

00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS

PLASTICIDAD SINÁPTICA EN
INTERNEURONAS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL
P R E S E N T A :
BIOLOGO: ERNESTO MENDOZA DUARTE

DIRECTOR DE TESIS: DR. JOSE BARGAS DIAZ

MÉXICO, D. F.



MAYO 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

[Faint, illegible handwritten text, possibly bleed-through from the reverse side of the page]

[Faint, illegible handwritten text, possibly bleed-through from the reverse side of the page]



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.
NOMBRE: Ernesto Mendoza Duarte
FECHA: 25 Mayo 2004
FIRMA: [Firma]

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 09 de febrero del 2004, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del alumno(a) **Mendoza Duarte Ernesto**, con número de cuenta 95570217, con la tesis titulada: "Plasticidad Sináptica en Interneuronas", bajo la dirección del(a) **Dr. José Bargas Díaz**.

Presidente:	Dra. Gertrudis Hortensia González Gómez
Vocal:	Dr. José Fernando Peña Ortega
Secretario:	Dr. José Bargas Díaz
Suplente:	Dra. María Elvira Galarraga Palacio
Suplente:	Dra. María del Carmen Vilchis Quintero

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 16 de abril de 2004.

Dr. Juan José Morrone Lupi
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Biofísica del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. José Bargas Díaz.

A lo largo de la Maestría conté con el apoyo económico de una Beca-Crédito otorgada por CONACYT (No. de registro 167190), así como con una beca complementaria asignada por la Dirección General de Estudios de Posgrado (D.G.E.P) de la UNAM.

El presente trabajo fue financiado por: DGAPA-UNAM (IN202100, 202300), CONACYT (31839-N), The millenium Research Initiative (W-8072 No. 35806-N).

Comité Tutorial:

Dr. José Bargas Díaz.

Dra. María Elvira Galarraga Palacio.

Dra. Gertrudis Hortensia González Gómez

DEDICATORIA

Dedico esta tesis con todo mi amor y cariño a mi esposa B. Adriana Castillo y a mi hijo Ángel. A mis padres: Gabina y Manuel por todo el apoyo y confianza que me han brindado.

A mis suegros Ángel y Lulú que siempre me han impulsado a seguir un paso más adelante.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi gratitud al Dr. José Bargas Díaz por su apoyo y confianza a lo largo del desarrollo del presente trabajo de maestría.

A los sinodales: Dra: Gertrudis Hortensia González Gómez, Dr. Fernando Peña Ortega, Dr. José Bargas Díaz, Dra. María Elvira Galarraga Palacio, Dra. María Del Carmen Vilchis Quintero; por el tiempo dedicado en la revisión de la tesis y por sus valiosos comentarios y sugerencias.

A Dagoberto Tapia por su valiosa colaboración en la realización de la parte histoquímica.

Al Ingeniero Luis Carrillo por la realización de los programas desarrollados en el ambiente LAbView, y su ayuda siempre atenta.

A Carmen y Humberto por su apoyo incondicional en los momentos oportunos.

A mis compañeros y amigos de laboratorio: Carmen, Humberto, Tamara, Napoleón, Ramiro, Luis, Fatuel, Dagoberto, Azucena, Eden.

ÍNDICE.

ABREVIATURAS.	i
RESUMEN.	ii
SUMMARY.	iii
INTRODUCCIÓN.	1
Hipocampo.	2
Organización sináptica del hipocampo.	2
Plasticidad sináptica del hipocampo.	4
Clasificación de las interneuronas.	6
Potenciación de largo plazo (LTP).	10
OBJETIVOS.	13
HIPÓTESIS.	14
MÉTODO.	15
Preparación.	15
Protocolo experimental.	15
Sistema de estimulación y registro.	15
Registro de corrientes iónicas en célula entera (Whole cell).	17
Análisis.	20
RESULTADOS.	21
Plasticidad de largo plazo provocada con estimulación de alta frecuencia.	21
Aislamiento de las corrientes inhibitoras.	23
Plasticidad de largo plazo en sinapsis inhibitoras.	26
Sinapsis GABAérgicas en las dendritas.	26
Sinapsis inhibitoras que no expresaron plasticidad de largo plazo.	28
Sinapsis GABAérgicas en la región perisomática.	30
DISCUSIÓN	33
CONCLUSIONES	41
BIBLIOGRAFÍA	43

ABREVIATURAS.

AAC	Célula axo-axónica
BC	Célula en canasta
CNQX	6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione
DBC	Célula de doble penacho
DTC	Célula con blanco dendrítico
EAF	Estimulación de alta frecuencia
HC	Célula horizontal
IPSC	Corriente postsináptica inhibitoria
LTD	Depresión de largo plazo
LTP	Potenciación de largo plazo
LTS	Célula de espiga de bajo umbral
mGluR	Receptor a glutamato metabotrópico
NMDA	N-metil-Daspartato
O-LM	Célula orines/lacunosum moleculare

Resumen

El sistema nervioso tiene la capacidad de alterar su circuitería mediante cambios en la fuerza de sus conexiones sinápticas. Esto, es conocido como plasticidad sináptica. La plasticidad de largo plazo se considera como un correlato neural de la memoria. Existen dos formas de plasticidad: la LTP (potenciación de largo plazo) y la LTD (depresión de largo plazo). La primera, es el aumento en la respuesta del potencial sináptico resultado de una estimulación de alta frecuencia (Bliss y Lomo 1973; Bliss y Collingridge 1993), mientras que la LTD es una disminución de ésta (Lynch, et al., 1977).

La LTP ha sido extensamente estudiada en las sinapsis glutamatérgicas del hipocampo, estructura involucrada en los procesos de aprendizaje y la memoria. Sin embargo, existen pocos estudios de plasticidad en sinapsis inhibitorias GABAérgicas. Se ha mostrado, que existen al menos dos grandes grupos de interneuronas inhibitorias, éstas hacen sinapsis en diferentes regiones de las neuronas piramidales. Un grupo de interneuronas hace sinapsis en la región perisomática (soma y troncos dendríticos cercanos) mientras que otro grupo hace sinapsis preferentemente en las dendritas distales y las espinas; junto a las entradas glutamatérgicas excitatorias. El objetivo de esta investigación fue conocer si las sinapsis inhibitorias presentan plasticidad de largo plazo después de un protocolo de estimulación tetánica (2 trenes de 100 Hz con un intervalo de 10s) que sabemos provoca LTP en las sinapsis glutamatérgicas. Encontramos que con este protocolo, las sinapsis dendríticas sufren preferentemente LTD, mientras que las sinapsis perisomáticas sufren LTP. Lo que muestra que existen diferentes tipos de plasticidad en los diferentes tipos de sinapsis inhibitorias de interneuronas. Esto tiene importantes consecuencias para los modelos celulares de aprendizaje y de memoria (hipótesis de Stent-Paulsen).

SUMMARY

The nervous system has the capacity to modulate its circuitries by changes in the force of the synaptic connections between its neuronal elements. This is known as synaptic plasticity. Long term synaptic plasticity is considered the cellular correlate of memory. There are two forms: LTP or long term potentiation and LTD or long term depression. The first is an increase and the second a decrease in the amplitude of synaptic events as a result of repetitive stimulation. Commonly, the first is evoked by high and the second by low frequency stimulation (Bliss and Lomo 1973; Lynch, et al., 1977; Bliss and Collingridge 1993).

The hippocampus is a structure involved in learning and memory of many behavioral processes. LTP has been widely studied in the glutamatergic excitatory synapses of this nucleus and there is a commonly used stimulation paradigm to produce this plasticity. However, there are few studies on the plasticity of inhibitory GABAergic synapses. All of them made with variable stimulation paradigms. One question arises: what would be the behavior of inhibitory synapses when challenged with the same stimulation paradigms used to produce LTP on excitatory synapses? There are, at least, two large classes of inhibitory interneurons based on the sites of the pyramidal neuron that they innervate: one class mainly targets the perisomatic region (soma, proximal dendritic processes, axon hillock), whereas the other class targets dendritic trunks and spines; neighboring glutamatergic contacts.

The goal of the present investigation was to know if the inhibitory synapses made by these two classes of interneurons exhibit some type of long term plasticity after the stimulation paradigm most frequently used to produce LTP in the excitatory synapses: two stimuli trains at 100 Hz separated by a 10 s time interval. We found that this protocol produced LTD on dendritic inhibitory synapses whereas it produced LTP on perisomatic inhibitory synapses. The consequences of this finding for the cellular models of learning and memory are discussed.

INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso es extraordinariamente plástico, es decir, puede ser modificado o moldeado según su actividad.

Se dice que el aprendizaje es el proceso por el cual adquirimos el conocimiento a cerca del mundo que nos rodea. Mientras que la memoria es el proceso por el cual el conocimiento adquirido mediante la experiencia es codificado, retenido y almacenado (consolidación), el cuál, puede ser recuperado. Muchas formas de aprendizaje y memoria involucran diversos mecanismos que incluyen la formación de nuevas conexiones (sinapsis) entre las neuronas y cambios plásticos como la modificación de sus circuitos y redes neuronales (Martin, et al., 2000). La capacidad de poder modificar las propiedades funcionales de éstas conexiones como consecuencia de la actividad se denomina **plasticidad** (Ramón y Cajal, 1937; Konorski, 1948). De manera particular, se le llama plasticidad sináptica a la modificación de la fuerza sináptica por el uso o actividad (Hebb, 1949). La potenciación de largo plazo (**LTP**) y la depresión de largo plazo (**LTD**) son formas de plasticidad sináptica (Bliss y Collingridge, 1993; Malenka y Nicoll, 1993). Esto implica un aumento (Bliss y Lomo, 1973) o disminución (Lynch et al., 1977) de larga duración en la efectividad sináptica entre neuronas respectivamente, debido a su duración y a su dependencia de la actividad (repetición, ensayo, práctica) y se les ha considerado como los posibles mecanismos para entender la formación del trazo de memoria almacenado en una red neural (Martin et al., 2000). Entender los mecanismos de aprendizaje y la memoria es una de las metas más ambiciosas que persiguen la investigación.

La formación hipocampal un área del cerebro relacionada con la corteza cerebral que se ubica en el interior del lóbulo temporal y parte del circuito límbico (Swanson et al., 1982) es esencial para la formación de nueva memoria (Squire, 1992). Si es destruido quirúrgicamente o por enfermedad, la memoria anterógrada o de corto plazo es dañada: ya no es posible recordar eventos recientes o en el

corto plazo aunque se preserva la memoria de largo plazo (recuerdos de eventos que sucedieron aun en años pasados –caso H.M-) (Kandel et al., 2000; Bermudez-Rattoni y Prado-Alcalá, 2001). Como la capacidad de adquirir nueva información es severamente dañada, se sugiere que el hipocampo está involucrado en una forma de memoria de término intermedio y que sus circuitos transfieren la información reciente al almacén de largo plazo (Shepherd, 1994). Es en el hipocampo donde se documentó por primera vez, la plasticidad sináptica de largo plazo (Bliss y Lomo, 1973), estos mecanismos, pueden servir para coordinar las distintas modalidades sensoriales que formarían un recuerdo, puesto que neuronas de la formación hipocampal reciben abundantes conexiones procedentes de todos los lugares de la corteza cerebral. Por ejemplo, un recuerdo involucra varias modalidades sensoriales como el simple hecho de recordar una flor, implica la visión de su imagen, su olor, su tacto, etc.

Cuando es importante recordar detalles la formación hipocampal emite señales que permiten que dichos detalles se repitan una y otra vez hasta que se almacenen de manera permanente en las áreas de la corteza cerebral para la formación de la memoria a largo plazo.

Hipocampo

Organización sináptica del hipocampo

La formación hipocampal está constituida por el hipocampo (una estructura de una sola capa en forma de “C” invertida) que consiste en tres subcampos CA1-CA3 (*cornu ammonis*) y el giro dentado (Lorente de Nó, 1934, Silva et al., 1990). Las sinapsis entre las neuronas piramidales de un área a otra del hipocampo son excitadoras y liberan glutamato (Swanson et al., 1982) (Fig. 1).

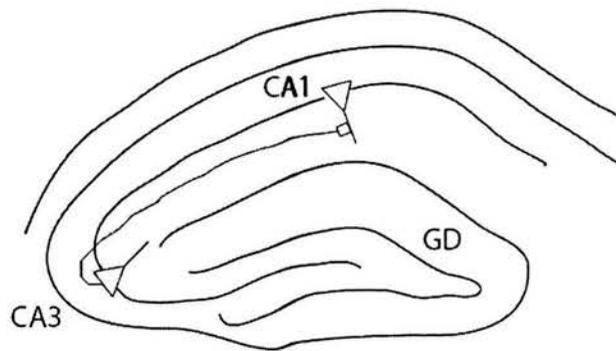


Figura 1. Esquema anatómico del hipocampo. Se muestran las regiones del giro dentado (GD) y los sub-campos CA3 y CA1. Los esquemas de las neuronas piramidales ilustran una de las sinapsis más estudiadas del cerebro, la que se da entre las neuronas de CA3 con las neuronas de CA1. El haz de fibras que produce esta conexión se denomina colaterales de Schaffer.

El giro dentado es la entrada a la formación hipocampal. Es el blanco de la mayoría de las aferentes de la corteza entorrinal mediante la vía perforante. Esta vía lleva información de múltiples modalidades sensoriales. Las células de proyección del giro dentado son las células granulares. Sus axones, llamados fibras musgosas, hacen sinapsis en las dendritas proximales de las células piramidales del subcampo CA3. A su vez, las células piramidales de proyección de CA3 mandan sus axones hacia los otros subcampos mediante las llamadas colaterales de Schaffer. Esta proyección contacta las dendritas (apicales y basales) de las neuronas piramidales de CA1 a nivel del *stratum radiatum* y el *stratum oriens* respectivamente. Las proyecciones de las neuronas piramidales de CA1 van por los estratos *alveus* y *oriens*, hacia sus principales blancos en la llamada corteza de transición: el *subiculum* y la corteza entorrinal (Kandel, 2000; Hammond, 1996). Estas áreas conectan con la corteza límbica, el septum lateral, el núcleo acumbens y el bulbo olfatorio (circuito límbico). Además de las neuronas piramidales, existen diferentes tipos de interneuronas locales (**GABAérgicas**) en el hipocampo. Su papel es inhibir a las neuronas piramidales, para lo cual están distribuidas de manera estratégica en las diferentes capas del hipocampo (Sik et al., 1995; Freund y Buzsáki 1996; Parra et al., 1998; Freund, 2003).

Plasticidad sináptica del hipocampo

El hipocampo ha sido, durante los últimos 30 años, la zona de estudio para la plasticidad sináptica dependiente de la actividad (Bliss y Collingridge, 1993; Nicoll y Malenka, 1995; Malenka et al., 1986; Malenka y Nicoll, 1999). Las correlaciones conductuales con tareas de aprendizaje y memoria, sobre todo de memoria espacial, son actualmente un punto central de las neurociencias (Silva et al., 1992; Silva et al., 1996). Ahora bien, casi todos los estudios de plasticidad sináptica han sido realizados en sinapsis excitadoras, en la conexión entre las neuronas piramidales de CA3 y CA1 (Bliss y Collingridge, 1993; Malenka y Nicoll, 1993).

