo de estimulación de baja frecuencia (LFS) consistente en 900 pulsos a 1 Hz. La respuesta se registró manteniendo una estimulación de pulsos pareados, con un ISI fijo de 50 ms, emitidos cada 15 s. Se registró la respuesta sináptica basal durante 20 minutos (línea base) y luego se aplicó el protocolo LFS. Los fEPSP fueron registrados durante 60 min adicionales posteriores a la aplicación del LFS.

Para el análisis de resultados las respuestas sinápticas se cuantificaron como la pendiente inicial de los fEPSP evocados y se representan como el cambio porcentual del promedio de la pendiente, definiendo como 100% la pendiente medida durante el registro de la línea base, ver **Tabla 1**.

Registro electrofisiológico:

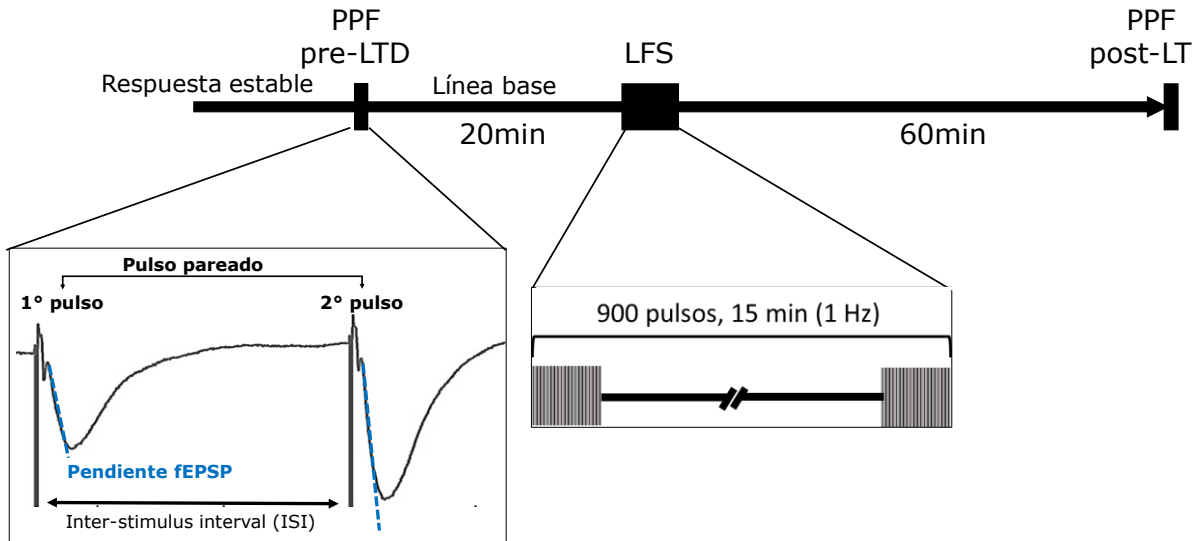


Figura 11 | Esquema del procedimiento electrofisiológico aplicado a cada rebanada en los grupos control y tratado con ryanodina [20 μ M]. El proceso se representa en una línea continua que indica que se trabajó sobre la misma rebanada. Los protocolos parten una vez que la respuesta se estabiliza. Primero, se registra PPF pre-LTD que se evalúa mediante la aplicación de un par de pulsos separados por diferentes ISI (10, 20, 50, 100 y 200 ms), posterior de registra la respuesta basal durante 20 min, finalmente se aplica un protocolo LFS para inducir la LTD y luego de 60 min de registro se evalúa nuevamente la PPF post-LTD.

- **Tercero:** luego de los 60 min de registro de LTD, la PPF fue reexaminado con el mismo procedimiento del PPF pre-LTD.

Todos los registros fueron filtrados a 10 kHz y se digitalizaron a 5 kHz utilizando software Igor Pro (WaveMetrics Inc., Lake Oswego, OR, EE.UU).

Para algunos casos el PPF se expresa como el "porcentaje de cambio de PPF", esto se define como la razón de la diferencia entre PPF post-LTD y PPF pre-LTD, para PPF promedio inicial, expresado como un porcentaje, es decir, 0% corresponde a ningún cambio en PPF post-LTD. La magnitud de los fEPSP del par de estímulos se definió de manera similar, como la razón entre la diferencia de la pendiente (1º o 2º estímulo)

post-LTD y la pendiente antes de LTD para la pendiente promedio correspondiente antes de la LTD, expresada como un porcentaje, es decir, 0% correspondió a la ausencia de la depresión de la respuesta y los valores negativos correspondieron a la depresión post-LTD, ver **Tabla 1**.

Tabla 1: Fórmulas de referencia para la representación gráfica de los resultados.

Parámetro	Fórmula
PPF	$\frac{\text{pendiente 2}}{\text{pendiente 1}}$
Pendiente de fEPSP (% línea base)	$\frac{(\text{pendiente post. LTD} - \text{pendiente pre. LTD})}{\text{pendiente pre. LTD promedio}} \times 100\%$
Cambio en PPF (% línea base)	$\frac{(\text{PPF post. LTD} - \text{PPF pre. LTD})}{\text{PPF pre. LTD promedio}} \times 100\%$

3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad (San 225 Diego, CA). Los valores se presentan como la media \pm SEM. Se evaluó distribución normal de los datos mediante prueba de Shapiro-Wilks. Para datos paramétricos, se aplicó *t-test* de dos colas no pareado para comparación entre los dos grupos mientras que, para las comparaciones dentro de un mismo grupo se aplicó prueba *t-test* pareado. Para comparaciones múltiples se aplicó el test de ANOVA correspondiente. Para datos no paramétricos se aplicó el test U de Mann-Whitney para comparación entre grupos, y test de Wilcoxon para comparación dentro de un mismo grupo. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

4| RESULTADOS

4.1 La inhibición del receptor de ryanodina bloquea la inducción de la LTD.

En primer lugar, para establecer si la incubación con ryanodina [20 μ M] influye en la señalización de la sinapsis, colaterales de Schaffer-CA1, evaluamos si hay diferencia en la magnitud de las pendientes de los fEPSPs durante el registro de la línea base entre los grupos experimentales. Después del análisis estadístico encontramos que los cortes de hipocampo incubados durante 60 minutos con ryanodina [20 μ M] no presentaron diferencias significativas en las pendientes de los fEPSPs en comparación con las respuestas del grupo control ($p > 0.05$; test U de Mann-Whitney) durante el registro de la línea base (pre-LTD). Ver la figura 12.

Posteriormente, evaluamos si la inhibición de la función del canal de RyR afecta la capacidad de la sinapsis para desarrollar plasticidad sináptica. Para probar esto, en ambos grupos experimentales a los 20 minutos de mantenerse registrando la línea base se aplicó un protocolo LFS (1 Hz / 15 min) para inducir una LTD. En los cortes del grupo control, conformado por trece rebanadas, encontramos una reducción significativa en las pendientes de los fEPSPs registrados posterior a la inducción de la LTD. Con referencia a las pendientes de la línea base (pre-LTD) como 100%, las respuestas post-LTD disminuyeron a un promedio de 76.88 ± 4.6 % ($##p < 0.05$, test de Wilcoxon, obsérvese la figura 12), y este cambio se mantuvo hasta 60 minutos después de la inducción de LTD, tiempo al que se detuvo el registro.

Por el contrario, el grupo ryanodina conformado por diez rebanadas diferentes, pero del mismo animal, que fueron incubadas con ryanodina durante 1 hora previo al inicio del registro electrofisiológico, mostraron que el bloqueo la función de los RyR impide la inducción de la LTD. Como se puede observar en la figura 12, las pendientes medidas 60 minutos después de inducir la LTD se mantienen en un promedio de 99.64 ± 9.6 % con referencia la línea base como 100% ($p > 0,05$; test de Wilcoxon). Mientras que, en la comparación entre grupos las rebanadas control presentaron mayor grado de LTD en comparación con las rebanadas tratadas con ryanodina ($***p < 0.05$ test U de Mann-Whitney).

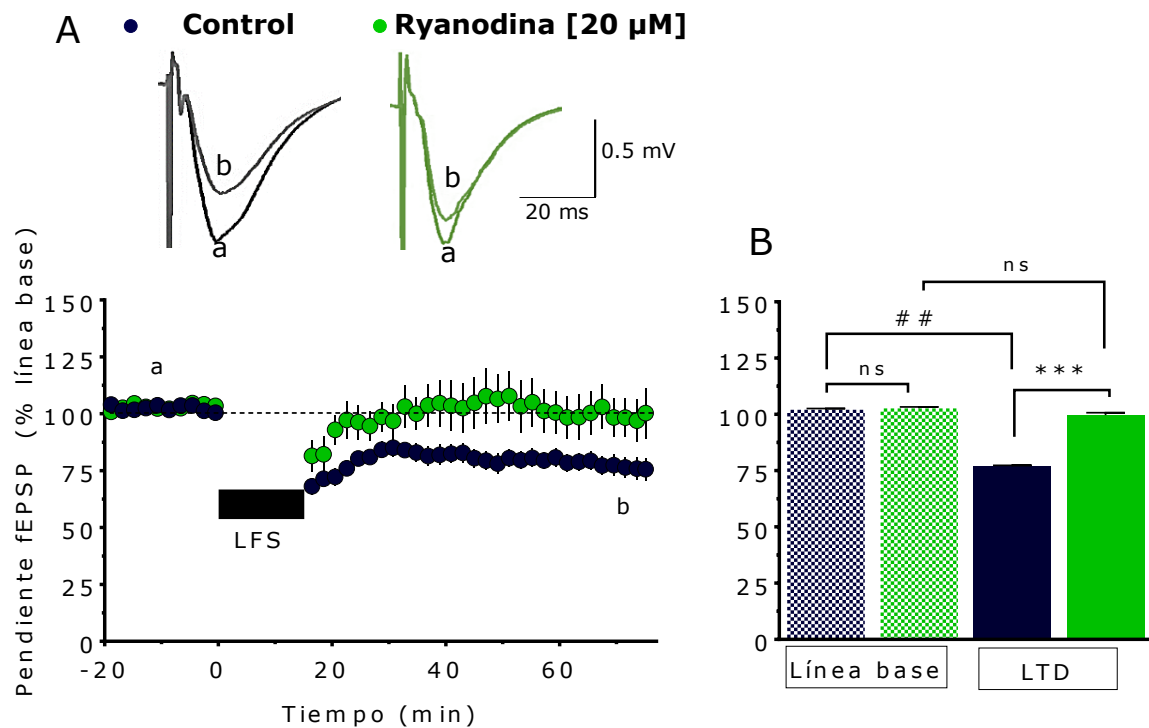


Figura 12] La inhibición del receptor de ryanodina bloquea la inducción de la LTD. (A) Panel superior, ejemplo de trazas representativas de los fEPSPs registrados 5 minutos antes (a) y 60 minutos después (b) de la aplicación del protocolo de LFS en rebanadas del hipocampo control (13) y rebanadas tratadas con ryanodina (10). A la derecha: barras de calibración (amplitud: mV; tiempo: ms). Panel inferior, presenta cómo varía la pendiente del fEPSP en el curso del tiempo, registradas antes y después de la inducción de LTD en cortes control (círculo azul) y cortes con ryanodina (círculo verde). El protocolo LFS se indujo en el momento indicado por la barra negra. La línea horizontal discontinua indica la línea de base antes del protocolo LFS como el 100% de la respuesta. (B) Presenta el cambio en las magnitudes de los promedios de las pendientes del fEPSP registradas 10 minutos antes (línea de base) y 60 minutos (LTD) después del protocolo LFS para rebanadas control (barras azules) y tratados con ryanodina (barras verdes). Los valores representan la media \pm SEM.

Estos datos sugieren que la inhibición no afecta la transmisión sináptica basal, pero sí impide la inducción de la LTD en las sinapsis CA3-CA1.

4.1 La inhibición de la función del RyR no afecta la respuesta de PPF en condiciones basales.

Para evaluar si la inhibición de la liberación de Ca^{2+} mediada por RyR afecta la respuesta presináptica en condiciones basales, determinamos la respuesta de la sinapsis a la estimulación de pulso pareado antes de inducir LTD en ambos grupos experimentales. Encontramos que en condiciones pre-LTD el grupo control y el grupo ryanodina presentan un comportamiento similar frente a la estimulación de pulso pareado, con un PPF promedio de 1.32 ± 0.08 para el grupo control, y de 1.42 ± 0.05 para el grupo ryanodina ($p > 0.05$, t-test no pareado). Las trazas representativas de los fEPSPs se pueden observar en la figura 13, panel superior, mientras que el análisis estadístico se muestra en la figura 14.

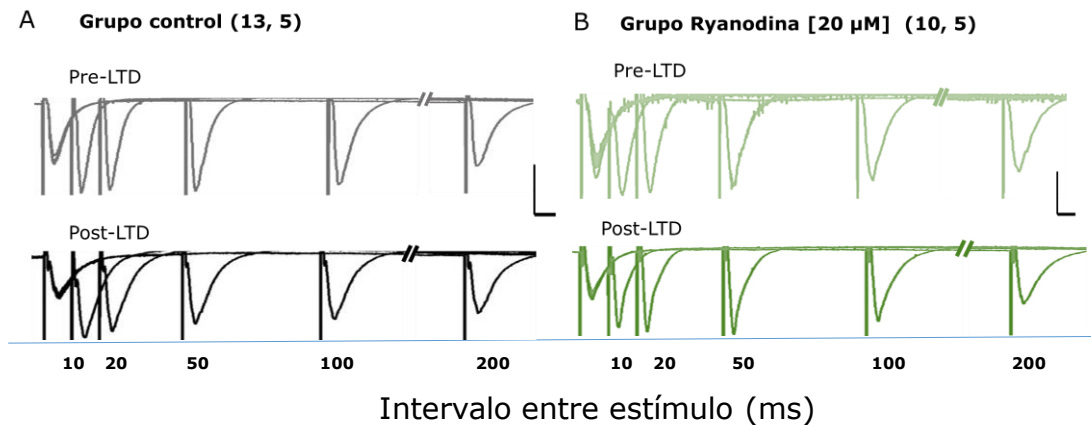


Figura 13 | Comparación de trazas representativas de PPF en el grupo control y el grupo tratado con ryanodina [$20 \mu\text{M}$]. $N=5$ animales, Grupo control: 13 rebanadas, grupo Ry: 10 rebanadas. Panel superior: muestra los fEPSPs evocados por el primer pulso sobrepuestos y semejantes para cada ISI, mientras que los fEPSPs evocados por el segundo estímulo son los que varían en mayor o menor proporción de acuerdo al ISI. Panel inferior: muestra las trazas representativas registradas después de la inducción de LTD (post-LTD). A la derecha se muestran las barras de escala: 0.5mV; 10ms. Para cada grupo la longitud de la traza correspondiente a los 200 ms fue recortada para mejor visualización.

De igual forma, se puede observar que los dos grupos (control y ryanodina) muestran un PPF más alto en el intervalo de 50 ms, de 1.48 ± 0.05 en el grupo control, y 1.57 ± 1.3 en el grupo con ryanodina, sin demostrar diferencias significativas entre ningún ISI. Véase la figura 14.

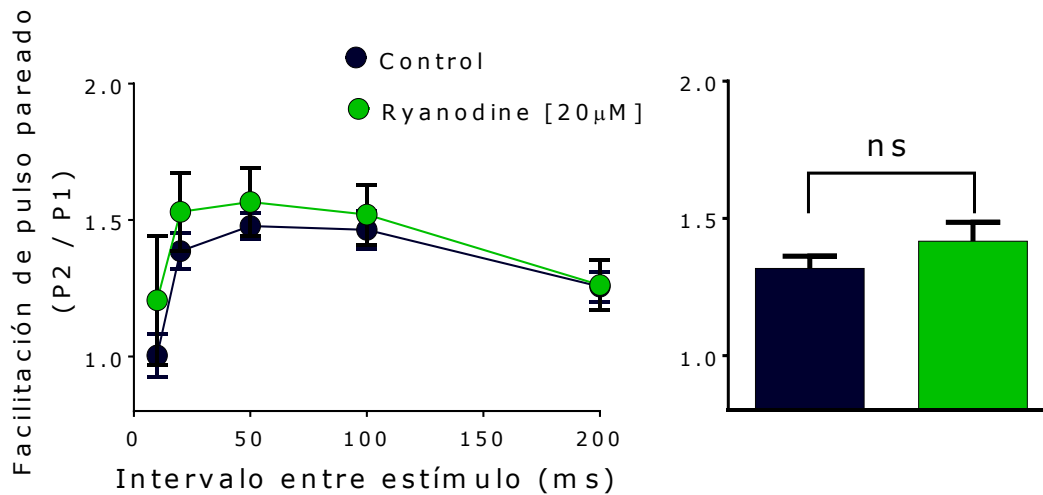


Figura 14| Comparación de PPF pre-LTD en el grupo control y el grupo tratado con ryanodina [20 μM]. Izquierda: la gráfica ilustra cómo varían los valores promedios de la PPF según cada ISI (de 10 a 200 ms). Derecha: se muestran los promedios generales de PPF para cada grupo. Barra azul: grupo control; barra verde: grupo ryanodina. N=5 animales, Grupo control: 13 rebanadas, grupo Ry: 10 rebanadas. Los valores representan la media ±SEM.