Los dos mecanismos de plasticidad de largo plazo (LTP y LTD) varían mucho en sus mecanismos de acción. En la conexión CA3-CA1, ambas formas de plasticidad requieren la activación de receptores postsinápticos ionotrópicos del tipo NMDA, lo que lleva a una elevación del calcio intracelular (Malenka et al., 1988; Mulkey y Malenka, 1992). La concentración de Ca^{2+} intracelular determina la activación de proteínas cinasas y procesos de fosforilación que conducen a LTP (Malenka, et al., 1989; Soderling y Dekach, 2000), o bien, a la activación de fosfatasas, procesos de desfosforilación y la expresión de LTD (Mulkey, et al., 1993) (Fig. 2).

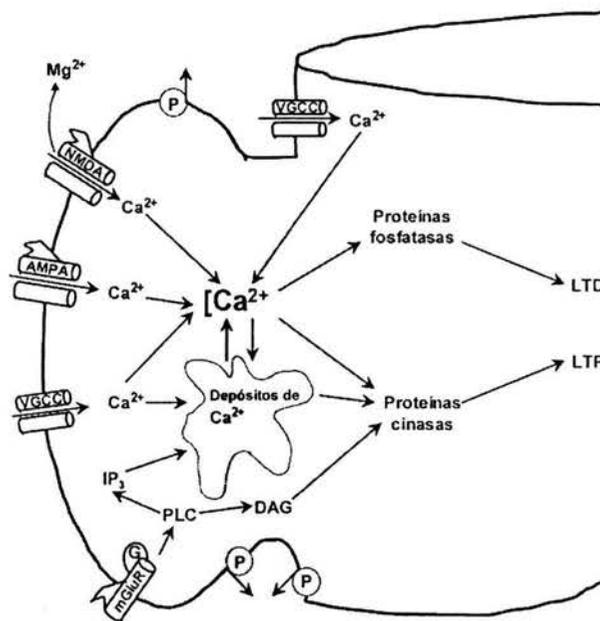


Figura 2. Modificación de la sinapsis. La activación de los canales (NMDA en la sinapsis CA3-CA1, y de Ca^{2+}) permiten la entrada de calcio, lo que activa cascadas de señalización intracelular que llevan a una modificación en la fuerza de la sinapsis (LTP o LTD).

La plasticidad sináptica, como fenómeno fisiológico, da una explicación mecánica de cómo el uso de un circuito, cambia la eficacia sináptica (Bliss y Collingridge 1993). Este cambio en los pesos sinápticos de la red, sería el correlato del aprendizaje y su permanencia, el almacén de memoria. Ahora bien, el correcto funcionamiento de una red neural depende de la interacción entre las neuronas principales y las interneuronas (Fricker y Miles, 2001; Freund, 2003; Martin et al., 2000). La inhibición dada por las interneuronas GABAérgicas locales, juega un papel determinante en la regulación de la actividad de las neuronas principales y sus interacciones. Las interneuronas pues, son importantes en el procesamiento de la información (Sik, et al., 1995), ya que participan en la generación de oscilaciones poblacionales (Freund, 2003; Galarreta y Hestrin, 1999; Gibson et al., 1999; Beierlein et al., 2000) y patrones de actividad que pueden provocar plasticidad sináptica y por lo tanto memoria (Klausberger et al., 2003; Freund y Buzsáki, 1996; Somogyi, et al., 1998).

Clasificación de las interneuronas

Los diferentes tipos de interneuronas (Freund y Buzsáki, 1996; Parra, et al., 1998) constituyen del 10 al 20 % de la población neuronal en toda la corteza cerebral (Somogyi et al., 1984; Thomson et al., 1996). De manera general, las interneuronas del hipocampo (Freund y Buzsáki, 1996) y la neocorteza (Kubota y Kawaguchi, 2000; Kawaguchi y Kondo, 2002) han sido clasificadas de acuerdo a los péptidos que contienen (Somogyi, 1984; Tóth y Freund 1992; Kawaguchi y Kondo, 2002), a sus entradas sinápticas (Buzsáki 1984; Freund 1990), a la localización y forma de su árbol dendrítico (Lacaille 1991; Gulyás 1993; Parra, et al., 1998; Kawaguchi, 1993; Kubota y Kawaguchi 1994; Kawaguchi, et al., 1995; Kubota, y Kawaguchi, 1997), a los receptores que poseen (McBain, 1994; Cauli et al., 2000), y a sus propiedades electrofisiológicas (Buhl et al., 1994b; Sik, et al., 1995; Parra, et al., 1998; Gibson et al., 1999; Galarreta y Hestrin, 1999). Estudios recientes en el hipocampo, han clasificado a las interneuronas de acuerdo a la región que inervan en la membrana somato-dendrítica de la neurona piramidal (Buhl et al., 1994a; McBain, 1995; Maccaferri et al., 2000) y su posible papel fisiológico: inhibir la entrada sináptica en la dendrita o la salida de los potenciales de acción a nivel somático y del cono axónico (Buhl, et al., 1994; Maccaferri et al., 2000). Estos tipos de interneuronas se acoplan entre sí eléctricamente mediante uniones comunicantes, formando redes de interneuronas de un mismo tipo (Beierlein et al., 2000). Esto resulta de suma importancia para la generación de la actividad sincrónica.

En el hipocampo, las interneuronas están distribuidas en todas las capas (Sik et al., 1995; Freund y Buzsáki, 1996) y sus axones también se dirigen a diferentes dominios somatodendríticos de la célula piramidal (Buhl et al., 1994; Sik et al., 1995; Freund y Buzsáki, 1996) (Figura 3).

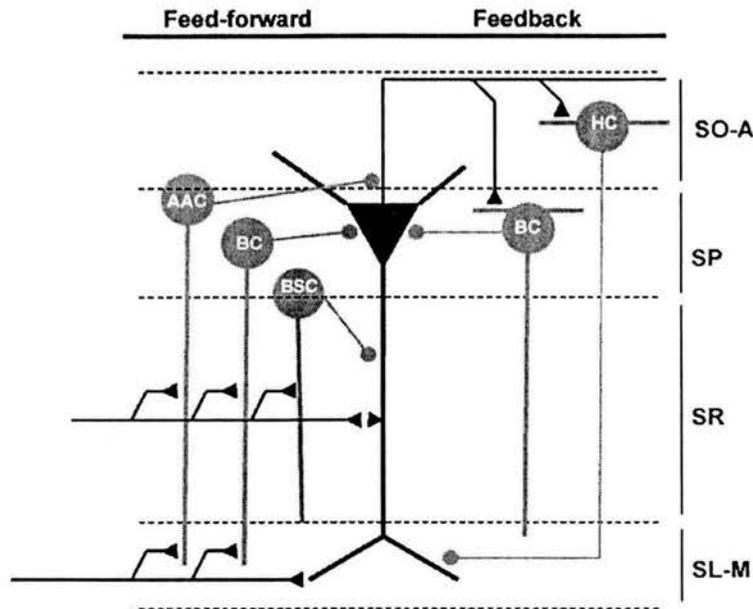


Figura 3. Esquema de algunas de las células GABAérgicas en el hipocampo y su relación con las neuronas piramidales. La célula piramidal (en negro) recibe sinapsis de diferentes tipos de interneuronas (en gris). Las células axo-axónicas (AAC = axoaxonic cells o Chandelier en la terminología Golgi) inervan el cono axónico. Las c. en canasta (BC = basket cells) inervan el soma y las dendritas cercanas al soma. Las c. en canasta son "feed-forward" (activadas por las entradas excitadoras) o "feed-back" (activadas por la misma salida). Las neuronas bi-estratificadas (BSC = bi-stratified cells) inervan los troncos y ramas dendríticas, su acción regularía el paso de la actividad sináptica al soma y al cono axónico y también impediría que los potenciales de acción generados en la región perisomática se propagaran retrógradamente hacia las dendritas (back-propagation). Las células horizontales (HC = horizontal cells, e.g., células de Martinotti en la nomenclatura Golgi) son el único ejemplo, en esta figura, de interneuronas cuyo blanco son las ramas finas y las espinas de las dendritas; justo al lado de la mayor parte de las sinapsis excitadoras. Aparte de las células horizontales, hay muchas otras interneuronas que inervan a las dendritas de manera puntual. Así el control de la excitabilidad se da a varios niveles, entrada o salida, localizada o más general. Además se sabe que hay interneuronas GABAérgicas que inhiben a estas interneuronas ("desinhiben" a la piramidal), ya sea provenientes de columnas o módulos vecinos (inhibición lateral), ya sea de áreas alejadas; de suerte que la desinhibición también puede ocurrir a varios niveles.

Las células axo-axónicas y las células en canasta, muchas de ellas identificadas por su inmunoreactividad a parvalbúmina –un quelante del calcio intracelular (Sik et al., 1995; Maccaferri et al., 2000), están localizadas en la capa de las células piramidales o en capas adyacentes. Sus entradas provienen de las distintas aferentes: musgosas, colaterales de Schaffer, comisurales, entorrinales así como de colaterales recurrentes de los axones de las mismas neuronas piramidales que inervan (Frotscher, 1989; Freund y Buzsáki, 1996). La mayoría de los contactos sinápticos de las células axo-axónicas inervan el cono axónico de la célula piramidal (Li et al., 1992; Buhl et al., 1994; Miles et al., 1996). Esto es, regulan el umbral en el sitio de generación de los potenciales de acción. Las células en canasta inervan el soma y las dendritas proximales (Sik, et al., 1995; Miles et al., 1996; Maccaferri et al., 2000), por lo que controlan el paso del producto de la integración dendrítica hacia el cono axónico. Ambos tipos (AAC, BC) controlan la salida de la neurona piramidal.

Otro tipo de interneuronas son las llamadas O-LM (HC u horizontales en la Fig. 3, células de Martinotti) cuyo soma está localizado en el *stratum oriens* pero su axón se dirige hacia el *stratum lacunosum-moleculare* donde inerva ramas finas de las dendritas y aun espinas, colocando botones GABAérgicos inhibidores junto a los botones glutamatérgicos excitadores. Son inmunoreactivas al péptido somatostatina, el cual puede ser liberado junto con el GABA y funcionar como neurotransmisor peptídico (Maccaferri et al., 2000). Otro tipo de interneuronas manda sus axones a los troncos dendríticos grandes, tanto de las dendritas basales como de la dendrita apical, por lo que forman un doble ramillete de terminales, de ahí su nombre de biestratificadas: en *s. radiatum* y *s. oriens* o de doble penacho. Muchas de ellas son inmunoreactivas a calbindina y también a la somatostina (Sik, et al., 1995; Maccaferri et al., 2000). Hay un conjunto mayor de neuronas que inervan a las dendritas, y sus somas pueden estar distribuidos en distintas capas, por ejemplo, las interneuronas trilaminares, cuyo axón se bifurca dando colaterales en *oriens*, *radiatum* y *piramidale* (Sik, et al., 1995). En general a las interneuronas que proyectan principalmente a las dendritas se les ha llamado

“neuronas con blanco dendrítico” (Somogyi, 1998), y aunque muchas son inmunoreactivas a somatostatina, también lo pueden ser a otros péptidos, tales como la colecistoquinina, peptido vasoactivo intestinal o sustancia P. Así, la variedad de neuronas inhibitoras es grande y aunque se han dividido en 4 grandes grupos: axo-axónicas (AAC), canastas (BC), de doble penacho (DBC) y “neuronas con blanco dendrítico” (DTC), los subtipos que pueden clasificarse con base en distintos criterios llegan a ser 19 (Somogyi et al, 1998). Para fines de la presente tesis, simplificaremos el esquema aun más y dividiremos a las interneuronas en dos grandes géneros: las que inervan la región perisomática (AAC y BC) y las que inervan a las dendritas (DTC y DBC).

Esto lo hacemos basándonos en investigaciones recientes que han sugerido que las interneuronas pueden formar dos redes inhibitoras funcionalmente distintas. 1. La red de interneuronas de disparo rápido (FS = fast spiking), que está formada principalmente por neuronas axoaxónicas y en canasta (Kawaguchi y Kubota, 1993; Thomson et al., 1996; Gibson et al., 1999; Beierlein et al., 2000; Galarreta y Hestrin, 1999). Sus somas se distribuyen horizontalmente junto a los somas piramidales y son inmunoreactivas a parvalbúmina (Kawaguchi y Kubota, 1993). 2. La red inhibitora de neuronas identificadas por sus espigas de bajo umbral (LTS = low threshold spikes), poseen canales de calcio de tipo T. Forman sinapsis en las dendritas (Gibson, et al., 1999; Beierlein et al., 2000), sus somas se distribuyen verticalmente y son positivas a calbindina y/o somatostatina (Kawaguchi y Kubota, 1993), hacen conexiones en varias capas. Se postula que las interneuronas de cada una de las redes están interconectadas entre sí, tanto por sinapsis inhibitoras, como por sinapsis eléctricas mediante uniones comunicantes. Cada red de interneuronas promovería la inhibición de varios módulos de manera sincronizada, o cuando menos coordinada.

Además, en el hipocampo se han identificado interneuronas de axón largo que inervan a otras interneuronas más locales. Se les llama “back-projection cells” pues conectan los sub-campos CA3 y CA1 de manera bidireccional, y sus somas

se encuentran en el borde de los estratos *alveus* y *oriens* (Sik, et al., 1995). Al inhibir simultáneamente a neuronas GABAérgicas de distintos módulos, tenderían a sincronizar la actividad de zonas distantes.

Potenciación de largo plazo (LTP)

La potenciación de largo plazo (LTP) es un aumento persistente de la respuesta sináptica inducido por una estimulación repetitiva que puede ser de alta frecuencia (Bliss y Lomo, 1973). Este mecanismo de plasticidad dependiente de actividad ha sido propuesto como la base neural del aprendizaje y la memoria (Hebb 1949; Kandel y Schwartz 1982). Puede observarse después de la tetanización (estimulación de alta frecuencia) de las fibras aferentes (Bliss y Collingridge, 1993; Bear y Malenka, 1994; Larkman y Jack, 1995). Interesantemente, también se produce después de ráfagas rítmicas en las aferentes, por ejemplo, aquellas con frecuencia en la banda θ (4-10 Hz) (Cohen et al., 1998; Steele y Mauk, 1999; Perez et al., 2001; Staff y Spruston, 2003; Bonansco y Buño, 2003).

Ahora bien, como se muestra en la figura 3, el flujo de la información es modulado por la participación de interneuronas (Ouardouz y Lacaille, 1995; Freund y Buzsaki, 1996), y éstas son activadas por las mismas aferentes que producen LTP en las sinapsis entre neuronas piramidales (colaterales de Schaffer y la vía perforante) (Kiss et al., 1996). Así, también se ha demostrado que la estimulación tetánica provoca cambios en el disparo de las interneuronas (Xie y Sastry, 1991; Morishita y Sastry, 1991) y los potenciales excitadores registrados en ellas (Ouardouz y Lacaille, 1995). Es lógico pensar, que los protocolos de plasticidad de largo plazo afectarán sinapsis inhibitoras y no sólo excitadoras. Si el aprendizaje se basara en potenciar sólo sinapsis excitadoras, llegaría un momento en que la excitabilidad fuera máxima y saturante, dando como consecuencia que el aprendizaje facilitara la patología epiléptica. Una hipótesis más adecuada, es postular que diversas sinapsis excitadoras e inhibitoras se potencian o se

deprimen siguiendo patrones espacio-temporales determinados dependientes de la actividad y el uso. Estos patrones pueden estar determinando la formación del trazo de memoria.