Los datos demuestran que la incubación con ryanodina [20 μM] no afecta la respuesta de PPF en las sinapsis CA3-CA1 en condiciones basales. Sugiriendo que la inhibición de la función de RyR no modifica la generación de señales presinápticas de Ca^{2+} involucradas en esta respuesta rápida.

4.2 La inhibición de la función del RyR impide los cambios a largo plazo en el PPF causados por la expresión de la LTD.

Una vez establecido que los grupos control y ryanodina no presentan diferencias significativas en sus respuestas de PPF en condiciones pre-LTD, y considerando que el grupo control es capaz de expresar una LTD robusta y sostenida en el tiempo. Procedimos a establecer cómo varía la respuesta presináptica posterior a la inducción de la LTD. Para esto, evaluamos la respuesta a la estimulación de pulso pareado 60 min después de haber aplicado el protocolo LFS para inducir la LTD en ambos grupos experimentales.

Como se aprecia en la figura 15 A, en el grupo control la expresión de la LTD influyó significativamente en las respuestas de PPF; de tal forma que, al ISI de 20 ms existe un incremento de 1.37 ± 0.06 en pre-LTD a un 1.73 ± 0.09 en post-LTD ($*p < 0.05$ t-test pareado), y a los 50 ms se observa un incremento de 1.48 ± 0.05 en pre-LTD a un 1.75 ± 0.07 en post-LTD ($*p < 0.05$ t-test pareado).

Una vez establecidos los cambios de PPF en el grupo control, procedimos a evaluar el mismo parámetro en el grupo ryanodina. Encontramos que en este grupo no existe una diferencia significativa entre las respuestas a la estimulación de pulso pareado registradas antes y 60 minutos después de la aplicación del protocolo LFS ($p > 0.05$, t-test pareado. Figura 15 B). De igual forma, en el análisis general la respuesta PPF post-LTD tiene un incremento porcentual de tan solo el 2.4 ± 7.5 % con referencia a los valores PPF pre-LTD.

Finalmente, al comparar el grupo ryanodina frente al grupo control, encontramos que también existe una diferencia significativa entre los PPF post-LTD ($*p < 0.05$, t-test no pareado). Las trazas representativas de muestran en la figura 13, panel inferior.

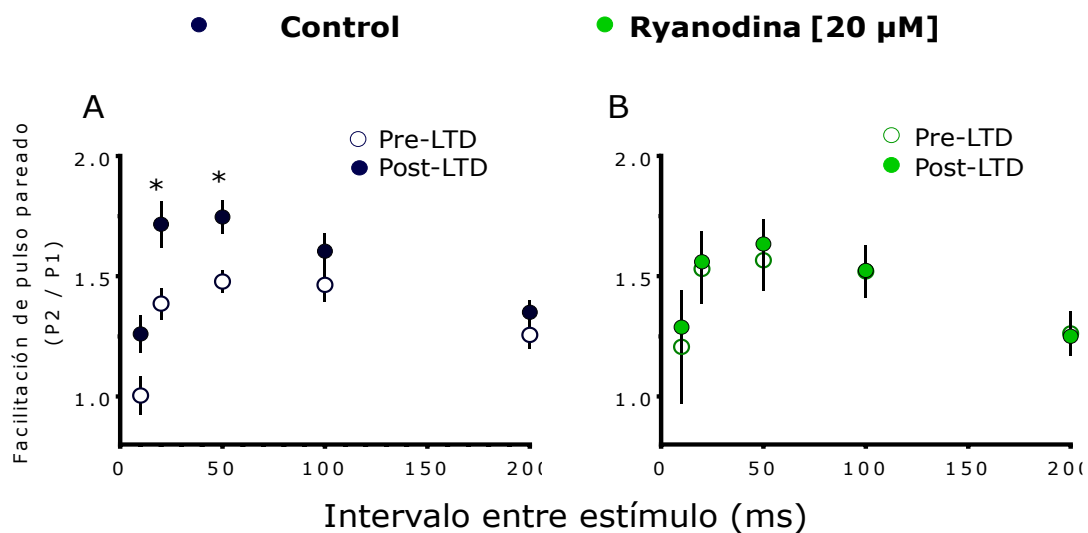


Figura 15 | El bloqueo de la liberación de Ca^{2+} a través del RyR impide los cambios de PPF inducidos por la LTD. (A y B) Ilustran como varían los valores de PPF correspondientes a los intervalos de 10, 20, 50, 100 y 200 ms. Los círculos abiertos (azul y verde) indican los valores PPF registrados pre-LTD, mientras que los círculos sólidos (azul y verde) indican la respuesta PPF post-LTD en los grupos control y ryanodina, respectivamente. N=5 animales, Grupo control: 13 rebanadas, grupo Ry: 10 rebanadas. Los valores se presentan como la media \pm SEM.

Los resultados obtenidos muestran que la respuesta a la estimulación de pulso pareado se incrementa significativamente posterior a la inducción y expresión de la LTD, y que este cambio no se observa en los cortes cuya función del RyR se encuentra inhibida. Esto nos sugiere que la expresión de la LTD requiere de cambios presinápticos, y que la liberación de Ca^{2+} mediada por los RyR contribuye a la generación de estos cambios presinápticos.

4.3 Los cambios en la respuesta a la estimulación de pulso pareado se generan en la misma línea de tiempo que la expresión de la LTD.

Para comprobar que los cambios observados en PPF corresponden a modulaciones presinápticas causadas por la expresión de la LTD, evaluamos cómo varía la respuesta al estímulo pareado a un ISI fijo (50 ms) durante la LTD. Además, evaluamos a que tiempo de haber aplicado el protocolo se empieza a dar el cambio.

De acuerdo a como se muestra en la figura 16, observamos que las respuestas de PPF en el grupo control se incrementan con la misma temporalidad con la que se establece la LTD posterior a la aplicación del protocolo de LFS, hasta que adquiere un comportamiento constante. Mientras que, la respuesta PPF en el grupo ryanodina se mantiene sin mayores cambios incluso después de haber aplicado el protocolo LFS, obsérvese la figura 16 B.

Posteriormente, analizamos las variaciones de PPF posteriores a la inducción de la LTD, separándolas en intervalos de tiempo. Encontramos que, en el grupo control el incremento en la respuesta al pulso pareado es estadísticamente significativo a partir de los 15 minutos posteriores tras aplicado el protocolo LFS, en comparación con los valores pre-LTD (** $p < 0.05$, t-test pareado), y que esta significancia se mantuvo hasta el período de 50-60 min en que se detuvo el experimento. Por otra parte, las respuestas de PPF en el grupo ryanodina no mostraron diferencias a ningún intervalo de tiempo post-LTD en comparación con las respuestas pre-LTD.

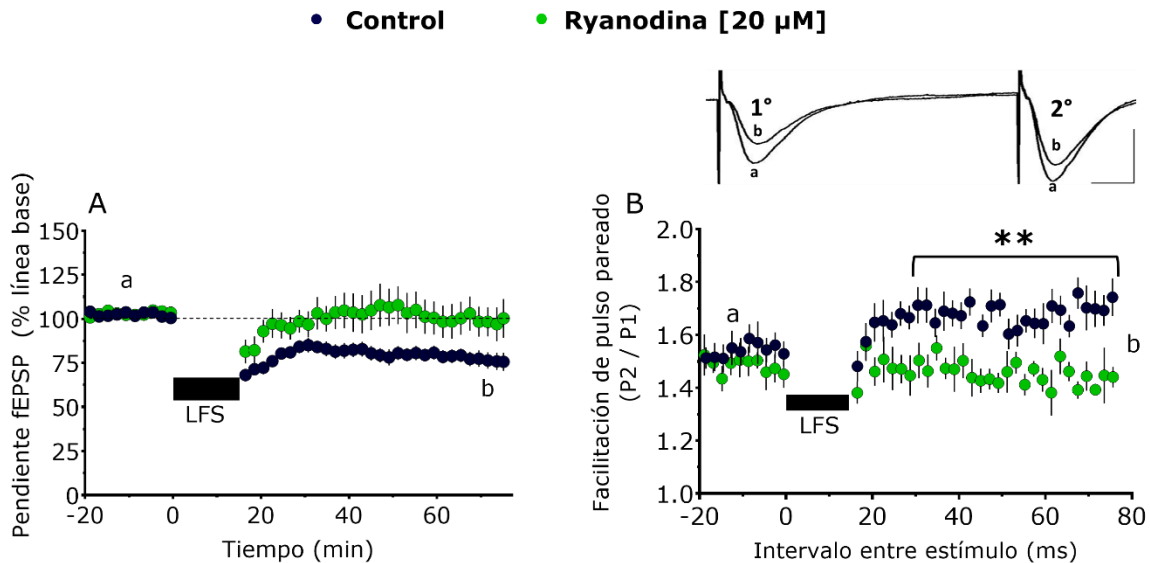


Figura 16| Curso temporal de los cambios en PPF asociados al curso de tiempo de la LTD. A) Curso temporal de la pendiente del fEPSP durante la LTD. B) Panel superior, trazas representativas superpuestas de los valores de PPF en rebanadas control en el ISI fijo de 50 ms, registradas antes (a) y 60 minutos después de la inducción de LTD (b). El número 1° y 2° representan el primer y