Así, la estimulación de alta frecuencia que provoca la potenciación en las sinapsis glutamatérgicas (colaterales de Schaffer-CA1), también debe de activar a las interneuronas del hipocampo. Se ha mostrado, LTP de sinapsis excitadoras sobre algunas interneuronas de CA1 (Maccaferri y McBain, 1996; Cowan et al. 1998; Perez, et al., 2001). Esto es, la potenciación de la excitación en interneuronas podría llevar a una potenciación de la inhibición en la red. Sin embargo, de los pocos trabajos que existen a ese respecto, se saca en claro que la potenciación de la sinapsis excitadora sobre la interneurona es variable, muchas veces no se presenta, de suerte que diversos autores postulan distintos mecanismos. Así, en algunos casos depende de la activación de receptores a NMDA (Steele y Mauk 1999; Maccaferri y McBain 1996), y en otros depende de la activación de receptores metabotrópicos del tipo mGluR1a (Cohen et al., 1998; Perez, et al., 2001), o aún de otras vías de señalización (Alle y Geiger, 2001). Era de esperarse que si hay tantos tipos de interneuronas, sus mecanismos de plasticidad fuesen variados. Pero ¿hay algún patrón? Es justo decir, que cada uno de estos escasos estudios utilizó distinto protocolo de estimulación, y gran parte de la variabilidad podría atribuirse a eso. Por ejemplo, un trabajo publicado por Stelzer en 1994, mostró que la estimulación que causa LTP en las sinapsis glutamatérgicas causa reducción en el componente inhibitorio que inerva las dendritas de las células piramidales (Stelzer, et al., 1994), los autores sugirieron que posiblemente existe un mecanismo de daño en la fuerza de la inhibición GABAérgica, que puede contribuir importantemente en la expresión del LTP en la célula piramidal, lo que aumenta la confusión.

Concluimos que se han realizado muy pocos estudios acerca de la plasticidad de las sinapsis GABAérgicas sobre las neuronas principales. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo es investigar si hay plasticidad de largo plazo

de las sinapsis GABAérgicas, y si la hay, averiguar si presenta algún patrón reproducible que explique su posible diversidad. El protocolo de tetanización (Malenka et al., 1986; Morishita y Sastry, 1991; Stelzer et al., 1994; Xie et al., 1995; Maccaferri y McBain, 1996; Kleschevnikov et al., 1997; Cohen et al., 1998; Cowan et al., 1998; Christie et al., 2000; Komatsu y Yoshimura 2000; Shew et al., 2000; Chevaleyre y Castillo, 2003; Staff y Spruston, 2003). (ver Material y Métodos) ha sido usado por la inmensa mayoría de los estudios de LTP en la sinapsis más utilizada en los estudios de plasticidad de largo plazo: CA3-CA1. La pregunta es muy simple: ¿qué le pasa a las sinapsis GABAérgicas cuando se están potenciando las glutamatérgicas? Lo que requiere utilizar el mismo protocolo en ambos tipos de sinapsis.

En resumen, una forma de simplificar el problema es preguntarse si un protocolo que produce LTP en las sinapsis glutamatérgicas (CA3-CA1), produce algún tipo de plasticidad de largo plazo en las sinapsis GABAérgicas sobre las neuronas piramidales de CA1. Esto es, lo ideal sería que el mismo protocolo produzca un patrón diverso de plasticidad dependiendo del tipo celular. La otra simplificación es dividir a las sinapsis GABAérgicas en dos grandes géneros: las que inervan a las dendritas y las que inervan la región perisomática, de esta manera, basado en el trabajo de Miles (Miles et al., 1996), encontramos la forma de estimular las unas o las otras.

OBJETIVO GENERAL

Obtener el registro de las corrientes sinápticas en neuronas piramidales mediante la utilización de la técnica de registro de célula entera (Whole cell), en la configuración de fijación de voltaje, en rebanadas de hipocampo.

OBJETIVOS PARTICULARES

- * Aislar las corrientes sinápticas GABAérgicas, dendríticas o somáticas.

- * Utilizando el protocolo de tetanización típico, producir LTP en las neuronas piramidales. Esta potenciación se registrará de manera estándar mediante electrodos de campo.

- * Utilizando el protocolo de tetanización típico, averiguar qué tipo de plasticidad de largo plazo se puede producir en las sinapsis GABAérgicas que inervan las dendritas de las neuronas piramidales.

- * Utilizando el protocolo de tetanización típico, averiguar qué tipo de plasticidad de largo se puede producir en las sinapsis GABAérgicas que inervan la región perisomática de las neuronas piramidales.

HIPÓTESIS

1. En conjunto con los cambios plásticos de largo plazo en las sinapsis glutamatérgicas entre neuronas piramidales (CA3-CA1), deben de producirse cambios plásticos de largo plazo en las sinapsis GABAérgicas sobre estas mismas neuronas con el mismo protocolo que provoca LTP en las sinapsis glutamatérgicas.

2. Los cambios plásticos han de ser diferenciales dependiendo del tipo de sinapsis GABAérgica, de forma que el correlato celular del trazo de memoria constituya un patrón espacio-temporal de plasticidad distribuido en la membrana somatodendrítica de las neuronas piramidales de CA1.

MÉTODO

Preparación

Se utilizaron rebanadas de cerebro de rata macho de la cepa Wistar de 13 días de nacidas. Se decapitó el animal para extraer el cerebro que se sumerge en solución salina isotónica fría (4° C) que contiene (en mM): 125 NaCl, 3KCl, 1 MgCl₂, 25 NaHCO₃, 11 d-glucosa, gaseada continuamente con una mezcla de 95% O₂ y 5% CO₂. La osmolaridad fué de 300 mOsm /l a un pH de 7.4. Se separaron los hemisferios cerebrales, se colocaron en un vibratomo y se cortan rebanadas cerebrales parasagitales de 300 µm de espesor. Las rebanadas, que incluyen al hipocampo, se mantienen en incubación en la solución salina gaseada a temperatura ambiente por un periodo de 1 hr para su recuperación. En estas condiciones es posible obtener registros confiables de más de 2 hr de duración sin un deterioro significativo de la preparación (Bargas et al., 1991; Flores-Hernández et al., 1997; Hernández-Echeagaray et al., 1998).

Protocolo experimental.

Sistema de estimulación y registro.

Los registros de campo se obtuvieron estimulando ortodrómicamente las fibras aferentes (colaterales de Schaffer) con un electrodo bipolar concéntrico de 25 µm de diámetro en la punta. La intensidad de estimulación fué de 7 a 12 V y una duración de 0.1-0.14 ms a una frecuencia de 0.1 Hz para la obtención de los registros control. Los estímulos se mandaron desde un estimulador (Grass, S48), pasándolos a través de una unidad aisladora de estímulos (Digitimer, DS2) en donde se regula la amplitud y duración de los mismos. Con el registro estable se grabaron 10 a 15 minutos de respuestas en situación control de donde se obtuvo un promedio de la amplitud. Posteriormente se aplicó el protocolo de tetanización o estimulación de alta frecuencia (**EAF**) que consistió de dos trenes de estímulos a 100 Hz con una duración de 1s c/u y con un intervalo entre ambos trenes de 10s

(e.g., Malenka et al., 1986; Morishita y Sastry., 1991; Xie et al., 1995). Los potenciales poblacionales fueron registrados en la capa piramidal de CA1 con electrodos de vidrio fabricados a partir de capilares de borosilicato de 1.0 mm de diámetro con una resistencia en la punta de 2 a 4 M Ω , llenos de NaCl al 0.9% como electrolito conductor (Barral et al, 1999). El potencial de campo se amplificó a través de un amplificador (P15) utilizando un filtraje de 300 LF y 3 HF; se desplegó en el osciloscopio (Tektronix TDS 3012), y se digitalizó y almacenó en cintas de video para su análisis. El "software" utilizado para desplegar los potenciales de campo en la computadora fue hecho en el laboratorio en el ambiente LabView (National Ins.). Se utilizó el programa Origin (Microcal) para el análisis de los registros.



Figura 4. Neurona piramidal de la región CA1 del hipocampo. Se selecciona a la neurona piramidal por su morfología. La imagen fue tomada con video microscopía con luz infrarroja y contraste de fases. Obsérvese la dendrita principal orientada hacia el *stratum radiatum*.

Registro de corrientes iónicas en célula entera (whole-cell).

Los registros de corrientes iónicas se obtuvieron utilizando la técnica de fijación de voltaje. Utilizando video microscopía con luz infrarroja y contraste de fases con interferencia diferencial de Nomarski (DIC), se pueden observar las neuronas en el tejido hasta 200 μm debajo de la superficie (Figura 4). Con electrodos bipolares concéntricos (punta de lápiz) de 12 μm en la punta, o mediante el uso de electrodos hechos en el laboratorio con capilares de vidrio y separados 5 μm en las puntas, se estimuló las interneuronas vecinas a la neurona piramidal que se registró. Se utilizó un bloqueador a receptores de glutamato de tipo AMPA/KA; CNQX (10 μM), para eliminar la influencia excitadora y quedarnos con la entrada inhibitoria. La influencia excitadora de tipo NMDA no se eliminó pues se sabe que su participación es esencial para la expresión de algunos procesos de plasticidad de largo plazo. La corriente inhibitoria (IPSC) que se registró, cuando la célula estimulada y la registrada estaban conectadas, presentó variación cuántica y fallas. Siguiendo el protocolo de Miles (Miles et al, 1996), la estimulación de baja intensidad alrededor de las dendritas que se encuentran a más de 100 μm del soma produjo corrientes sinápticas que por sus características se consideran generadas en las dendritas; mientras que la estimulación perisomática produjo corrientes sinápticas mucho más grandes, con características de corrientes generadas en el soma (Figura 5).

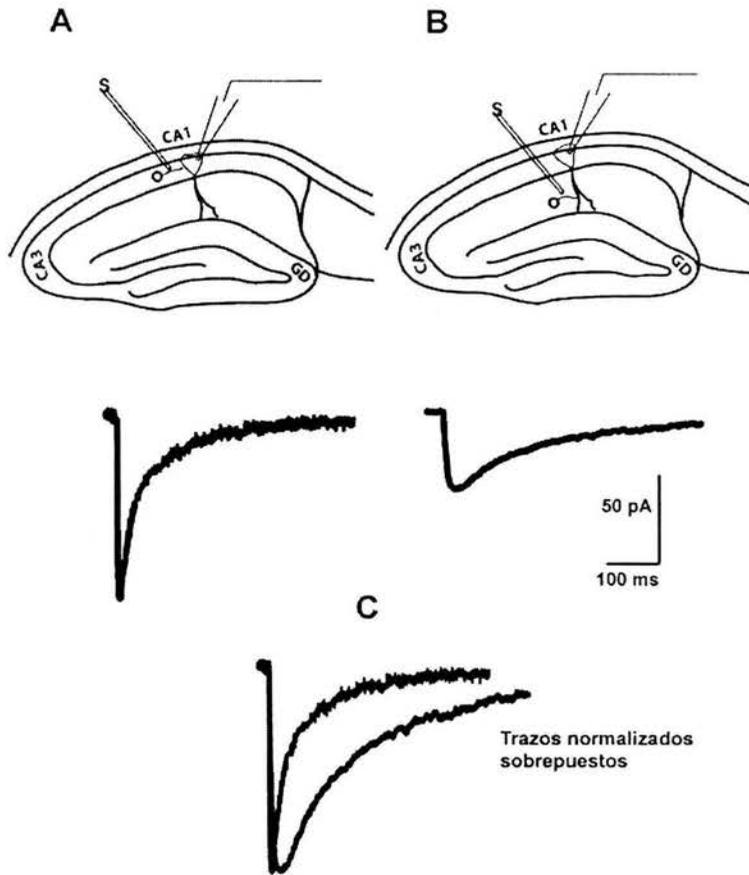


Figura 5. Aislamiento de las corrientes GABAérgicas de acuerdo al protocolo de Miles (Miles et al, 1996). A. Estimulación en *stratum pyramidale* para estimular principalmente interneuronas que hacen sinapsis en el soma. B. Estimulación en *stratum radiatum* para estimular principalmente interneuronas que hacen sinapsis en las dendritas de la célula principal. C. Se muestran los mismos trazos normalizados. Obsérvese la diferencia entre las respuestas generadas en el soma y las dendritas.

Los electrodos de registro fueron fabricados a partir de capilares de borosilicato, con una resistencia d.c. en la punta de 3-6 M Ω . La solución interna consistió (en mM): 79 KH₂PO₄, 36 KCl, 2 MgCl₂*6H₂O, 10 HEPES, 1.1 EGTA, 0.2 Na₂ATP, 0.2 Na₃GTP, 5 QX-314 para bloquear las corrientes de sodio, y 0.5% de biocitina para llenar las neuronas piramidales registradas. Posteriormente se revelaron con rojo de Texas para confirmar su morfología mediante la técnica de Horikawa y Armstrong 1998. (Figura 6). Note que la concentración interna de cloro no es la fisiológica si no que está aumentada, de forma que el potencial de equilibrio del cloro se aleje del potencial de reposo y podamos tener corrientes entrantes de cloro de gran amplitud ($E_{Cl} \approx -30$ mV).

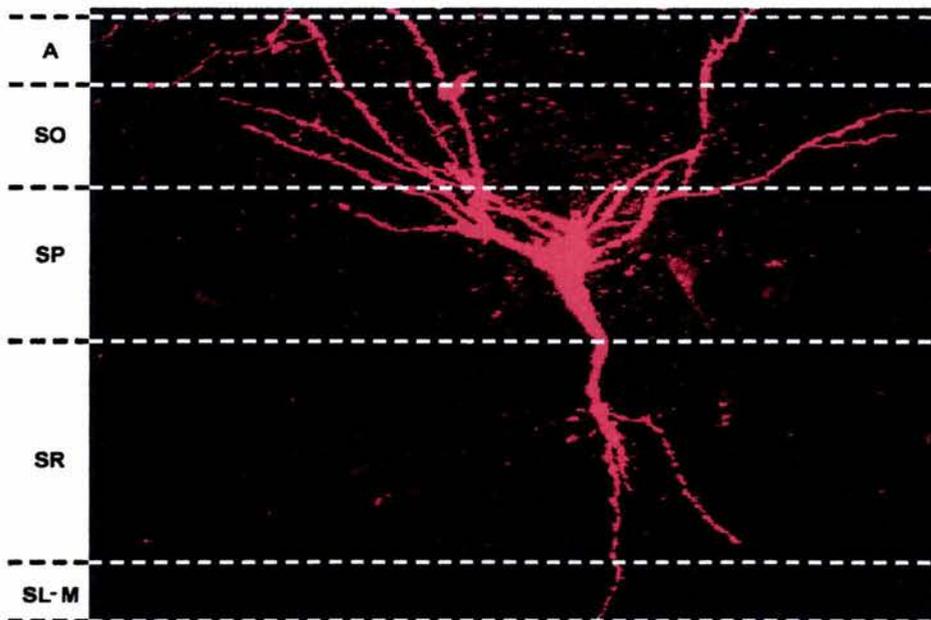


Figura 6. Neurona piramidal registrada en CA1. Las neuronas registradas fueron llenadas con biocitina y reveladas con rojo de Texas para observar su morfología.

Análisis

Utilizamos el protocolo de estimulación con pulsos pareados con un intervalo de 40 ms. Primero se graficó la amplitud normalizada al 100 % del control de la primera respuesta (S_1), tanto para el potencial de campo como para las corrientes sinápticas. Esta amplitud se graficó contra el tiempo. Las comparaciones representan la amplitud promedio de la respuesta sináptica en condiciones control y después de 30 min de haber aplicado la tetanización (**PT** = post-tren). La relación entre los pulsos pareados se obtuvo de dividir la amplitud de la segunda respuesta sináptica (S_2) entre la amplitud de la primera (S_2/S_1). Esto permite ver que tanto del cambio plástico se debe a la presinápsis, en contraparte con los cambios que suceden en la postsinapsis y se basa en el siguiente argumento: ambas respuestas, la primera (S_1), y la segunda (S_2), se originan en el mismo sitio postsináptico (dendritas o soma). Si el cambio plástico se debe a un cambio postsináptico (cambio en el número de receptores o canales, cambio en la resistencia postsináptica, etc.) ambas respuestas van a cambiar de amplitud: en el LTP aumentarán y en el LTD decaerán. Sin embargo, la proporción entre ellas no cambiará, pues se siguen generando en el mismo sitio y de la misma manera. Lo único que podría cambiar la proporción S_2/S_1 es que la dinámica de liberación presináptica se altere (facilitación o depresión de la liberación, cambio en el tamaño del depósito vesicular, etc.), y esto puede deberse, entre otras cosas, a que el manejo del calcio en la terminal haya sido afectado por algún proceso dependiente de la actividad (hipótesis del calcio residual) (McNaughton et al., 1982; Dunwiddie y Hass, 1985; Kleschevnikov et al., 1997; Hernández-Echeagaray et al., 1998; Barral et al., 1999; 2000). De esta manera, el protocolo describe la plasticidad y da pie para hacer hipótesis sobre su origen (ver Kleschevnikov et al., 1997).

RESULTADOS

Plasticidad de largo plazo provocada con estimulación de alta frecuencia

La estimulación de las colaterales de Schaffer a la frecuencia de 0.1 Hz, se hizo colocando el electrodo de estimulación en el *stratum radiatum* (Fig 7A). Esto provocó la típica repuesta poblacional (Kleschevnikov et al., 1997; Bennett, 2000; Pouille y Scanziani, 2001) que pudo registrarse en la capa piramidal del subcampo CA1 (ver figura 7B). Después del registro en condiciones control (10-15 min) se estimuló a alta frecuencia: **EAF** = 2 trenes de 100 Hz con intervalo de 10s. Esto provocó un primer aumento transitorio (5 min) en la amplitud de ambas respuestas poblacionales, atribuido a la potenciación post-tetánica, y un aumento posterior de largo plazo (> 30 min; **LTP**) de $200\% \pm 14\%$ ($p < 0.04$; estadístico de Willcoxon; $n = 5$; Fig. 7B) en la primera respuesta poblacional (S_1) (Fig. 7C izquierda). La proporción S_2/S_1 se redujo en todos los casos ($p < 0.04$; estadístico de Willcoxon; Fig. 7C derecha) indicando un aumento, de origen presináptico, en la probabilidad de liberación (Kuhnt y Voronin, 1994; Schulz et al, 1994; Kleschevnikov, et al., 1997), además de los cambios postsinápticos ya descritos en esta sinapsis (Lynch et al., 1982; Davies et al., 1989; Lovinger et al., 1981; Malenka, et al., 1986; Malenka et al., 1989a; Malenka et al., 1989b; Malenka y Nicoll, 1993; Soderling y Derkach, 2000; Fink y Meyer, 2002).

¿Qué ocurre con las sinapsis inhibitoras durante este tipo de plasticidad?

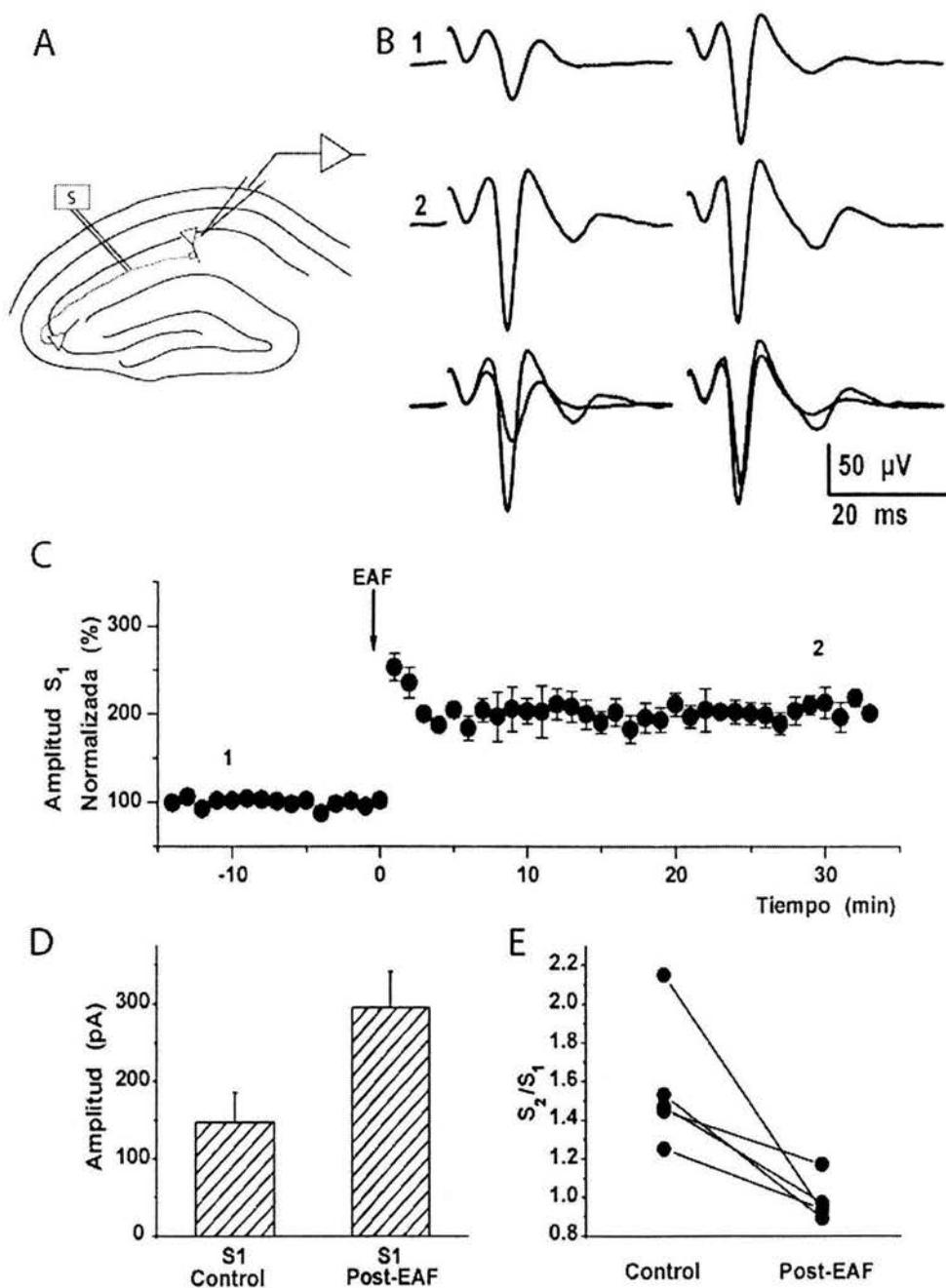


Figura 7. LTP en el área CA1. A. Esquema del sistema de estimulación y registro. B. Registros representativos del potencial de campo en la capa piramidal de CA1 al estimular con pulsos pareados. De arriba hacia abajo: antes (1) y después (2) de la estimulación con alta frecuencia (EAF). Los trazos inferiores son la superposición de 1 y 2. C. Curso temporal del aumento en la amplitud de la respuesta S_1 . En todos los casos se produjo LTP de las neuronas piramidales. D. Histograma que compara la amplitud promedio del potencial de campo (S_1) antes y después de los trenes de alta frecuencia (EAF). E. Cambio en la proporción S_2/S_1 .

Aislamiento de las corrientes inhibitoras.

Para estudiar la transmisión sináptica inhibitora, se utilizó el registro de en célula entera en la configuración de fijación de voltaje en neuronas piramidales de CA1 en rebanada de hipocampo. Las corrientes postsinápticas inhibitoras (IPSCs) fueron provocadas con el mismo protocolo que se usó para producir LTP en las sinapsis excitadoras. Sin embargo, el medio ahora contenía CNQX (10 μ M), antagonista del receptor glutamatérgico ionotrópico de tipo AMPA/KA. El electrodo de estimulación se colocó en uno de dos sitios: en el *stratum radiatum* para estimular preferencialmente a las neuronas cuyo blanco principal son las dendritas (DTC o DBC), o en el *stratum pyramidale* con el objeto de estimular preferencialmente a las neuronas cuyo blanco principal es la región perisomática (BC y AAC) (Ver: Miles et al., 1996). Las neuronas piramidales fueron identificadas por su morfología mediante la técnica de videomicroscopía infrarroja.

El potencial de mantenimiento fue de -70 mV. Las IPSCs a este potencial son entrantes (Figura 8A) debido al gradiente de cloro escogido ($[Cl]_i = 40$ mM). Además, se utilizó QX-314 (5 mM) en la pipeta de registro para bloquear las corrientes de sodio que pudieran contaminar el registro de las corrientes sinápticas.

En presencia de CNQX, las IPSCs obtenidas de esta manera fueron totalmente bloqueadas por el antagonista del receptor $GABA_A$, bicuculina 10 μ M, como se muestra en las Figuras 8A,B. Este bloqueo fue reversible. De esta forma queda demostrado que prácticamente toda la corriente sináptica provocada en estas condiciones es mediada por la activación del receptor $GABA_A$ ($n = 3$).

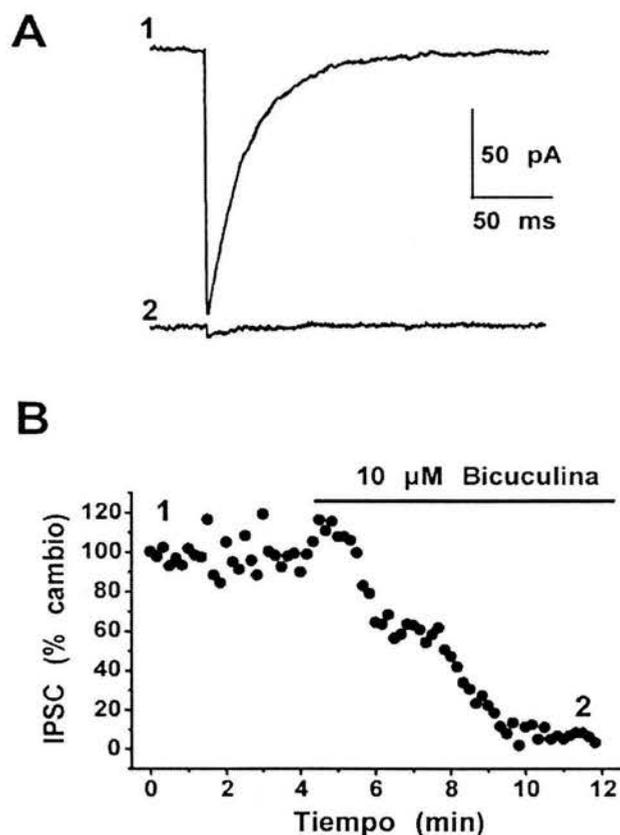


Figura 8. IPSCs en neuronas piramidales del hipocampo estimulando interneuronas. A. Registros representativos de IPSCs tomados antes y durante la presencia de bicuculina ($10 \mu\text{M}$) en la solución de superfusión, a los tiempos indicados por los números en el curso temporal en B ($n = 3$). B. Curso temporal del cambio en la amplitud (como % del control) del IPSCs en presencia de CNQX antes (1) y después de la bicuculina (2).

Por otro lado, la función corriente-voltaje de estas corrientes muestra que su potencial de inversión es de $-30.9 \pm 5 \text{ mV}$ ($n=6$) lo que es muy cercano al potencial de equilibrio calculado para el cloro: $E_{\text{Cl}} \approx -30 \text{ mV}$ (Figura 9A,B). La curva I-V de la IPSC se ajustó a una función recta. El ajuste a un polinomio para tomar en cuenta la posible rectificación de la membrana (Fitzpatrick et al, 2001) no mostró diferencias significativas. Esto demuestra que las corrientes sinápticas sensibles a bicuculina son de cloro, mediadas por el receptor GABA_A (MacCaferrri et al., 2000).

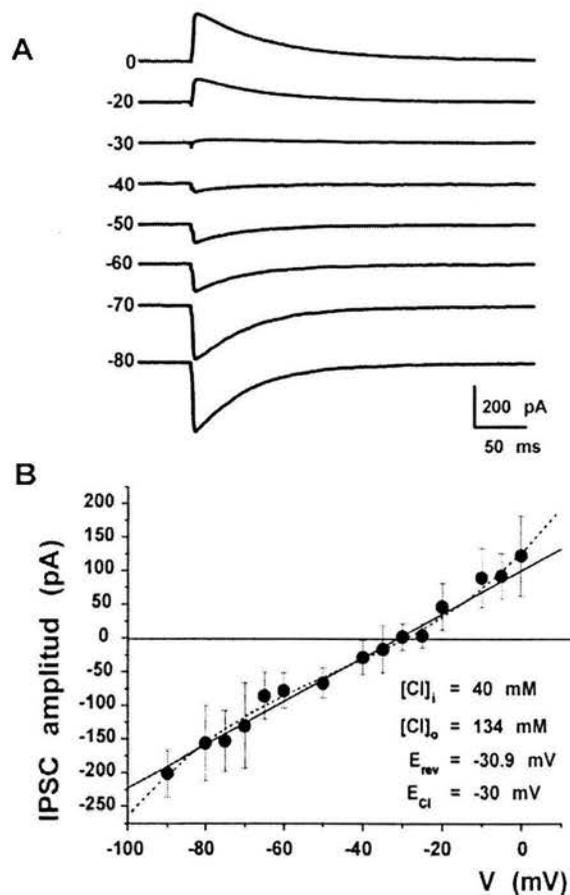


Figura 9. Aislamiento de las corrientes inhibitorias. A. Corrientes sinápticas representativas provocadas en una neurona piramidal de CA1 al estimular en las interneuronas aledañas. Las IPSCs fueron registradas a diferentes potenciales de membrana y cada registro es el promedio de 5 trazos. B. La amplitud de las corrientes es graficada contra los diferentes potenciales de membrana. La curva I-V se ajustó a una línea recta arrojando un potencial de inversión = $-30.9 \pm 5 \text{ mV}$ ($n = 6$); no fue significativamente diferente del potencial de equilibrio calculado para el ión cloro (-30 mV). El ajuste polinomial (línea punteada) no arroja un resultado significativamente diferente.