segundo fEPSP, respectivamente. Barra de escala: 0.5mV; 20ms. Panel inferior, ejemplifica los cambios en la respuesta de PPF en el ISI fijo de 50 ms, registrados antes y después de la aplicación del protocolo LFS. N=5 animales, Grupo control: 13 rebanadas, grupo Ry: 10 rebanadas. Grupo de control (círculos azules) y grupo de ryanodina (círculos verdes). Los valores se presentan como la media \pm SEM.

Estos datos sugieren que la expresión y mantención de la LTD requiere de mecanismos presinápticos que se consolidan a partir de los 15 minutos posteriores a la inducción de la LTD, y que la liberación de Ca^{2+} mediada por los RyR contribuye al desarrollo de estos mecanismos.

5| **DISCUSIÓN.**

Los principales hallazgos del presente estudio realizado en las rebanadas de hipocampo de ratas jóvenes son: (1) el bloqueo de la liberación de Ca^{2+} desde las reservorios de Ca^{2+} sensibles a ryanodina inhibe la inducción de LTD en las sinapsis colaterales de Schaffer-CA1, confirmando el hallazgo previamente publicado por *Arias et al.*, 2017; (2) en las mismas sinapsis, la respuesta a la estimulación de pulso pareado se incrementa significativamente posterior a la inducción y expresión de la LTD, mientras que la inhibición de la función del RyR impide este cambio y, (3) los cambios que se generan en el PPF tras la inducción de LTD siguen la misma línea de tiempo que la expresión de LTD.

La incubación con ryanodina no afecta la transmisión sináptica basal.

Estudios como el de *Arias-Cavieres et al.*, (2017) demuestran que tanto las concentraciones activadoras como las concentraciones inhibitorias de ryanodina no influyen en las respuestas input/output, un parámetro electrofisiológico aplicado comúnmente para valorar el estado basal de la transmisión sináptica en las sinapsis CA3-CA1 (76). De igual forma, otros estudios han demostrado que los factores como amplitud de FV, las amplitudes de fEPSP o las pendientes de fEPSP no se ven afectadas por la inhibición del RyR en condiciones normales (35, 129, 130). Aquí, nosotros corroboramos estos datos al valorar la PPF durante los registros en condiciones normales, observando que las magnitudes de las pendientes de los fEPSP no varían significativamente entre los grupos de trabajo, sugiriendo que la transmisión sináptica basal se mantuvo inalterada en nuestro grupo experimental.

La LTD depende los canales intracelulares de Calcio sensibles a ryanodina

Estudios previos han postulado a la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} mediada por el canal del RyR, como una señal que amplifica y regula dinámicamente los niveles presinápticos de Ca^{2+} (110, 125, 131, 132). En el hipocampo, esta función ha sido relacionada con la señalización presináptica de la liberación del NT y la PS a largo plazo (121, 132). Por ejemplo, el estudio realizado por *Reyes y Stanton* (1996), sugirió un papel para la liberación de Ca^{2+} mediada por RyR en la inducción de LTD, encontrando

que su participación se daba exclusivamente a nivel presináptico (133), estos datos fueron apoyados por otros estudios que confirmaron que la incubación con ryanodina inhibitoria bloquea completamente la inducción de la LTD evocada por un protocolo LFS a 1Hz, mientras que las modulaciones activadoras mejoraban de forma considerable la respuesta a LTD (113-115, 125, 131). De igual forma, se ha demostrado que los ratones mutantes deficientes de la isoforma RyR3 no expresan LTD en las sinapsis CA3-CA1 (134). Por lo tanto, la inhibición o eliminación de RyR a través de técnicas farmacológicas o genéticas, que impide la inducción de LTD, han demostrado que la liberación de Ca^{2+} a través de los canales del RyR es crítica para la inducción de LTD.

En este estudio, confirmamos que la incubación prolongada (>1 h) de rebanadas de hipocampo con ryanodina en concentraciones inhibitorias (20 μ M) bloqueó completamente la inducción de LTD evocada por estimulación de LFS. Sugiriendo una participación importante de la liberación de Ca^{2+} mediada por el canal del RyR, en los mecanismos de expresión de la LTD.

Rol presináptico para los RyR en la plasticidad sináptica.

Como se mencionó con anterioridad, PPF es una forma de STP que resulta de una interacción entre el Ca^{2+} presináptico residual, el número de vesículas disponibles para la liberación, y la sensibilidad de los mecanismos de liberación de vesículas al Ca^{2+} (43, 47); por ende es considerado como un indicador de la actividad presináptica utilizado para evaluar los cambios que ocurren a nivel presinápticos durante formas de plasticidad a largo plazo como LTP (135, 136) y la LTD (33, 45). Se sabe también que PPF es un indicador de la **Pr**, debido a que se relaciona inversamente con este parámetro (43), es decir, si **Pr** inicial es alta, significaría que la mayoría de los terminales presinápticos liberarán el neurotransmisor en respuesta al primer estímulo, por ende, el efecto de cualquier nivel de Ca^{2+} residual para mejorar **Pr** en respuesta a un segundo estímulo será mínimo, y la relación PPF será pequeña. Por el contrario, cuando **Pr** es muy bajo, se liberan pocos terminales en respuesta al primer estímulo, por lo que el efecto de un aumento Ca^{2+} residual hará que se liberen muchos más terminales en respuesta a un segundo estímulo, y la relación PPF será alta.

Con esto en mente valoramos nuestros primeros resultados, donde observamos que en el grupo control existe un cambio significativo entre los valores de PPF antes y después de inducir la LTD, ver la figura 15. Inicialmente, contamos con valores de PPF inferiores a 1.5, pero post-LTD se incrementan de manera significativa a los intervalos de 20 y 50 ms, sugiriendo que si inicialmente había mayor disponibilidad de vesículas para liberar el NT, posterior a la LTD pudo existir una reorganización de ellas que llevó a una menor probabilidad para liberar el NT. Este resultado es consistente con la hipótesis que la expresión de LTD involucra cambios en el movimiento de vesículas sinápticas y liberación del NT (76, 124). Esto en parte, podría deberse a un reordenamiento de los grupos de vesículas, pues se ha visto que posterior a inducir una LTD los niveles de fosforilación de la sinapsina I, una proteína involucrada en la organización y reordenamiento de las reservas de vesículas, muestra un incremento significativo en comparación con niveles basales (97, 115).

Por otro lado, también podría ser un reflejo de una alteración en la actividad de los reguladores de Ca^{2+} intracelulares, pues, el hecho de que exista mayor cantidad de Ca^{2+} residual disponible para liberar el NT y aumentar la respuesta al segundo estímulo, es un indicio de que las proteínas que estaban sensando el Ca^{2+} en un inicio, han disminuido su actividad. Sin embargo, estas son teorías que requieren mayor experimentación para poder corroborar.

Por otra parte, trabajos previos han propuesto que las reservas internas de Ca^{2+} participan activamente en la modulación de la liberación del NT, mediante la amplificación del Ca^{2+} intracelular (102, 117), entre estos, la participación de las reservas presinápticas de Ca^{2+} sensibles a ryanodina ha sido ampliamente debatida (132, 137), obteniendo resultados muy heterogéneos. Por ejemplo, *Empage et al.*, (2001) afirmó que CICR a través de los canales sensibles a ryanodina tenía un efecto directo en los incrementos de Ca^{2+} presinápticos y en la liberación del NT, debido, a una posible ubicación preferencial de los RyR cerca de los canales dependientes de voltaje en la AZ (113); esta hipótesis fue fuertemente debatida por *Carter et al.*, (2002) cuyo estudio afirmó que para las sinapsis excitatorias del hipocampo, las reservas internas de Ca^{2+} y el CICR no contribuyen a la liberación del transmisor (45). Posteriormente, *Shimizu et al.*, (2008) estudiando las sinapsis de las fibras musgosas del hipocampo

observó que al tratarlas con cafeína y ryanodina, dos moduladores del RyR, en concentraciones bajas actuaban como potentes inductores de la liberación de Ca^{2+} desde las reservas sensibles a la ryanodina, provocando la elevación de los niveles presinápticos de Ca^{2+} y mejorando la liberación del transmisor (131). Un estudio similar pero en las sinapsis CA3-CA1 observaron el mismo efecto, pero con la sorpresa de que ryanodina en concentraciones inhibitorias (100 μM) no generaba ningún cambio (35).