Plasticidad de largo plazo en sinapsis inhibitoras

Sinapsis GABAérgicas en las dendritas

Para provocar plasticidad de largo plazo en las sinapsis inhibitoras que inervan a las dendritas de las neuronas piramidales, se administraron trenes de alta frecuencia (ver Material y Métodos) a nivel de donde se encuentran la mayoría de los somas y axones de las interneuronas que dan origen a estas terminales, esto es, en el *stratum radiatum* (Miles et al, 1996). Todo el protocolo se hizo en presencia de CNQX (10 μ M) para bloquear las sinapsis excitadoras.

La Figura 10A muestra el esquema de estimulación y registro, note que el electrodo de estimulación activa preferentemente a los axones y somas de las interneuronas que inervan a las dendritas (Miles et al, 1996). Un ejemplo representativo de las corrientes inhibitoras (IPSCs) obtenidas con este arreglo se muestra en la Figura 10B. Observe la gran reducción en la amplitud de la IPSC después de la tetanización (EAF). Cada trazo es el promedio de 15 IPSCs antes (1) y 35 minutos después de la EAF (2). La Figura 10C muestra el curso temporal del experimento. La estimulación de alta frecuencia en el *stratum radiatum* provocó una reducción persistente en la amplitud de la corriente sináptica del $50\% \pm 10\%$ (estadístico de Wilcoxon, $p < 0.008$; $n = 10$). Esta reducción en la amplitud se instaló en alrededor de 20 min y se mantuvo estable por cuando menos otros 20 min subsecuentes. Estos resultados se repitieron en 10 de 20 experimentos (50% de los casos) en que el estímulo se procuró en el *stratum radiatum* (ver fig.10 y 11).

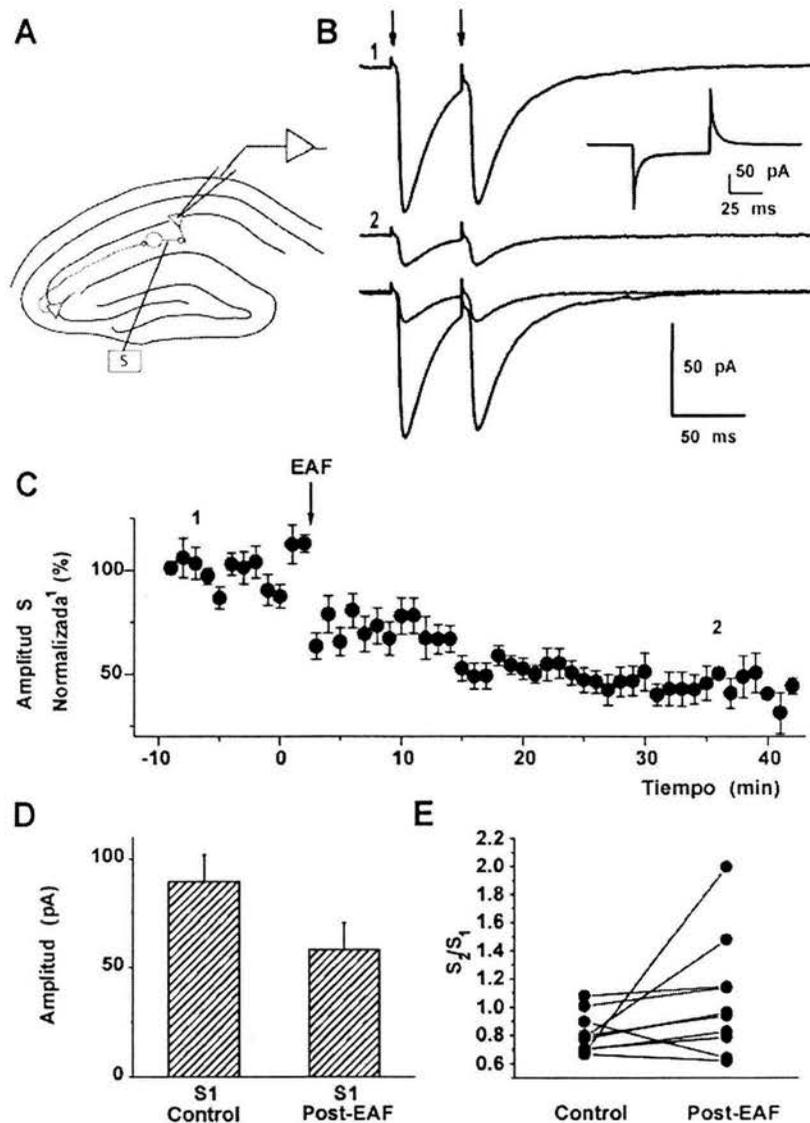


Figura 10. LTD en sinapsis inhibitoras dendríticas. A. Esquema de estimulación y registro: el electrodo de estimulación, colocado en el *stratum radiatum*, activa preferentemente las sinapsis que inervan las dendritas (Miles et al, 1996). B. IPSCs provocadas con pulsos pareados antes (1) y después de la estimulación de alta frecuencia (EAF) (2). La superposición de ambos trazos se ilustra abajo. El inserto son las respuestas al mismo comando de voltaje antes y después de la EAF, se muestra que no hay cambio en la conductancia de entrada postsináptica durante el experimento. C. Curso temporal del establecimiento de la LTD en las sinapsis inhibitoras dendríticas. Los números señalan los tiempos aproximados en que se obtuvieron los registros de B. D. El histograma resume el cambio en la amplitud de la respuesta S_1 . E. La relación S_2/S_1 no muestra cambios consistentes en la mayoría de los casos.

Los números en los registros de la Figura 10B señalan los tiempos aproximados en que se tomaron los registros de acuerdo al curso temporal de la Figura 10C. El histograma resume el resultado de la muestra (Fig. 10D). Es de notar que la proporción S_2/S_1 no se modificó de manera consistente (Fig. 10E), lo que sugiere que el mecanismo de LTD observado es predominantemente de origen postsináptico y que la liberación de GABA en las terminales no se modifica.

Sin embargo, note que tres de las neuronas de la muestra si presentan un cambio significativo en la proporción S_2/S_1 (Fig. 10E), lo que abre la posibilidad de que distintas interneuronas utilicen diferentes mecanismos para expresar LTD. El tamaño de la muestra ha de ser mucho mayor para llegar a una conclusión a este respecto, pero queda claro que un gran número de sinapsis que inervan las dendritas son capaces de expresar LTD en respuesta al mismo protocolo que produce LTP en las sinapsis CA3-CA1; sinapsis glutamatérgicas entre neuronas piramidales.

Sinapsis inhibitoras que no expresaron plasticidad de largo plazo debido al protocolo de tetanización en *s. radiatum*.

La mitad de las sinapsis inhibitoras estimuladas desde el *s. radiatum* no sufrió cambio alguno debido al protocolo de tetanización que se utiliza para producir LTP en las neuronas piramidales. No sabemos si otros protocolos serían capaces de producir plasticidad de largo plazo en estas sinapsis. Sabemos que otros investigadores reportan dificultad en el establecimiento de la plasticidad de largo plazo en las sinapsis de las interneuronas (Abraham et al., 1987; McBain et al, 1999). La Figura 11 ilustra los casos en que el cambio en la fuerza sináptica no fue significativo (estadístico de Wilcoxon, $p > 0.06$; $n=10$).

Por lo tanto, se puede concluir que el protocolo de estimulación que provoca LTP en las sinapsis excitadoras que inervan a las neuronas piramidales provoca LTD en aproximadamente la mitad de las sinapsis inhibitoras que inervan

las dendritas de estas mismas neuronas piramidales (Stelzer et al., 1994; Pitler y Alger; 1994; Miles 1996).

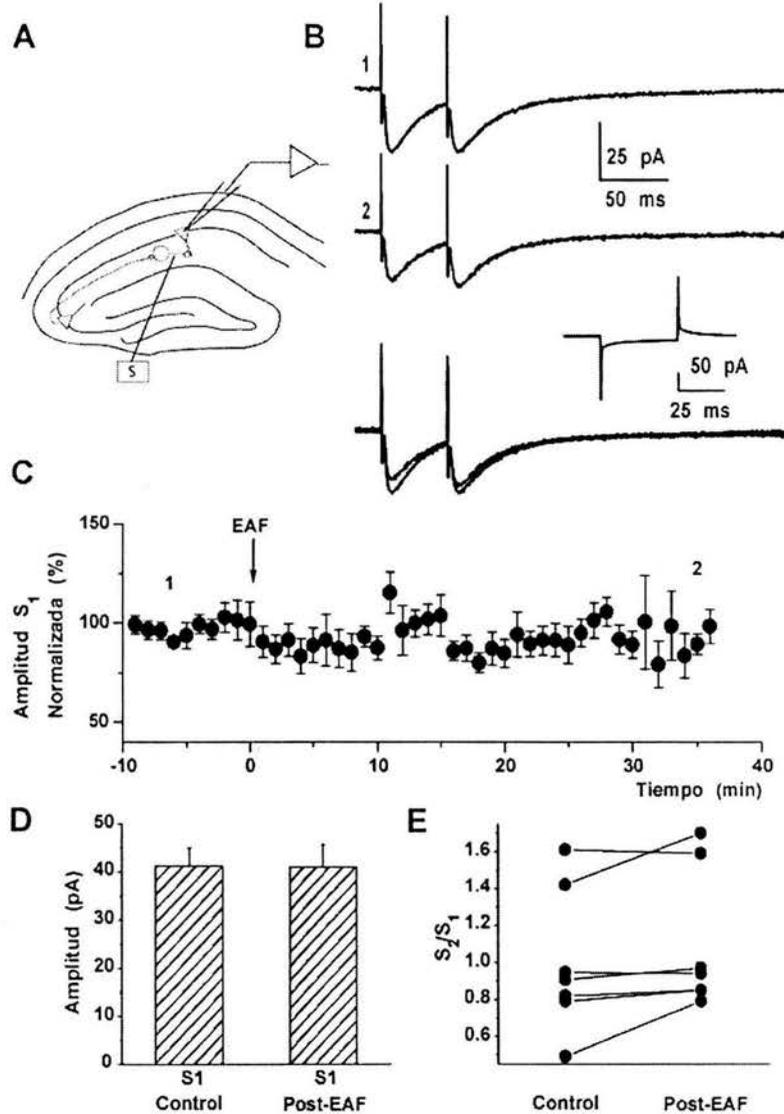


Figura 11. El protocolo de tetanización no produjo cambios de largo plazo en la mitad de las sinapsis inhibitorias dendríticas. A. Esquema de estimulación y registro como en la Figura 7. B. IPSCs provocadas con pulsos pareados antes (1) y después de la estimulación de alta frecuencia (EAF) (2). La superposición de ambos trazos se ilustra abajo. El inserto son las respuestas al mismo comando de voltaje antes y después de la EAF; muestra que no hay cambio en la conductancia de entrada postsináptica durante el experimento. C. Curso temporal del establecimiento. Los números señalan los tiempos aproximados en que se obtuvieron los registros de B. D. El histograma muestra que no hay cambios significativos en la amplitud de la respuesta S_1 ($n=10$). E. La relación S_2/S_1 no muestra cambios significativos o consistentes en la mayoría de los casos.

Sinapsis GABAérgicas en la región perisomática

Para provocar plasticidad de largo plazo en la sinapsis inhibitoras que inervan al soma y los troncos dendríticos cercanos (región perisomática), se administraron los trenes de alta frecuencia (ver Material y Métodos) a nivel de donde se encuentran la mayoría de los somas y axones de las interneuronas que dan origen a estas terminales, esto es, en el *stratum pyramidale* (Miles et al, 1996). Todo el protocolo se hizo en presencia de CNQX (10 μ M) para bloquear las sinapsis excitadoras.

La Figura 12A muestra el esquema de estimulación y registro, note que el electrodo de estimulación activa preferentemente a los axones y somas de las interneuronas que inervan la región perisomática (Miles et al, 1996). Un ejemplo representativo de las corrientes inhibitoras (IPSCs) obtenidas con este arreglo se muestra en la Figura 12B. Observe el gran aumento en la amplitud de la IPSCs después de la tetanización (EAF). Cada trazo es el promedio de 15 IPSCs antes (1) y 35 minutos después de la EAF (2). La Figura 10C muestra el curso temporal del experimento. La estimulación de alta frecuencia en el *stratum pyramidale* provocó un aumento persistente en la amplitud de la corriente sináptica de $165\% \pm 20\%$ respecto del control (estadístico de Wilcoxon, $p < 0.008$; $n=10$). Esta potenciación sináptica se instaló en alrededor de 15 min y se mantuvo estable por cuando menos otros 25 min subsecuentes. Este resultado se observó en todos los casos en que el estímulo se dió en el *stratum pyramidale*. Por lo tanto, se puede decir que el protocolo de estimulación que provoca LTP en las sinapsis excitadoras que inervan a las neuronas piramidales también provoca LTP en las sinapsis inhibitoras que inervan la región perisomática (MacCaferrri y McBain, 1996; Perez et al, 2001). Los números en los registros de la Figura 10B señalan los tiempos aproximados en que se tomaron los registros de acuerdo al curso temporal de la Figura 12C. El histograma resume el resultado de la muestra (Fig. 12D). Es de notar que en la mayor parte de los casos la proporción S_2/S_1

disminuyó ($p < 0.05$; estadístico de Wilcoxon; Fig. 12E), lo que sugiere que el mecanismo de LTP observado en las sinapsis inhibitoras tiene un componente presináptico y que la liberación de GABA en las terminales está aumentada después de la tetanización. Tendría que hacerse análisis cuántico en estos casos para saber que sucede, si un cambio en el tamaño del cuanto, si la puesta en marcha de sinapsis silentes, o si un aumento en el contenido cuántico de los mismos botones.

La activación de las interneuronas de la capa piramidal puede estar modulando la actividad en la salida de las neuronas piramidales, por ejemplo, células en canasta (Steele y Mauk 1999).

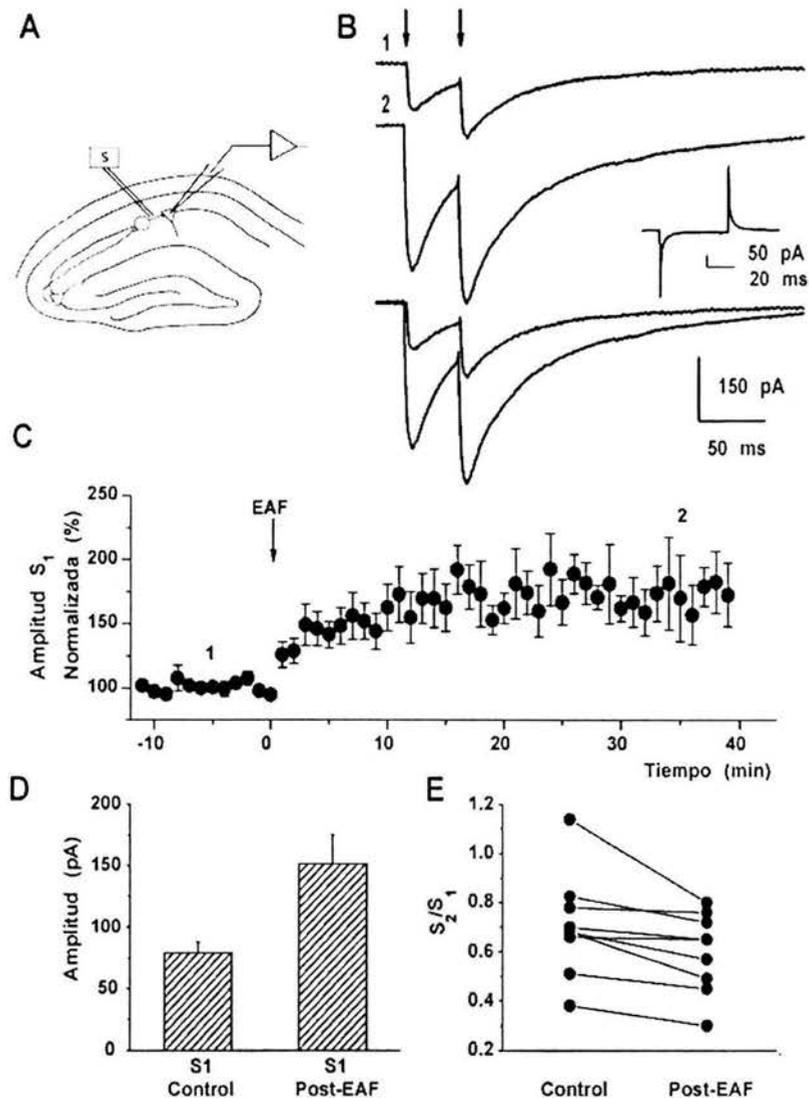


Figura 12. LTP en sinapsis inhibitoras perisomáticas. A. Esquema de estimulación y registro: el electrodo de estimulación, colocado en el *stratum pyramidale*, activa preferentemente las sinapsis que inervan al soma y las dendritas cercanas (región perisomática) (Miles et al, 1996). B. IPSCs provocadas con pulsos pareados antes (1) y después de la estimulación de alta frecuencia (EAF) (2). La superposición de ambos trazos se ilustra abajo. El inserto son las respuestas al mismo comando de voltaje antes y después de la EAF; muestra que no hay cambio en la conductancia de entrada postsináptica durante el experimento. C. Curso temporal del establecimiento de la LTP en las sinapsis perisomáticas. Los números señalan los tiempos aproximados en que se obtuvieron los registros de B. D. El histograma resume el cambio en la amplitud de la respuesta S₁. E. La relación S₂/S₁ se redujo significativamente.

DISCUSIÓN

Existe una diversidad de interneuronas en el hipocampo, y se ha mostrado que inervan de manera diferencial la membrana somatodendrítica de la neurona piramidal (Buhl et al., 1994a; McBain, 1995; Freund and Buzsáki, 1996; Maccaferri et al., 2000). En la presente tesis encontramos que las interneuronas difieren en la expresión de la plasticidad sináptica de largo plazo: las sinapsis de interneuronas que preferencialmente inervan a las dendritas de la célula piramidal, sufren LTD, mientras que las sinapsis de interneuronas que preferencialmente inervan a la región perisomática sufren LTP, con el mismo protocolo de estimulación que induce LTP en las sinapsis glutamatérgicas. Esto sugiere que durante la inducción de la plasticidad de largo plazo hay cambios complejos en las propiedades de la red que van más allá del cambio en las sinapsis glutamatérgicas (Maccaferri y McBain, 1996), lo demuestra que existen cambios diferenciales en los pesos sinápticos de la red (Steele y Mauk, 1999), en el largo plazo y en respuesta al mismo estímulo.

La potenciación de largo plazo intenta explicar los cambios en la red neural durante el aprendizaje y la memoria (Hebb, 1949; Bliss y Collingridge, 1993; Malenka y Nicoll, 1993). En el caso de las sinapsis piramidales, por ejemplo, de CA3 a CA1, se puede registrar como un aumento en la amplitud de la espiga poblacional (Bliss y Collingridge, 1993) concomitantemente a una reducción en la tasa de amplitud de los pulsos pareados (Voronin y Kuhnt, 1990; Kuhnt y Voronin, 1994; Schulz et al., 1994; Kleschevnikov et al., 1997). Esto sugiere que la LTP en las sinapsis glutamatérgicas entre CA3-CA1 se debe a cambios de largo plazo tanto a nivel postsináptico (Musleh et al., 1993; Bear y Malenka, 1994; Larkman y Jack, 1995; Cummings et al., 1996; Parnass et al., 2000; Soderling y Derkach, 2000) como presináptico (Malenka et al., 1986; Christie y Abraham, 1994; Kleschevnikov et al., 1997). Hebb propuso que ciertas sinapsis de la red, involucradas en el procesamiento de un estímulo de manera repetida, desarrollan un aumento persistente en su eficacia sináptica, reforzando así ciertas conexiones

y estableciendo el trazo de memoria (Figura 13). Esta forma de plasticidad es entonces dependiente del uso o de la actividad repetitiva de la conexión (Hebb, 1949). Adicionalmente planteó que para que esto sucediera, deberían haber momentos en que ambas, la membrana postsináptica y la presináptica estuvieran activadas (Hebb, 1949). Esto es, que ambas se activaran en la misma “ventana” de tiempo para que hubiera potenciación (Figura 13b). Desde las investigaciones de Bliss y Lomo (1973) se estableció que una estimulación de alta frecuencia es capaz de despolarizar por periodos prolongados a las dendritas de las neuronas piramidales activando a los receptores a NMDA (Bliss y Collindridge, 1993). En la sinapsis CA3-CA1 se sabe que la activación de estos receptores es necesaria para la potenciación de largo plazo (plasticidad dependiente de NMDA). Además, Stuart y Sakmann (1994) demostraron que los potenciales de acción generados en la región somática y del cono axónico de la neurona piramidal pueden propagarse hacia las dendritas retrógradamente lo que mantiene la despolarización y la entrada de Ca^{2+} (Miles et al., 1996; Kamondi et al., 1998). Así, la activación presináptica es concomitante a una despolarización postsináptica (Markram et al., 1997; Magee y Johnston, 1997). Si las despolarizaciones sucesivas son causadas por distintas aferentes, la estimulación repetida llevaría a la asociación temporal de su activación; lo que es un requerimiento de los modelos de aprendizaje asociativo (Figura 13b).

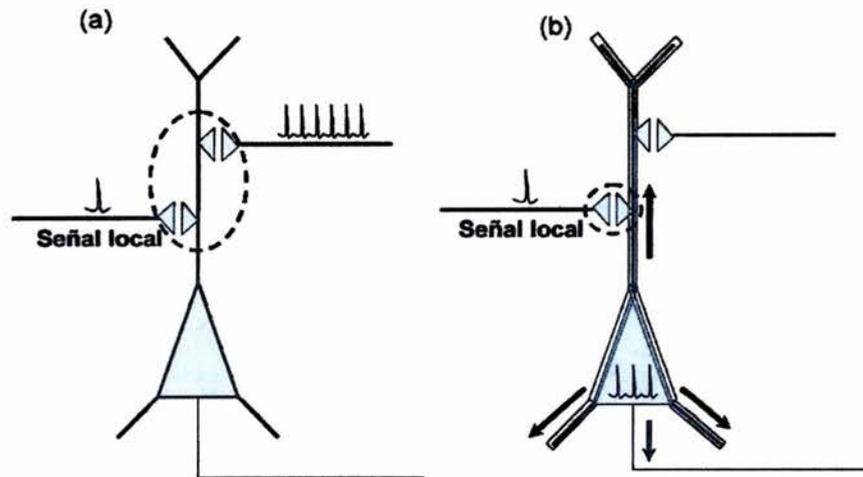


Figura 13. Asociación de dos estímulos y plasticidad de largo plazo. (a) Una entrada sináptica produce una depolarización dendrítica que desbloquea los receptores NMDA. Esta señal NMDA puede propagarse a la membrana dendrítica de sinapsis vecinas, que si se activan en una ventana de tiempo corta, producirán potenciación. (b) También puede suceder que la primera entrada sináptica produzca potenciales de acción que se propaguen retrógradamente al árbol dendrítico manteniendo la despolarización (backpropagating action potentials). La activación pre y post sinápticas, cercanas en el tiempo, es necesaria para la plasticidad.

Se sabe que el orden temporal de las señales pre- y post-sináptica es importante para el desarrollo de la potenciación (Zhang et al., 1998). Si la actividad de una aferente presináptica antecede en alrededor de 20 ms a la despolarización postsináptica ocurrirá potenciación (LTP) (Bi y Poo, 1998; Zhang et al., 1998). Pero si el disparo post-sináptico antecede al pre-sináptico o si estos no coinciden, se desarrolla depresión (LTD) (Bi y Poo, 1998; Zhang et al., 1998). Esto sugiere que diferentes sinapsis se modifican de acuerdo al orden temporal de la activación pre- y post-sináptica (Bi y Poo 1999). Pero, ¿todas las sinapsis de la red se registrarán por las mismas reglas?, ¿qué pasa con las sinapsis GABAérgicas de las interneuronas cuando las sinapsis glutamatérgicas se están potenciando?, ¿presentan la misma plasticidad?

A este respecto, son varios los autores que proponen que, en las interneuronas, es difícil expresar la plasticidad de largo plazo. Se piensa que fueron diseñadas para "poner a tiempo" el disparo de la red y no para guardar el

trazo de memoria (Cobb et al., 1995; McBain et al., 1999). Sin embargo, hay investigadores que, bajo ciertos protocolos de estimulación, han demostrado que las interneuronas pueden expresar plasticidad de largo plazo. Stelzer y colaboradores (1994), mediante registro intracelular mostraron que registrando en el soma, las sinapsis GABAérgicas podían deprimirse, lo que apoya nuestros resultados. Aunque estos autores no seleccionaron por separado las sinapsis que se dirigen preferentemente al soma o a las dendritas, su resultado los llevó a sugerir que las dendritas se desinhiben alrededor de la sinapsis glutamatérgica potenciada (Stelzer et al., 1994). Por otro lado, se ha observado un incremento persistente del componente inhibitorio que no requiere de la activación de receptores glutamatérgicos (Xie et al., 1995). También se ha propuesto que diferentes moduladores, cuyos receptores están en las terminales GABAérgicas, ayudan a la expresión de la plasticidad. Un mecanismo sugerido es la regulación presináptica a través de la activación de receptores a cannabinoides (Chevalyere y Castillo, 2003). La depresión causada por la activación de receptores a cannabinoides es de largo plazo y causa con un aumento en la tasa de pulsos pareados (Lu et al., 2000; Chevalyere y Castillo, 2003). En vista de estos resultados, decidimos explorar la plasticidad de las sinapsis inhibitorias, pero en lugar de explorar diferentes protocolos de estimulación hasta lograr la plasticidad, como es el caso de los autores citados, pusimos como condición que la plasticidad debía de ser obtenida con el mismo protocolo (EAF, ver Material y Métodos) que la produce en las sinapsis excitadoras. Pues si las sinapsis GABAérgicas participan en el trazo de memoria, ha de ser en las condiciones en que ésta se produce en las sinapsis excitadoras.

Así, después de aislar las corrientes sinápticas inhibitorias sobre las neuronas piramidales de CA1, demostrando su sensibilidad a la bicuculina y su potencial de equilibrio similar a E_{Cl} (Jensen et al., 1999; Guzman et al., 2003), se procedió a estimularlas con el mismo protocolo de tetanización que produce LTP en las sinapsis glutamatérgicas de las neuronas piramidales.

Por otro lado, se ha demostrado que los distintos tipos de interneuronas hacen sinapsis en diferentes dominios de la membrana somatodendrítica de las neuronas piramidales (Freund y Buzsáki, 1996; Maccaferri et al., 2000; Somogyi et al., 1998; Gupta et al., 2000). Algunas interneuronas hacen sinapsis en la región perisomática y el cono axónico (Miles et al., 1996; Paulsen y Moser, 1998) mientras que otras inervan dominios dendríticos (McBain, 1995). Esto sugiere que la distribución espacial de los diferentes tipos de neuronas inhibitoras podría marcar la pauta para una distribución espacial de la plasticidad. Pudiera ser que una función de las sinapsis inhibitoras dendríticas fuera la de modular la inducción de la plasticidad sináptica de largo plazo en las sinapsis glutamatérgicas (Wigstrom y Gustaffson, 1983; Kullmann et al., 1992). Por esta razón, decidimos utilizar el protocolo de Miles (1996) para estimular de manera preferencial las sinapsis inhibitoras que van a las dendritas o las sinapsis que inervan la región perisomática.

Lo que encontramos fue que al estimular en la capa piramidal para seleccionar las sinapsis que inervan la región perisomática, el protocolo de **EAF** se provocó un aumento sostenido (LTP) en la amplitud de las IPSCs (Hollrigel et al., 1998; Stelzer et al., 1994), similar a lo que mostró Caillard en la capa CA3 del hipocampo (Caillard et al., 1999) y Hollrigel en las células de giro dentado (Hollrigel et al., 1998). Se sabe que las células axo-axónicas y las células en canasta (Maccaferri et al., 2000) están localizadas en, o adyacentes a, la capa piramidal de CA1, y son activadas por aferentes excitadoras de todas las vías aferentes: fibras musgosas, colaterales de Schaffer, aferentes comisurales, aferentes entorrinales, y recurrentes de las células principales (Freund y Buzsáki, 1996; Stelzer et al., 1994; Freund, 2003). La activación de estas células promueve la inhibición del soma y el segmento inicial del axón de las células principales por lo cual se puede inhibir la salida del potencial de acción (Miles et al., 1996; Freund 2003). La estimulación en la capa piramidal produce inhibición recurrente de la célula principal (Xie et al., 1995; Stelzer et al., 1994). Uno de los mecanismos que se activa en el aumento de la transmisión inhibitoria, es la activación de proteínas

cinastas C y A (PKC y PKA) presinápticamente (Caponja et al., 1995). Contrario a lo encontrado en la presente investigación, Grunze, en 1996 había mostrado que el componente inhibitorio registrado en la célula piramidal de CA1, disminuye (Grunze et al., 1996).

En contraste, cuando estimulamos en el *stratum radiatum*, para seleccionar las sinapsis que inervan la región dendrítica, se provocó una disminución sostenida (LTD) en la amplitud de las IPSCs (Chevalleyre y Castillo, 2003). Investigaciones anteriores mostraron que la estimulación en el *stratum radiatum* provoca un aumento en el componente inhibitorio (Xie y Sastry, 1991; Morishita y Sastry, 1991; Xie y Sastry, 1995). Por otro lado, Steele y Mauk (1999) mostraron que la potenciación de la entrada glutamatérgica puede ser modulada por la activación de receptores GABA_A. De esta manera, nuestros resultados demostraron que el mismo protocolo de estimulación que produce plasticidad de largo plazo en las neuronas piramidales también produce plasticidad de largo plazo en las interneuronas, esto muestra que la plasticidad es diferencial siguiendo un patrón espacial (Paulsen y Moser; 1998; Paulsen y Sejnowski, 2000; Buzsáki et al., 2003; Klausberger et al., 2003; Klausberger et al., 2004). Esto es, las sinapsis que inervan las dendritas se deprimen, mientras que las que inervan la región perisomática se potencian. Tomando el modelo de Paulsen y Moser (1998) se puede especular sobre la importancia funcional de nuestro hallazgo (Figura 14). Es claro que la producción de LTD en las sinapsis dendríticas, mientras se produce el trazo de memoria, tendería a favorecer el establecimiento de la potenciación de largo plazo de las sinapsis excitadoras, pues las sinapsis glutamatérgicas en las dendritas se desinhibirían de manera selectiva. Sugerimos que en la dendrita, la LTP glutamatérgica conlleva la LTD GABAérgica de las sinapsis vecinas.