Esta discrepancia entre resultados podría ser indicativo de varias situaciones, por un lado, la respuesta distinta entre cada región del hipocampo puede deberse a la distribución heterogénea del RyR, a los diferentes mecanismos compensatorios posteriores al influjo de Ca^{2+} , y en parte al hecho de que la función de CICR sea dependiente de la actividad (129, 131), pues se ha encontrado que el efecto de CICR en la facilitación a corto plazo se observa predominantemente a frecuencias de estimulación moderadas (10-20 Hz), pero no bajas (<5 Hz) (129, 138). Mientras que por otro lado, la ausencia de un efecto con concentraciones inhibitorias de ryanodina nos puede sugerir que en condiciones normales el Ca^{2+} provisto por los RyR es muy bajo y/o lento, haciendo que una disminución de su función a corto plazo inducida por ryanodina sea casi indetectable; al contrario, las modulaciones activadoras de CICR generarían una liberación activa de Ca^{2+} , que localmente se refleje como una mayor participación de CICR en la liberación del NT (102).

De esta forma, los cambios que observamos en PPF en nuestro estudio, sugieren que la expresión de la LTD requiere de cambios en las concentraciones de Ca^{2+} citosólico presináptico, inducidos durante la estimulación de baja frecuencia, pues está ampliamente demostrado que cualquier manipulación que pueda alterar el Ca^{2+} presináptico tiende también a alterar la magnitud de PPF (19, 43). Por ejemplo, el amortiguamiento de las concentraciones de Ca^{2+} presinápticos, mediante componentes quelantes de Ca^{2+} como el EGTA y BAPTA (139, 140), tienden a reducir la facilitación de PPF. Así como la deleción de los genes de proteínas de unión a Ca^{2+} como la parvalbumin, incrementa la facilitación en las sinapsis cerebelares (141). Sin embargo, debemos recalcar que, para mantener estos cambios por largos periodos como se muestran en nuestro estudio, es probable que haya mecanismos adicionales involucrados. Con base en estos datos y nuestros resultados, podemos sugerir que el cambio en las concentraciones de Ca^{2+} presináptico, que se refleja como un aumento en

PPF y que se ve inhibido por la ausencia de función del RyR, requiere de la participación de CIRC mediado por RyR, un proceso que probablemente adquiere fuerza durante la inducción de la LTD debida a la alta demanda de Ca^{2+} necesaria para activar la cascada de fosforilación de proteínas que modulan la respuesta sináptica a un nivel más bajo (LTD).

Recordemos que en el hipocampo, la bidireccionalidad de la PS a largo plazo está mediada por la regulación hacia arriba y hacia abajo de la fosforilación de proteínas intracelulares (142, 143); las proteínas quinasas son cruciales para LTP (61, 94), mientras que las fosfatasas pueden desempeñar papeles esenciales en LTD (53). Sin embargo, varios estudios han demostrado que tanto la LTD como la LTP pueden verse afectadas por inhibidores de las proteínas quinasas (52, 53, 94). Por lo tanto, es posible que exista una ruta de señalización donde la activación de las quinasas conduce a la activación de fosfatasas o viceversa, y que el estado de fosforilación en un punto particular de la ruta de señalización es crucial para determinar la dirección de la PS. Por ende, es concebible que durante la STP la liberación de Ca^{2+} a través del RyR, no participe activamente en la fosforilación de proteínas para la liberación rápida del NT, pero que sí sea relevante durante la inducción y expresión de la LTD para modular la liberación del NT y mantener este cambio por largo plazo (94, 144).

Finalmente, en nuestro estudio confirmamos que para la expresión de la LTD se requiere la participación activa del RyR, además sugerimos que la liberación de Ca^{2+} a través del RyR es necesaria para mantener los cambios en la liberación del NT a largo plazo. Sin embargo, no podemos descartar la participación de mecanismos adicionales como la liberación de Ca^{2+} a través de los canales del IP3R, o incluso la participación combinada del componente postsináptico. Por tanto, hacemos énfasis en que la evidencia emergente sugiere que la plasticidad expresada pre y postsinápticamente comparten propiedades comunes que amplían el rango dinámico y el repertorio mediante el cual las neuronas codifican la información. Por ende, para profundizar nuestros resultados, sugerimos realizar otro tipo de estudios, como valorar las señales de liberación de Ca^{2+} mediada por CIRC a nivel presináptico mediante sondas intracelulares de Ca^{2+} y/o valorar el movimiento de vesículas mediante marcaje con sondas fluorescentes. Con estos estudios, se podrá ampliar mucho más la información sobre el comportamiento de RyR a nivel presináptico.

6| **CONCLUSIONES**

Los resultados obtenidos en la PPF con y sin inhibición del RyR, sugieren que la CICR mediada por RyR no modifica la actividad sináptica basal, antes de la inducción de LTD. Sin embargo, 15 minutos después de la inducción de LTD se observaron cambios en PPF, los que fueron inhibidos por ryanodina en condiciones inhibitorias.

Por consiguiente, sugerimos que la depresión sináptica a largo plazo inducida por estimulación de baja frecuencia induce cambios en el terminal presináptico que involucra liberación de Ca^{2+} mediada por RyR desde los depósitos intracelulares en las sinapsis CA3-CA1 de las rebanadas de hipocampo de ratas jóvenes.

7| BIBLIOGRAFÍA

1. Poo M, Pignatelli M, Ryan TJ, Tonegawa S, Bonhoeffer T, Martin KC, et al. What is memory? The present state of the engram. *BMC Biol.* 142016.
2. Holtmaat A, Caroni P. Functional and structural underpinnings of neuronal assembly formation in learning. *Nat Neurosci.* 2016;19(12):1553-62.
3. Evstratova A, Toth K. Information processing and synaptic plasticity at hippocampal mossy fiber terminals. *Front Cell Neurosci.* 2014;8:28.
4. Clark JK, Furgerson M, Crystal JD, Fechheimer M, Furukawa R, Wagner JJ. Alterations in synaptic plasticity coincide with deficits in spatial working memory in presymptomatic 3xTg-AD mice. *Neurobiol Learn Mem.* 2015;125:152-62.
5. Chaudhuri R, Fiete I. Computational principles of memory. *Nat Neurosci.* 2016;19(3):394-403.
6. Braunewell KH, Manahan-Vaughan D. Long-term depression: a cellular basis for learning? *Rev Neurosci.* 2001;12(2):121-40.
7. von Bohlen Und Halbach O. Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus. *Cell Tissue Res.* 2007;329(3):409-20.
8. Ming G, Song H. Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain: Significant Answers and Significant Questions. *Neuron.* 2011;70(4):687-702.
9. Bailey CH, Kandel ER, Harris KM. Structural Components of Synaptic Plasticity and Memory Consolidation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 72015.
10. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. Overview of Neuron Structure and Function. *Molecular Cell Biology: W. H. Freeman; 2000.*
11. Raine CS. Characteristics of the Neuron. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects: Lippincott-Raven; 2007.*
12. Scheefhals N, MacGillavry HD. Functional organization of postsynaptic glutamate receptors. *Mol Cell Neurosci.* 2018;91:82-94.
13. Woo J, Min JO, Kang DS, Kim YS, Jung GH, Park HJ, et al. Control of motor coordination by astrocytic tonic GABA release through modulation of excitation/inhibition balance in cerebellum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1152018. p. 5004-9.
14. Neves G, Cooke SF, Bliss TV. Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nat Rev Neurosci.* 2008;9(1):65-75.
15. Yuste R, Bonhoeffer T. Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci.* 2001;24:1071-89.
16. Bourne JN, Harris KM. Coordination of size and number of excitatory and inhibitory synapses results in a balanced structural plasticity along mature hippocampal CA1 dendrites during LTP. *Hippocampus.* 2011;21(4):354-73.
17. Younts TJ, Monday HR, Dudok B, Klein ME, Jordan BA, Katona I, et al. Presynaptic protein synthesis is required for long-term plasticity of GABA release. *Neuron.* 2016;92(2):479-92.