Mientras que la potenciación simultánea de las sinapsis GABAérgicas perisomáticas tendería a evitar que durante el periodo de “guardado” de la información, con el consecuente aumento de la excitabilidad postsináptica, la

neurona estuviese disparando. De esta forma, se estaría ayudando a que la neurona entre o se mantenga en el "modo guardar" (Fig. 14).

Falta mencionar que al estimular en el *stratum radiatum*, la mitad de las sinapsis GABAérgicas registradas no acusó ningún cambio persistente en la amplitud de las corrientes registradas (Stelzer et al., 1994). Esto no quiere decir que estas sinapsis no puedan ser modificadas bajo otros protocolos (Patenaude et al., 2003; Chevaleyre y Castillo, 2003). Sólo resalta el hecho de que hay muchos tipos de interneuronas y así como se han dividido por su plasticidad de corto plazo (Markram et al., 1998; Gupta et al., 2000) también podrían dividirse por su plasticidad de largo plazo.

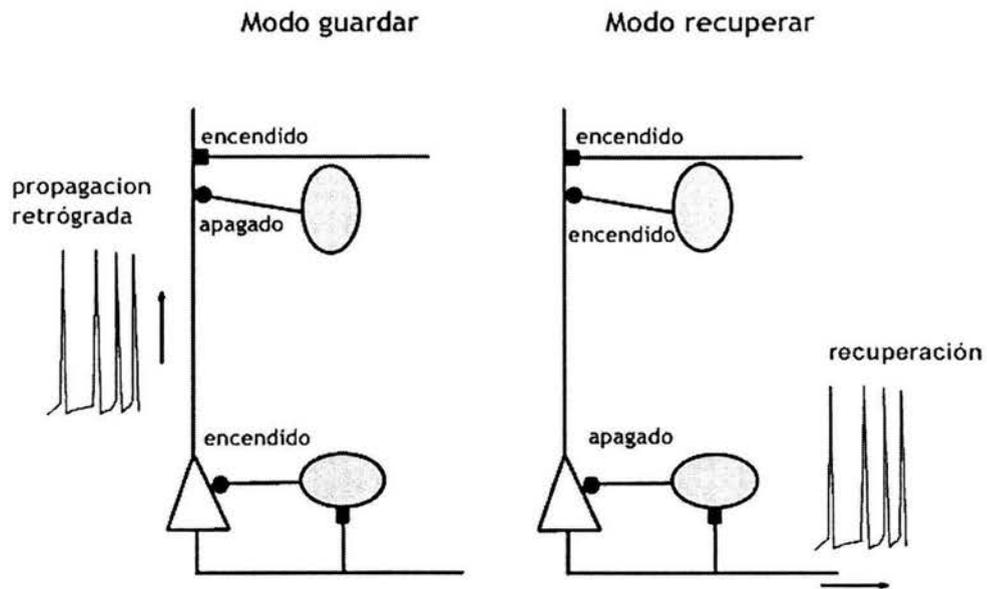


Figura 14. Modelo de Paulsen y Moser. La regionalización de la inhibición sobre la membrana somatodendrítica de las neuronas piramidales tiene un sentido funcional. Cuando las sinapsis dendríticas se están potenciando, ayudaría que la inhibición dendrítica se deprimiese de manera selectiva, esto es, que hubiese desinhibición dendrítica junto aquellas sinápsis excitadoras dendríticas que se estuvieran potenciando para así facilitar la plasticidad. Como la célula está guardando información en este momento, no interesa que dispare y la mande afuera. Entonces, de manera simultánea interesaría que la inhibición perisomática se potenciara (izquierda). Por otro lado, tendría que haber un estado o modo en el que la neurona mande la información previamente guardada hacia afuera de manera fiel ("modo de recuperación" o "read out"), por lo que sería conveniente que se bloqueara la entrada de nueva información (derecha).

CONCLUSIONES

Con el mismo protocolo de estimulación que produce LTP en las sinapsis glutamatérgicas de CA3-CA1:

- ✓ Se produjo LTD en el 50% de las sinapsis GABAérgicas que inervan la región dendrítica de la célula piramidal.

- ✓ Se produjo LTP en las sinapsis GABAérgicas que inervan la región perisomática, mostrando que:

- ✓ Diferentes tipos de sinapsis GABAérgicas exhiben diferentes tipos de plasticidad de largo plazo durante el establecimiento de la potenciación en las neuronas piramidales.

En el presente trabajo, se ha reportado que las sinapsis GABAérgicas sufren plasticidad de largo plazo. Esto sugiere, que la plasticidad de largo plazo no depende sólo de la modificación de las sinapsis glutamatérgicas, sino también de la participación de las sinapsis GABAérgicas, conformando así, cambios espacio-temporales de los pesos sinápticos (Paulsen y Moser, 1998) lo que puede fundamentar el mecanismo celular de la memoria.

El hipocampo ha sido ampliamente estudiado por su participación en la formación de la memoria. Además, varios tipos de ritmos oscilatorios pueden observarse mediante registro extracelular, los cuales están relacionados con conductas de aprendizaje. Por otro lado, se ha mostrado que la función de las interneuronas es regular las oscilaciones en este núcleo sincronizando la actividad de las células principales (Freund, 2003). Durante el ritmo theta (el cuál está relacionado con el comportamiento exploratorio y el movimiento de rápido de los ojos), las diferentes poblaciones de interneuronas están en fase o en contra fase del ritmo de las neuronas piramidales (Buzsáki et al., 2003; Klausberger et al., 2003; Klausberger et al., 2004), modulando la entrada y salida de la información en la célula piramidal. Una investigación de Hyman en el año de 2003 mostró por primera vez que la estimulación de alta frecuencia y el ritmo theta están estrechamente relacionados y fundamentan el mecanismo de aprendizaje (Hyman et al., 2003).

Bibliografía

- Abraham W.C., Gustafsson B., Wigstrom H. (1987). Long-term potentiation involves enhanced synaptic excitation relative to synaptic inhibition in guinea-pig hippocampus. *J. Physiol.* 394: 367-80.
- Alle H., Jonas P., Geiger J.R. (2001). PTP and LTP at a hippocampal mossy fiber-interneuron synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98:14708-13.
- Bargas J., Galarraga E., Aceves J. (1991). Dendritic activity on neostriatal neurons as inferred from somatic intracellular recordings. *Brain Res.* 539:159-63.
- Barral J., Galarraga E., Bargas J. (1999). Muscarinic presynaptic inhibition of neostriatal glutamatergic afferents is mediated by Q-type Ca²⁺ channels. *Brain Res Bull* 49: 285-9.
- Barral J., Toro S., Galarraga E., Bargas J. (2000). GABAergic presynaptic inhibition of rat neostriatal afferents is mediated by Q-type Ca(2+) channels. *Neurosci Lett* 283:1 33-6.
- Bear M.F. y Malenka R.C. (1994). Synaptic plasticity: LTP and LTD. *Curr. Opin. Neurobiol.* 4:389-99.
- Beierlein M., Gibson J.R., Connors B.W. (2000). A network of electrically coupled interneurons drives synchronized inhibition in neocortex. *Nat. Neurosci.* 3:904-10.
- Bennett M.R. (2000). The concept of long term potentiation of transmiión at synapses. *Progress in Neurobiology.* 60: 109-137.
- Bermudez-Rattoni, F y Prado Alcalá, R. (2001). Memoria: Dónde reside y cómo se forma. Cap.5 Ed. Trillas.
- Bi G.Q. y Poo M.M. (1998). Synaptic modifications in cultured hippocampal neurons: dependence on spike timing, synaptic strength, and postsynaptic cell type. *J. Neurosci.* 18:10464-72.
- Bliss T.V. y Collingridge G.L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature.* 361:31-9.
- Bliss T.V.P. y Lomo T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmiión in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. En: Synaptic plasticity and memory: An evaluation of the hypotesis. Martin, S.J., Grimwood P.D., Morris R.G.M. (2000). *Annu. Rev. Neurosci.* 23:649-711.

Bonansco Ch. y Buño W. (2003). Cellular mechanisms underlying the rhythmic bursts induced by NMDA microinjection at the apical dendrites of CA1 pyramidal neurons. *Hippocampus*. 13:150-163.

Buhl E.H., Halasy K., Somogyi P. (1994a). Diverse source of hippocampal unitary inhibitory postsynaptic potentials and the number of synaptic release sites. *Nature*. 368: 823-28.

Buhl E.H., Han Z.S., Lorinczi Z., Stezhka V.V., Karnup S.V., Somogyi P. (1994b). Physiological properties of anatomically identified axo-axonic cell in the rat hippocampus. *J. Neurophysiol.* 71: 1289-1307.

Buzsáki G. (1984). Feed-forward inhibition in the hippocampal formation. *Prog. Neurobiol.* 22:131-53.

Caillard O., Ben-Ari Y., Gaiarsa J-L. (1999). Long-term potentiation of GABAergic synaptic transmission in neonatal rat hippocampus. *J. Physiol.* 518.1: 109-119.

Caponga M., Gähwiler B.H., Thomson S.M. (1995). Presynaptic enhancement of inhibitory synaptic transmission by protein kinases A and C in the rat hippocampus *in vitro*.

Cauli B., Porter J.T., Tsuzuki K., Lambolez B., Rossier J., Quenet B. (2000). Classification of fusiform neocortical interneurons based on unsupervised clustering. *PNAS*. 97:6144-6149.

Chevalyere V. y Castillo P.E. (2003). Heterosynaptic LTD of hippocampal GABAergic synapses: a novel role of endocannabinoids in regulating excitability. *Neuron* 38:461-72.

Christie B.R. y Abraham W.C. (1994). Differential regulation of paired-pulse plasticity following LTP in the dentate gyrus. *Neuroreport* 5:385-8.

Christie B.R., Franks K.M., Seamans J.K., Saga K., Sejnowski T.J. (2000). Synaptic plasticity in morphologically identified CA1 stratum radiatum interneurons and giant projection cells. *Hippocampus*. 10:673-683.

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

Cohen A.S., Raymond C. R., Abraham W.C. (1998). Priming of long-term potentiation induced by activation of metabotropic glutamate receptors coupled to phospholipase C. *Hippocampus*. 8:160-170.

Cowan A.I., Stricker C., Reece L.J., Redman S.J. (1998). Long-term plasticity at excitatory synapses on aspiny interneurons in area CA1 lacks synaptic specificity. *J. Neurophysiol.* 79:13-20.

- Cummings J.A., Mulkey R.M., Nicoll R.A., Malenka R.C. (1996). Ca²⁺ signaling requirements for long-term depression in the hippocampus. *Neuron*. 16: 825-833.
- Davies SN, Lester RA, Reymann KG, Collingridge GL. (1989). Temporally distinct pre- and post-synaptic mechanisms maintain long-term potentiation. *Nature*. 338(6215):500-3.
- Dunwiddie T.V. y Haas H.L. (1985). Adenosine increases synaptic facilitation in the in vitro rat hippocampus: evidence for a presynaptic site of action. *J. Physiol.* 369:365-77.
- Fitzpatrick JS, Akopian G, Walsh JP. (2001) Short-term plasticity at inhibitory synapses in rat striatum and its effects on striatal output. *J Neurophysiol* 85:2088-2099.
- Flores-Hernandez J., Galarraga E., Bargas J. (1997). Dopamine selects glutamatergic inputs to neostriatal neurons. *Synapse*. 25:185-95.
- Freund T.F. (2003). Interneurons diversity series: Rhythm and mood in perisomatic inhibition. 26: 489-495.
- Freund T.F. y Buzsaki G. (1996). Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*. 6:347-470.
- Fricker D. y Miles R. (2001). Interneurons, spike timing, and perception. *Neuron*. 32: 771-4.
- Galarreta M. y Hestrin S. (1999). A network of fast-spiking cells in the neocortex connected by electrical synapses. *Nature* 402:72-5.
- Gibson J.R., Beierlein M., Connors B.W. (1999). Two networks of electrically coupled inhibitory neurons in neocortex. *Nature*. 402:75-9.
- Grunze H.C.R., Rainnie D.G., Hasselmo M.E., Barkai E., Hearn E.F., McCarley R.W., Greene R.W. (1996). NMDA-dependent modulation of CA1 local circuit inhibition. *J. Neurosci*. 16:2034-2043.
- Gulyas A.I., Miles R., Sik A., Toth K., Tamamaki N., Freund T.F. (1993). Hippocampal pyramidal cells excite inhibitory neurons through a single release site. *Nature*. 366:683-7.
- Gulyas A.I., Miles R., Hajos N., Freund T.F. (1993). Precision and variability in postsynaptic target selection of inhibitory cells in the hippocampal CA3 region. *Eur. J. Neurosci*. 5: 1729-51.
- Gupta A, Wang Y, Markram H. (2000). Organizing principles for a diversity of GABAergic interneurons and synapses in the neocortex. *Science*. 14;287(5451):273-8.

Hammond C. (1996). Synaptic plasticity. En: Cellular and Molecular Neurobiology. Ed. Hammond C. cap. 19. pp 618-651. Academic Press. Paris France.

Hebb D.O. (1949). The organization of behavior. Citado por Paulsen O. y Sejnowski T.J. (2000). Natural patterns of activity and long-term synaptic plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9:288-292.

Hernandez_Echeagaray E., Galarraga E., Bargas J. (1998). 3-Alpha-chloro-imperialine, a potent blocker of cholinergic presynaptic modulation of glutamatergic afferents in the rat neostriatum. *Neuropharmacology.* 37:1493-502.

Hollrigel, G.S., Morris R.J., Soltesz I. (1998). Enhanced bursts of IPSCs in dentate granule cell in mice with regionally inhibited long-term potentiation. *Proc. R. Soc. Lond.* 265:63-69.

Horikawa K. y Armstrong W.E. (1998). A versatile of intracellular labeling: injection of biocytin and its detection whit avidin conjugates. *J. of Neurosci. Methods.* 25. 1-11.

Hyman J.M., Wyble B.P., Goyal V., Rossi Ch.A., Hasselmo M.E. (2003). Stimulation in hippocampal region CA1 in behaving rats yields long-term potentiation when delivered to the peak of theta and long-term depression when delivered to the trough. *J. of Neurosci.* 23: 11725-11731.

Kamondi A., Acsady L., Buzsaki G. (1998). Dendritic spikes are enhanced by cooperative network activity in the intact hippocampus. *J. Neurosci.* 18: 3919-28.

Kandel E.R. y Schwartz J.H. (1982). Molecular biology of learning: modulation of transmitter release. *Science.* 218:433-43.

Kandel E.R. (2000). Cellular mechanisms of learning and the biological basis of individuality. En: Principles of neural science, eds, Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessell T. M. 4ª ed. cap. 63 . pp 1247-1279. McGraw-Hill. New York.