18. Yang Y, Calakos N. Presynaptic long-term plasticity. *Front Synaptic Neurosci.* 2013;5.
19. Zucker RS, Regehr WG. Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol.* 2002;64:355-405.
20. Malenka RC, Bear MF. LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron.* 2004;44(1):5-21.
21. Stanton PK. LTD, LTP, and the sliding threshold for long-term synaptic plasticity. *Hippocampus.* 1996;6(1):35-42.
22. He Y, Kulasiri D, Samarasinghe S. Modelling bidirectional modulations in synaptic plasticity: A biochemical pathway model to understand the emergence of long term potentiation (LTP) and long term depression (LTD). *J Theor Biol.* 2016;403:159-77.
23. Zhang Y, Cudmore RH, Lin DT, Linden DJ, Huganir RL. Visualization of NMDA receptor-dependent AMPA receptor synaptic plasticity in vivo. *Nat Neurosci.* 2015;18(3):402-7.
24. Wang SJ, Gean PW. Long-term depression of excitatory synaptic transmission in the rat amygdala. *J Neurosci.* 1999;19(24):10656-63.
25. Rebola N, Carta M, Mulle C. Operation and plasticity of hippocampal CA3 circuits: implications for memory encoding. *Nat Rev Neurosci.* 2017;18(4):208-20.
26. Koga K, Liu MG, Qiu S, Song Q, O'Den G, Chen T, et al. Impaired presynaptic long-term potentiation in the anterior cingulate cortex of Fmr1 knock-out mice. *J Neurosci.* 2015;35(5):2033-43.
27. Benarroch EE. Glutamatergic synaptic plasticity and dysfunction in Alzheimer disease: Emerging mechanisms. *Neurology.* 2018;91(3):125-32.
28. Monday HR, Younts TJ, Castillo PE. Long-Term Plasticity of Neurotransmitter Release: Emerging Mechanisms and Contributions to Brain Function and Disease. *Annu Rev Neurosci.* 2018;41:299-322.
29. Dharani K. Chapter 3 - Memory. In: Dharani K, editor. *The Biology of Thought.* San Diego: Academic Press; 2015. p. 53-74.
30. Ghandour K, Ohkawa N, Fung CCA, Asai H, Saitoh Y, Takekawa T, et al. Orchestrated ensemble activities constitute a hippocampal memory engram. *Nat Commun.* 2019;10.
31. Bruel-Jungerman E, Laroche S, Rampon C. New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment. *Eur J Neurosci.* 2005;21(2):513-21.
32. Branco T, Marra V, Staras K. Examining size-strength relationships at hippocampal synapses using an ultrastructural measurement of synaptic release probability. *J Struct Biol.* 2010;172(2):203-10.
33. Santschi LA, Stanton PK. A paired-pulse facilitation analysis of long-term synaptic depression at excitatory synapses in rat hippocampal CA1 and CA3 regions. *Brain Res.* 2003;962(1-2):78-91.

34. Nagase T, Ito KI, Kato K, Kaneko K, Kohda K, Matsumoto M, et al. Long-term potentiation and long-term depression in hippocampal CA1 neurons of mice lacking the IP(3) type 1 receptor. *Neuroscience*. 2003;117(4):821-30.
35. Le Magueresse C, Cherubini E. Presynaptic calcium stores contribute to nicotine-elicited potentiation of evoked synaptic transmission at CA3-CA1 connections in the neonatal rat hippocampus. *Hippocampus*. 2007;17(4):316-25.
36. Bourne JN, Chirillo MA, Harris KM. Presynaptic ultrastructural plasticity along CA3-->CA1 axons during long-term potentiation in mature hippocampus. *J Comp Neurol*. 2013;521(17):3898-912.
37. Larson J, Munkácsy E. Theta-Burst LTP. *Brain Res*. 2015;1621:38-50.
38. Abraham WC, Jones OD, Glanzman DL. Is plasticity of synapses the mechanism of long-term memory storage? *NPJ Sci Learn*. 42019.
39. Nicoll RA, Malenka RC. Contrasting properties of two forms of long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*. 1995;377(6545):115-8.
40. McCormick DA. Chapter 12 - Membrane Potential and Action Potential. In: Byrne JH, Heidelberger R, Waxham MN, editors. *From Molecules to Networks* (Third Edition). Boston: Academic Press; 2014. p. 351-76.
41. Sweatt JD. Chapter 7 - Long-Term Potentiation—A Candidate Cellular Mechanism for Information Storage in the Central Nervous System. In: Sweatt JD, editor. *Mechanisms of Memory* (Second Edition). London: Academic Press; 2010. p. 150-89.
42. Wu LG, Saggau P. Presynaptic calcium is increased during normal synaptic transmission and paired-pulse facilitation, but not in long-term potentiation in area CA1 of hippocampus. *J Neurosci*. 1994;14(2):645-54.
43. Pan B, Zucker RS. A general model of synaptic transmission and short-term plasticity. *Neuron*. 2009;62(4):539-54.
44. Viotti JS, Dresbach T. Differential Effect on Hippocampal Synaptic Facilitation by the Presynaptic Protein Mover. *Front Synaptic Neurosci*. 2019;11.
45. Carter AG, Vogt KE, Foster KA, Regehr WG. Assessing the role of calcium-induced calcium release in short-term presynaptic plasticity at excitatory central synapses. *J Neurosci*. 2002;22(1):21-8.
46. Katz B, Miledi R. The role of calcium in neuromuscular facilitation. *J Physiol*. 1968;195(2):481-92.
47. Kamiya H, Zucker RS. Residual Ca²⁺ and short-term synaptic plasticity. *Nature*. 1994;371(6498):603-6.
48. Jackman SL, Regehr WG. The Mechanisms and Functions of Synaptic Facilitation. *Neuron*. 2017;94(3):447-64.
49. Hagen A, Manahan-Vaughan D. Learning-facilitated synaptic plasticity at CA3 mossy fiber and commissural-associational synapses reveals different roles in information processing. *Cereb Cortex*. 2011;21(11):2442-9.
50. Citri A, Malenka RC. Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and

mechanisms. *Neuropsychopharmacology*. 2008;33(1):18-41.

51. Rossetti T, Banerjee S, Kim C, Leubner M, Lamar C, Gupta P, et al. Memory erasure experiments indicate a critical role of CaMKII in memory storage. *Neuron*. 2017;96(1):207-16 e2.

52. Pi HJ, Otmakhov N, Lemelin D, De Koninck P, Lisman J. Autonomous CaMKII can promote either long-term potentiation or long-term depression, depending on the state of T305/T306 phosphorylation. *J Neurosci*. 2010;30(26):8704-9.

53. Hell JW. How Ca²⁺-permeable AMPA receptors, the kinase PKA, and the phosphatase PP2B are intertwined in synaptic LTP and LTD. *Sci Signal*. 2016;9(425):e2.

54. Castillo PE. Presynaptic LTP and LTD of Excitatory and Inhibitory Synapses. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 42012.

55. Watson DJ, Ostroff L, Cao G, Parker PH, Smith H, Harris KM. LTP enhances synaptogenesis in the developing hippocampus. *Hippocampus*. 262016. p. 560-76.

56. Nicoll RA. A Brief History of Long-Term Potentiation. *Neuron*. 2017;93(2):281-90.

57. Sengar AS, Li H, Zhang W, Leung C, Ramani AK, Saw NM, et al. Control of Long-Term Synaptic Potentiation and Learning by Alternative Splicing of the NMDA Receptor Subunit GluN1. *Cell Rep*. 2019;29(13):4285-94.e5.

58. Buonarati OR, Hammes EA, Watson JF, Greger IH, Hell JW. Mechanisms of postsynaptic localization of AMPA-type glutamate receptors and their regulation during long-term potentiation. *Sci Signal*. 2019;12(562).

59. Mayer ML, Westbrook GL. Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurones. *J Physiol*. 1987;394:501-27.

60. Volianskis A, France G, Jensen MS, Bortolotto ZA, Jane DE, Collingridge GL. Long-term potentiation and the role of N-methyl-d-aspartate receptors. *Brain Res*. 16212015. p. 5-16.

61. Juarez-Munoz Y, Ramos-Languren LE, Escobar ML. CaMKII Requirement for in Vivo Insular Cortex LTP Maintenance and CTA Memory Persistence. *Front Pharmacol*. 2017;8:822.

62. Lohmann C, Kessels HW. The developmental stages of synaptic plasticity. *J Physiol*. 2014;592(Pt 1):13-31.

63. Oliet SH, Malenka RC, Nicoll RA. Two distinct forms of long-term depression coexist in CA1 hippocampal pyramidal cells. *Neuron*. 1997;18(6):969-82.

64. Dudek SM, Bear MF. Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(10):4363-7.

65. Muller T, Albrecht D, Gebhardt C. Both NR2A and NR2B subunits of the NMDA receptor are critical for long-term potentiation and long-term depression in the lateral amygdala of horizontal slices of adult mice. *Learn Mem*. 2009;16(6):395-405.

66. Hirano T. Long-term depression and other synaptic plasticity in the cerebellum. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 892013. p. 183-95.
67. Dong Z, Gong B, Li H, Bai Y, Wu X, Huang Y, et al. Mechanisms of hippocampal long-term depression are required for memory enhancement by novelty exploration. *J Neurosci.* 2012;32(35):11980-90.
68. Kemp N, McQueen J, Faulkes S, Bashir ZI. Different forms of LTD in the CA1 region of the hippocampus: role of age and stimulus protocol. *Eur J Neurosci.* 2000;12(1):360-6.
69. Nygren PJ, Scott JD. Regulation of the phosphatase PP2B by protein-protein interactions. *Biochem Soc Trans.* 2016;44(5):1313-9.
70. Beattie EC, Carroll RC, Yu X, Morishita W, Yasuda H, von Zastrow M, et al. Regulation of AMPA receptor endocytosis by a signaling mechanism shared with LTD. *Nat Neurosci.* 2000;3(12):1291-300.
71. Enoki R, Hu YL, Hamilton D, Fine A. Expression of long-term plasticity at individual synapses in hippocampus is graded, bidirectional, and mainly presynaptic: optical quantal analysis. *Neuron.* 2009;62(2):242-53.
72. Welzel O, Tischbirek CH, Kornhuber J, Groemer TW. Pool-independent labelling of synaptic vesicle exocytosis with single vesicle resolution in rat hippocampal neurons. *J Neurosci Methods.* 2012;205(2):258-64.
73. Wu LG, Borst JG. The reduced release probability of releasable vesicles during recovery from short-term synaptic depression. *Neuron.* 1999;23(4):821-32.
74. Sigrist SJ, Schmitz D. Structural and functional plasticity of the cytoplasmic active zone. *Curr Opin Neurobiol.* 2011;21(1):144-50.
75. Schneggenburger R, Neher E. Presynaptic calcium and control of vesicle fusion. *Curr Opin Neurobiol.* 2005;15(3):266-74.
76. Padamsey Z, Foster WJ, Emptage NJ. Intracellular Ca(2+) Release and Synaptic Plasticity: A Tale of Many Stores. *Neuroscientist.* 2019;25(3):208-26.
77. Verstegen AM, Tagliatti E, Lignani G, Marte A, Stoloro T, Atias M, et al. Phosphorylation of synapsin I by cyclin-dependent kinase-5 sets the ratio between the resting and recycling pools of synaptic vesicles at hippocampal synapses. *J Neurosci.* 2014;34(21):7266-80.
78. Monday HR, Castillo PE. Closing the gap: long-term presynaptic plasticity in brain function and disease. *Curr Opin Neurobiol.* 2017;45:106-12.
79. Xu J, Mashimo T, Sudhof TC. Synaptotagmin-1, -2, and -9: Ca(2+) sensors for fast release that specify distinct presynaptic properties in subsets of neurons. *Neuron.* 2007;54(4):567-81.
80. Han Y, Kaeser PS, Südhof TC, Schneggenburger R. RIM determines Ca²⁺ channel density and vesicle docking at the presynaptic active zone. *Neuron.* 2011;69(2):304-16.
81. Eggermann E, Bucurenciu I, Goswami SP, Jonas P. Nanodomain coupling between Ca²⁺ channels and sensors of exocytosis at fast mammalian synapses. *Nat Rev Neurosci.* 2011;13(1):7-21.

82. Welzel O, Henkel AW, Stroebel AM, Jung J, Tischbirek CH, Ebert K, et al. Systematic heterogeneity of fractional vesicle pool sizes and release rates of hippocampal synapses. *Biophys J*. 2011;100(3):593-601.
83. Petzoldt AG, Lutzkendorf J, Sigrist SJ. Mechanisms controlling assembly and plasticity of presynaptic active zone scaffolds. *Curr Opin Neurobiol*. 2016;39:69-76.
84. Fernandez-Alfonso T, Ryan TA. A heterogeneous "resting" pool of synaptic vesicles that is dynamically interchanged across boutons in mammalian CNS synapses. *Brain Cell Biol*. 2008;36(1-4):87-100.
85. Lazarevic V, Pothula S, Andres-Alonso M, Fejtova A. Molecular mechanisms driving homeostatic plasticity of neurotransmitter release. *Front Cell Neurosci*. 2013;7.
86. Stevens CF, Wesseling JF. Augmentation is a potentiation of the exocytotic process. *Neuron*. 1999;22(1):139-46.
87. Bourne JN, Chirillo MA, Harris KM. Presynaptic ultrastructural plasticity along CA3→CA1 axons during LTP in Mature Hippocampus. *J Comp Neurol*. 2013;521(17).
88. Mayford M, Wang J, Kandel ER, O'Dell TJ. CaMKII regulates the frequency-response function of hippocampal synapses for the production of both LTD and LTP. *Cell*. 1995;81(6):891-904.
89. Kumar A. Calcium Signaling During Brain Aging and Its Influence on the Hippocampal Synaptic Plasticity. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1131:985-1012.
90. Shupliakov O, Haucke V, Pechstein A. How synapsin I may cluster synaptic vesicles. *Semin Cell Dev Biol*. 2011;22(4):393-9.
91. Mochida S. Ca²⁺/Calmodulin and Presynaptic Short-Term Plasticity. *ISRN Neurol*. 2011;2011.
92. Sakaba T, Neher E. Calmodulin mediates rapid recruitment of fast-releasing synaptic vesicles at a calyx-type synapse. *Neuron*. 2001;32(6):1119-31.
93. Margrie TW, Rostas JA, Sah P. Presynaptic long-term depression at a central glutamatergic synapse: a role for CaMKII. *Nat Neurosci*. 1998;1(5):378-83.
94. Stanton PK, Gage AT. Distinct synaptic loci of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II necessary for long-term potentiation and depression. *J Neurophysiol*. 1996;76(3):2097-101.
95. Orenbuch A, Shalev L, Marra V, Sinai I, Lavy Y, Kahn J, et al. Synapsin Selectively Controls the Mobility of Resting Pool Vesicles at Hippocampal Terminals. *J Neurosci*. 322012. p. 3969-80.
96. Rosahl TW, Spillane D, Missler M, Herz J, Selig DK, Wolff JR, et al. Essential functions of synapsins I and II in synaptic vesicle regulation. *Nature*. 1995;375(6531):488-93.
97. Vaden JH, Banumurthy G, Gusarevich ES, Overstreet-Wadiche L, Wadiche JI. The readily-releasable pool dynamically regulates multivesicular release. *eLife*. 82019.
98. Guerrier C, Holcman D. The First 100 nm Inside the Pre-synaptic Terminal Where Calcium Diffusion Triggers Vesicular Release. *Front Synaptic Neurosci*. 2018;10:23.