Kandel E.R., Kupfermann I., Iversen S. (2000). Learning and memory. En: Principles of neural science, eds, Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessell T. M. 4ª ed. cap. 62 . pp 1227-1246. McGraw-Hill. New York.

Kawaguchi Y. (1993). Physiological, morphological, and histochemical characterization of three classes of interneurons in rat neostriatum. *J Neurosci.* Nov;13:4908-23.

Kawaguchi Y, y Kondo S. (2002). Parvalbumin, somatostatin and cholecystokinin as chemical markers for specific GABAergic interneuron types in the rat frontal cortex. *J Neurocytol.* Mar-Jun;31(3-5):277-87. Review.

Kawaguchi Y. y Kubota Y. (1993). Correlation of physiological subgroupings of nonpyramidal cells with parvalbumin- and calbindinD28k-immunoreactive neurons in layer V of rat frontal cortex. *J. Neurophysiol.* 70:387-96.

Kawaguchi Y, Wilson CJ, Augood SJ, Emson PC. 1995 Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends Neurosci.* Dec;18(12):527-35. Review. Erratum in: *Trends Neurosci* 1996 Apr;19(4):143.

Klausberger T., Magill P.J., Márton L.F., Robertis J.D. B., Cobden Ph.M., Buzsáki G., Somogyi, P. (2003). Brain -state- and cell-type-specific firing of hippocampal interneurons *in vivo*. *Nature.* 421:844-799.

Klausberger T, Marton LF, Baude A, Roberts JD, Magill PJ, Somogyi P. (2003). Spike timing of dendrite-targeting bistratified cells during hippocampal network oscillations *in vivo*. *Nat Neurosci.* 7(1):41-7.

Kleschevnikov A.M., Sokolov M.V., Kuhnt U., Dawe G.S., Stephenson J.D., Voronin L.L. (1997). Changes in paired-pulse facilitation correlate with induction of long-term potentiation in area CA1 of rat hippocampal slices. *Neurosci.* 76:829-843.

Konorski J. (1948). Conditioned Reflexes and Neuron Organization. En: Principles of neural science, eds, Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessell T. M. (2000) 4^a ed. cap. 2. p 34. McGraw-Hill. New York.

Komatsu Y. y Yoshimura Y. (2000). Activity-dependent maintenance of long-term potentiation at visual cortical inhibitory synapses. *J. Neurosci.* 20:7539-7546.

Kubota Y, Kawaguchi Y. (1994). Three classes of GABAergic interneurons in neocortex and neostriatum. *Jpn J Physiol.*;44 Suppl 2:S145-8.

Kubota Y, Kawaguchi Y. (2000). Dependence of GABAergic synaptic areas on the interneuron type and target size. *J Neurosci.* Jan 1;20(1):375-86.

Kubota Y, Kawaguchi Y. 1997 Two distinct subgroups of cholecystokinin-immunoreactive cortical interneurons. *Brain Res.* Mar 28;752(1-2):175-83.

Kuhnt U. and Voronin L.L. (1994). Interaction between paired-pulse facilitation and long-term potentiation in area CA1 of guinea pig hippocampal slices : application of quantal analysis. *Neurosci.* 62:391-397.

Kullmann D.M., Perkel D.J., Manabe T., Nicoll R.A. (1992). Ca²⁺ entry via postsynaptic voltage-sensitive Ca²⁺ channels can transiently potentiate excitatory synaptic transmission in the hippocampus. *Neuron* 9:1175-83.

Lacaille J.C. (1991). Postsynaptic potentials mediated by excitatory and inhibitory amino acids in interneurons of stratum pyramidale of the CA1 region of rat hippocampal slices in vitro. *J. Neurophysiol.* 66:1441-54.

Larkman A.U. y Jack J.J. (1995). Synaptic plasticity: hippocampal LTP. *Current Opinion in Neurobiology.* 5:324-334.

Lorente de Nó R. (1934). Studies on the structure of the cerebral cortex-II. Continuation of the study of the ammonic system. *J. Psychol. Neurol.* 46:113-177.

Lovinger D.M., Wong K.L., Murakami K., Routtenberg A. (1981). Protein kinase C inhibitors eliminate hippocampal long-term potentiation. *Brain Res.* 436:177-183.

Lu Y.M., Mansuy I.M., Kandel E.R., Roder J. (2000). Calcineurin-mediated LTD of GABAergic inhibition underlies the increased excitability of CA1 neurons associated with LTP. *Neuron.* 26:197-205.

Lynch G.S., Dunwiddie T., Gribkoff V. (1977). Heterosynaptic depression: a postsynaptic correlate of long-term potentiation. En: Synaptic plasticity and memory: An evaluation of the hypothesis. Martin, S.J., Grimwood P.D., Morris R.G.M. (2000). *Annu. Rev. Neurosci.* 23:649-711.

Lynch G, Halpain S, Baudry M. (1982). Effects of high-frequency synaptic stimulation on glutamate receptor binding studied with a modified in vitro hippocampal slice preparation. *Brain Res.* 244(1):101-11.

Maccaferri G. y McBain C.J. (1996). Long-term potentiation in distinct subtypes of hippocampal nonpyramidal neurons. *J. Neurosci.* 16:5334-43.

Maccaferri G., Roberts J.D., Szucs P., Cottingham C.A., Somogyi P. (2000). Cell surface domain specific postsynaptic currents evoked by identified GABAergic neurones in rat hippocampus in vitro. *J. Physiol.* 524:91-116.

Magee J.C. y Johnston D. (1997). A synaptically controlled, associative signal for Hebbian plasticity in hippocampal neurons. *Science.* 275:209-13.

Malenka R.C., Kauer J.A., Perkel D.J., Nicoll R.A. (1989a). The impact of postsynaptic calcium on synaptic transmission-its role in long-term potentiation. *Trends Neurosci.* Nov 12:444-50.

Malenka R.C. Kauer J.A., Perkel D.J., Mauk M.D., Kelly P.T., Nicoll R.A., Waxman M.N. (1989b). An essential role for postsynaptic calmodulin and protein kinase activity in long-term potentiation. *Nature.* 340:554-557.

Malenka R.C., Kauer J.A., Zucker R.S., Nicoll R.A. (1988). Postsynaptic calcium is sufficient for potentiation of hippocampal synaptic transmission. *Science* 242:81-4.

Malenka R.C., Madison D.V., Nicoll R.A. (1986). Potentiation of synaptic transmission in the hippocampus by phorbol esters. *Nature*. 321: 175-7.

Malenka R.C. y Nicoll R.A. (1993). NMDA-receptor-dependent synaptic plasticity: multiple forms and mechanisms. *Trends Neurosci* 16:521-7.

Markram H., Lubke J., Frotscher M., Sakmann B. (1997). Regulation of synaptic efficacy by coincidence of postsynaptic APs and EPSPs. *Science* 275:213-5.

Markram H., Wang Y., Tsodyks M. (1998). Differential signaling via the same axon of neocortical pyramidal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95:5323-5328.

Martin S.J., Grimwood P.D., Morris G.M. (2000). Synaptic plasticity and memory: An evaluation of the hypothesis. *Annu. Rev. Neurosci.* 23: 649-711.

McBain C.J. (1995). Hippocampal inhibitory neuron activity in the elevated potassium model of epilepsy. *J. Neurophysiol.* 73: 2853-63.

McBain C.J., DiChiara T.J., Kauer J.A. (1994). Activation of metabotropic glutamate receptors differentially affects two classes of hippocampal interneurons and potentiates excitatory synaptic transmission. *J. Neurosci.* 14:4433-45.

McBain CJ, Freund TF y Mody I (1999) Glutamatergic synapses onto hippocampal interneurons: precision timing without lasting plasticity. *Trends Neurosci.* 22: 228-235

McNaughton B.L. (1982). Long-term synaptic enhancement and short-term potentiation in rat fascia dentata act through different mechanisms. *J. Physiol.* 324:249-62.

Misgeld U., Sarvey J.M., Klee M.R. (1979). Heterosynaptic postactivation potentiation in hippocampal CA 3 neurons: long-term changes of the postsynaptic potentials. *Exp. Brain. Res.* 37:217-29.

Morishita W. y Sastry B.R. (1991). Chelation of postsynaptic Ca²⁺ facilitates long-term potentiation of hippocampal IPSPs. *Neuroreport* 2:533-6.

Miles R, Toth K, Gulyas AI, Hajos N, Freund TF. (1996) Differences between somatic and dendritic inhibition in the hippocampus. *Neuron* 16: 815-23.

Mulkey R.M., Herron C.E., Malenka R.C. (1993). An essential role for protein phosphatases in hippocampal long-term depression. *Science*. 261:1051-5.

Mulkey R.M. y Malenka R.C. (1992). Mechanisms underlying induction of homosynaptic long-term depression in area CA1 of the hippocampus. *Neuron* 9:967-75.

Musleh W.Y., Shahi K., Baudry M. (1993). Further studies concerning the role of nitric oxide in LTP induction and maintenance. *Synapse*. 13:370-375.

Parnass Z., Tashiro A., Yuste R. (2000). Analysis of spine morphological plasticity in developing hippocampal pyramidal neurons. *Hippocampus*. 10:561-568.

Parra P., Gulyas A.I., Miles R. (1998). How many subtypes of inhibitory cells in the hippocampus? *Neuron*. 20: 983-93.

Patenaude C., Chapman C.A., Bertrand S., Congar P., Lacaille J-C. (2003). GABAB receptor- and metabotropic glutamate receptor-dependent cooperative long-term potentiation of rat hippocampal GABA_A synaptic transmission. *J. Physiol.* 553.1: 155-167.

Paulsen O. y Moser E.I. (1998). A model of hippocampal memory encoding and retrieval: GABAergic control of synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* 21: 273-8.

Perez Y., Morin F., Lacaille J.C. (2001). A Hebbian form of long-term potentiation dependent on mGluR1a in hippocampal inhibitory interneurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:9401-6.

Pitler T.A. y Alger B.E. (1994). Depolarization-induced suppression of GABAergic inhibition in rat hippocampal pyramidal cells: G protein involvement in a presynaptic mechanism. *Neuron*. 13: 1447-55.

Pouille F. y Scanziani M. (2001). Enforcement of temporal fidelity in pyramidal cells by somatic feed-forward inhibition. *Science*. 293:1159-1163.

Ouardouz M., y Lacaille J.C. (1995). Mechanisms of selective long-term potentiation of excitatory synapses in stratum oriens/alveus interneurons of rat hippocampal slices. *J. Neurophysiol.* 73: 810-9.

Ramón y Cajal S. 1937. 1852-1937. *Recollections of My Life*. En: Principles of neural science, eds, Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessell T. M. (2000) 4^a ed. cap. 2. p 34. McGraw-Hill. New York.

Schulz P.E., Cook E.P. and Johnson D. (1994). Changes in paired-pulse facilitation suggest presynaptic involvement in long-term potentiation. *J. Neurosci.* 14:5325-5337.

Shepherd G.M. (1994). Learning and memory. En: Neurobiology. Edds. Shepherd G.M. y Phil M.D.D. 3a ed.pp 415-441. Oxford University Press Inc.

Shew T., Yip S., Sastry B.R. (2000). Mechanisms involved in tetanus-induced potentiation of fast ipsp in rat hippocampal CA1 neurons. *J. Neurophysiol.* 83: 3388-3401.

Sik A., Penttonen M., Ylinen A., Buzsaki G. (1995). Hippocampal CA1 interneurons: an in vivo intracellular labeling study. *J. Neurosci.* 15: 6651-65.

Silva AJ, Paylor R, Wehner JM, Tonegawa S. (1992). Impaired spatial learning in alpha-calmodulin kinase II mutant mice. *Science.* 257:206-11.

Silva AJ, Rosahl TW, Chapman PF, Marowitz Z, Friedman E, Frankland PW, Cestari V, Cioffi D, Sudhof TC, Bourchouladze R. (1996). Impaired learning in mice with abnormal short-lived plasticity. *Curr Biol.* 6(11):1509-18.

Soderling T.R., y Derkach V.A. (2000). Postsynaptic protein phosphorylation and LTP. *Trends Neurosci.* 23:75-80.

Somogyi P., Hodgson A.J., Smith A.D., Nunzi M.G., Gorio A., Wu J.Y. (1984). Different populations of GABAergic neurons in the visual cortex and hippocampus of cat contain somatostatin- or cholecystokinin-immunoreactive material. *J. Neurosci.* 4: 2590-603.

Somogyi P., Kisvarday Z.F., Freund T.F., (1984). Cowey A Characterization by Golgi impregnation of neurons that accumulate 3H-GABA in the visual cortex of monkey. *Exp Brain Res* 53:295-303.

Somogyi P., Tamas G., Lujan R., Buhl E.H. (1998). Salient features of synaptic organisation in the cerebral cortex. *Brain Res Rev.* 26: 113-35.

Squire L.R. (1992). Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychol. Rev.* 99: 195-231.

Staff N.P. y Spruston N. (2003). Intracellular correlate of epep-spike potentiation in CA1 pyramidal neurons in controlled by GABAergic modulation. *Hippocampus.* 13:1-5.

Steele P.M. y Mauk M.D. (1999). Inhibitory control of LTP and LTD: stability of synapse strength. *J. Neurophysiol* 81:1559-66.

Stelzer A., Simon G., Kovacs G., Rai R. (1994). Synaptic disinhibition during maintenance of long-term potentiation in the CA1 hippocampal subfield. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:3058-62.

Stuart G.J. y Sakmann B. (1994). Active propagation of somatic action potentials into neocortical pyramidal cell dendrites. *Nature* 367:69-72.

Swanson L.W., Teyler T.J. Thompson R.F. (1982). Hippocampal long-term potentiation mechanisms and implications for memory. *Neurosciences Research Program Bulletin*. 20: 613-769.

Thomson A.M., West D.C., Hahn J., Deuchars J. (1996). Single axon IPSPs elicited in pyramidal cells by three classes of interneurons in slices of rat neocortex. *J. Physiol* 496:81-102.

Toth K. y Freund T.F. (1992). Calbindin D28k-containing nonpyramidal cells in the rat hippocampus: their immunoreactivity for GABA and projection to the medial septum. *Neuroscience*. 49:793-805.

Voronin L.L. and Kuhnt U. (1990). Long-term potentiation affects facilitation ratio of EPSPs recorded from ZA1 pyramidal cells in the guinea pig hippocampal slice. *Neurosci. Res. Común*. 6:149-155.

Wigstrom H. y Gustaffson B. (1983). Facilitated induction of hippocampal long lasting potentiation during blockade of inhibition. *Nature*. 301:603-604.

Xie Z., Yip S., Morishita W., Sastry B.R. (1995). Tetanus-induced potentiation of inhibitory postsynaptic potentials in hippocampal CA1 neurons. *Can. J. Physiol. Pharmacol*. 73:1706-13.

Xie Z., y Sastry B.R. (1991). Inhibition of protein kinase activity enhances long-term potentiation of hippocampal IPSPs. *Neuroreport*.2:389-92.

Zhang S., Ehlers M.D., Bernhardt J.P., Su C.T., Huganir R.L. (1998). Calmodulin mediates calcium-dependent inactivation of N-methyl-D-aspartate receptors. *Neuron* 21:443-53.