99. Narita K, Akita T, Hachisuka J, Huang S, Ochi K, Kuba K. Functional coupling of Ca(2+) channels to ryanodine receptors at presynaptic terminals. Amplification of exocytosis and plasticity. *J Gen Physiol.* 2000;115(4):519-32.
100. Yamaguchi N. Molecular Insights into Calcium Dependent Regulation of Ryanodine Receptor Calcium Release Channels. In: Islam S, editor. *Advances in Experimental Medicine and Biology.* 1131. 2019/10/28 ed: Adv Exp Med Biol; 2020. p. 321-36.
101. Verkhratsky A. The endoplasmic reticulum and neuronal calcium signalling. *Cell Calcium.* 2002;32(5-6):393-404.
102. Scullin CS, Wilson MC, Partridge LD. Developmental changes in presynaptic Ca²⁺ clearance kinetics and synaptic plasticity in mouse Schaffer collateral terminals. *Eur J Neurosci.* 2010;31(5):817-26.
103. Meissner G. The structural basis of ryanodine receptor ion channel function. *J Gen Physiol.* 1492017. p. 1065-89.
104. Lanner JT, Georgiou DK, Joshi AD, Hamilton SL. Ryanodine receptors: structure, expression, molecular details, and function in calcium release. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2(11):a003996.
105. Adasme T, Paula-Lima A, Hidalgo C. Inhibitory ryanodine prevents ryanodine receptor-mediated Ca(2)(+) release without affecting endoplasmic reticulum Ca(2)(+) content in primary hippocampal neurons. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;458(1):57-62.
106. Galeotti N, Quattrone A, Vivoli E, Norcini M, Bartolini A, Ghelardini C. Different involvement of type 1, 2, and 3 ryanodine receptors in memory processes. *Learn Mem.* 2008;15(5):315-23.
107. Giannini G, Conti A, Mammarella S, Scrobogna M, Sorrentino V. The ryanodine receptor/calcium channel genes are widely and differentially expressed in murine brain and peripheral tissues. *J Cell Biol.* 1995;128(5):893-904.
108. Hertle DN, Yeckel MF. Distribution of Inositol-1,4,5-trisphosphate Receptor Isoforms and Ryanodine Receptor Isoforms During Maturation of The Rat Hippocampus. *Neuroscience.* 2007;150(3):625-38.
109. Baker KD, Edwards TM, Rickard NS. The role of intracellular calcium stores in synaptic plasticity and memory consolidation. *Neurosci Biobehav Rev.* 2013;37(7):1211-39.
110. Simkus CRL, Stricker C. The contribution of intracellular calcium stores to mEPSCs recorded in layer II neurones of rat barrel cortex. *J Physiol.* 2002;545(Pt 2):521-35.
111. Wong M, Shakiryanova D, Levitan ES. Presynaptic Ryanodine Receptor-CamKII Signaling is Required for Activity-dependent Capture of Transiting Vesicles. *J Mol Neurosci.* 2009;37(2):146-50.
112. Chakraborty S, Hill ES, Christian DT, Helfrich R, Riley S, Schneider C, et al. Reduced presynaptic vesicle stores mediate cellular and network plasticity defects in an early-stage mouse model of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener.* 2019;14(1):7.

113. Emptage NJ, Reid CA, Fine A. Calcium stores in hippocampal synaptic boutons mediate short-term plasticity, store-operated Ca²⁺ entry, and spontaneous transmitter release. *Neuron*. 2001;29(1):197-208.
114. O'Mara SM, Rowan MJ, Anwyl R. Dantrolene inhibits long-term depression and depotentiation of synaptic transmission in the rat dentate gyrus. *Neuroscience*. 1995;68(3):621-4.
115. Arias-Cavieres A, Barrientos GC, Sanchez G, Elgueta C, Munoz P, Hidalgo C. Ryanodine Receptor-Mediated Calcium Release Has a Key Role in Hippocampal LTD Induction. *Front Cell Neurosci*. 2018;12:403.
116. Van Petegem F. Ligand binding to Ryanodine Receptors revealed through cryo-electron microscopy. *Cell Calcium*. 2017;61:50-2.
117. Zhang C, Wu B, Beglopoulos V, Wines-Samuelson M, Zhang D, Dragatsis I, et al. Presenilins are Essential for Regulating Neurotransmitter Release. *Nature*. 2009;460(7255):632-6.
118. Laver DR, Baynes TM, Dulhunty AF. Magnesium inhibition of ryanodine-receptor calcium channels: evidence for two independent mechanisms. *J Membr Biol*. 1997;156(3):213-29.
119. Hayek SM, Zhu X, Bhat MB, Zhao J, Takeshima H, Valdivia HH, et al. Characterization of a calcium-regulation domain of the skeletal-muscle ryanodine receptor. *Biochem J*. 2000;351(Pt 1):57-65.
120. Xu L, Gomez AC, Pasek DA, Meissner G, Yamaguchi N. Two EF-hand motifs in ryanodine receptor calcium release channels contribute to isoform-specific regulation by calmodulin. *Cell Calcium*. 2017;66:62-70.
121. Grillo M, Grillo S, Gerdes B, Kraus J, Koulen P. Control of neuronal ryanodine receptor-mediated calcium signaling by calsenilin. *Mol Neurobiol*. 2019;56(1):525-34.
122. Berridge MJ. The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium*. 2002;32(5-6):235-49.
123. Dally S, Corvazier E, Bredoux R, Bobe R, Enouf J. Multiple and diverse coexpression, location, and regulation of additional SERCA2 and SERCA3 isoforms in nonfailing and failing human heart. *J Mol Cell Cardiol*. 2010;48(4):633-44.
124. Zakharenko SS, Zablow L, Siegelbaum SA. Altered presynaptic vesicle release and cycling during mGluR-dependent LTD. *Neuron*. 2002;35(6):1099-110.
125. Unni VK, Zakharenko SS, Zablow L, DeCostanzo AJ, Siegelbaum SA. Calcium release from presynaptic ryanodine-sensitive stores is required for long-term depression at hippocampal CA3-CA3 pyramidal neuron synapses. *J Neurosci*. 2004;24(43):9612-22.
126. Kilkeny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. *PLoS Biol*. 82010.
127. Valparaíso Ud. Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Universidad de Valparaíso (CICUAL-UV)

<https://investigacion.uv.cl/cibica/que-es-el-bienestar-animal/#>: VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN; [

128. Arias-Cavieres A, Adasme T, Sánchez G, Muñoz P, Hidalgo C. Aging Impairs Hippocampal- Dependent Recognition Memory and LTP and Prevents the Associated RyR Up-regulation. *Front Aging Neurosci.* 2017;9.

129. Nakano M, Yamada S, Udagawa R, Kato N. Frequency-dependent requirement for calcium store-operated mechanisms in induction of homosynaptic long-term depression at hippocampus CA1 synapses. *Eur J Neurosci.* 2004;19(10):2881-7.

130. Grigoryan G, Korkotian E, Segal M. Selective facilitation of LTP in the ventral hippocampus by calcium stores. *Hippocampus.* 2012;22(7):1635-44.

131. Shimizu H, Fukaya M, Yamasaki M, Watanabe M, Manabe T, Kamiya H. Use-dependent amplification of presynaptic Ca²⁺ signaling by axonal ryanodine receptors at the hippocampal mossy fiber synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1052008. p. 11998-2003.

132. Sato I, Kamiya H. Assessing the roles of presynaptic ryanodine receptors and adenosine receptors in caffeine-induced enhancement of hippocampal mossy fiber transmission. *Neurosci Res.* 2011;71(2):183-7.

133. Reyes M, Stanton PK. Induction of hippocampal long-term depression requires release of Ca²⁺ from separate presynaptic and postsynaptic intracellular stores. *J Neurosci.* 1996;16(19):5951-60.

134. Futatsugi A, Kato K, Ogura H, Li ST, Nagata E, Kuwajima G, et al. Facilitation of NMDAR-independent LTP and spatial learning in mutant mice lacking ryanodine receptor type 3. *Neuron.* 1999;24(3):701-13.

135. Schulz PE, Cook EP, Johnston D. Changes in paired-pulse facilitation suggest presynaptic involvement in long-term potentiation. *J Neurosci.* 1994;14(9):5325-37.

136. Christie BR, Abraham WC. Differential regulation of paired-pulse plasticity following LTP in the dentate gyrus. *Neuroreport.* 1994;5(4):385-8.

137. Llano I, Gonzalez J, Caputo C, Lai FA, Blayney LM, Tan YP, et al. Presynaptic calcium stores underlie large-amplitude miniature IPSCs and spontaneous calcium transients. *Nat Neurosci.* 2000;3(12):1256-65.

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

139. Hori T, Takahashi T. Mechanisms underlying short-term modulation of transmitter release by presynaptic depolarization. *J Physiol.* 2009;587(Pt 12):2987-3000.

140. Mori M, Tanifuji S, Mochida S. Kinetic organization of Ca²⁺ signals that regulate synaptic release efficacy in sympathetic neurons. *Mol Pharmacol.* 2014;86(3):297-305.

141. Muller M, Felmy F, Schwaller B, Schneggenburger R. Parvalbumin is a mobile presynaptic Ca²⁺ buffer in the calyx of Held that accelerates the decay of Ca²⁺ and short-term facilitation. *J Neurosci.* 2007;27(9):2261-71.

142. Teyler TJ, Cavus I, Coussens C, DiScenna P, Grover L, Lee YP, et al.

Multideterminant role of calcium in hippocampal synaptic plasticity. *Hippocampus*. 1994;4(6):623-34.

143. Clark K, Normann C. Induction mechanisms and modulation of bidirectional burst stimulation-induced synaptic plasticity in the hippocampus. *Eur J Neurosci*. 2008;28(2):279-87.

144. Kobayashi K, Manabe T, Takahashi T. Calcium-dependent mechanisms involved in presynaptic long-term depression at the hippocampal mossy fibre-CA3 synapse. *Eur J Neurosci*. 1999;11(5):1633-8.