



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGIA

**PARTICIPACIÓN DE LOS ASTROCITOS EN EL DESARROLLO DE LA
POTENCIACIÓN DE LA TRANSMISIÓN SINÁPTICA INDUCIDA POR NICOTINA
EN EL HIPOCAMPO DE LA RATA**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
MONICA ANDREA LOPEZ HIDALGO

DIRECTOR DE TESIS
DR. JOSE JESUS GARCIA COLUNGA
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGIA
COMITÉ TUTOR
DRA. ELVIRA GALARRAGA PALACIO
INSTITUTO DE FISIOLOGIA CELULAR
UNAM
DR.HUGO MERCHANT NANCY
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGIA

QUERÉTARO, QRO. FEBRERO DE 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT por el apoyo que me brindó para realizar mis estudios de Doctorado en el Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México. No de becario: 213708

Este trabajo fue financiado por los proyectos CONACyT (81911 y 128259) y el proyecto DGAPA-UNAM (IN204809)

RESUMEN

A pesar de que los efectos de la nicotina (la principal sustancia adicta del tabaco) sobre la función cerebral ha sido estudiada por más de 100 años, sus efectos han sido hasta ahora explicados con base en la activación de receptores para acetilcolina de tipo nicotínicos presentes en las neuronas. Sin embargo, es ahora clara una comunicación bidireccional entre las neuronas y las células gliales, en donde estas últimas son capaces de liberar sustancias neuroactivas (gliotransmisores) en respuesta a la actividad neuronal. En este sentido, el hecho de que los astrocitos (un tipo de célula glial) expresen receptores nicotínicos funcionales abre la posibilidad de que estas células pudieran estar mediando los efectos de la nicotina sobre la plasticidad sináptica. En el presente trabajo, nosotros mostramos primero que la gliotoxina fluoroacetato es capaz de disminuir las respuestas de Ca^{2+} (el principal tipo de excitabilidad en los astrocitos) provocadas por la administración de ATP o nicotina en astrocitos en cultivo. Con el fin de analizar el papel de los astrocitos en los efectos de la nicotina, caracterizamos el incremento de larga duración en la transmisión sináptica inducido por nicotina en rebanadas de hipocampo, revelando así un papel crucial de los receptores NMDA. En concordancia con esta, esta potenciación fue bloqueada cuando se administró una enzima que degrada la D-serina endógena (un gliotransmisor que actúa como un co-agonista de los receptores NMDA) o por la acción de un antagonista del sitio de unión a la D-serina en los receptores NMDA. De manera interesante, el incremento en la transmisión sináptica inducida por nicotina no se observó cuando el fluoroacetato fue administrado y restaurado con la administración de D-serina exógena. Nuestros resultados nos permiten concluir que la D-serina liberada por los astrocitos hipocámpales es un elemento esencial para que la nicotina modifique la transmisión

sináptica, lo que abre la posibilidad de que los astrocitos puedan ser utilizados como blancos terapéuticos en el diseño de nuevos fármacos para modificar la función cerebral.

SUMMARY

Although the effects of nicotine (the main addictive substance of tobacco) on the brain function have been studied for more than 100 years, its effects have been explained due to its ability to activate nicotinic acetylcholine receptors presented in neurons. However, it is now evident a dynamic, bi-directional glia-neuron communication, in which glial cells take up and release transmitters (gliotransmisores) in response to neuronal activity. In this sense, the fact that astrocytes (a type of glial cell) express functional nicotinic receptors raise the possibility that these cells could be involved in the nicotine effects on synaptic plasticity. In the present work, we showed first that the gliotoxin fluoroacetate is able to decrease Ca^{2+} responses (the main type of astrocytic excitability) evoked by ATP or nicotine in hippocampal astrocytic cultures. In order to analyze the role of astrocytes in nicotine effects in hippocampal slices, we characterized the long-term enhancement of synaptic transmission induced by nicotine, revealing a dependence on the NMDA receptor activity. Here, we report that the synaptic plasticity induced by nicotine was annulled by an enzyme that degrades endogenous D-serine (a gliotransmitter acting as a co-agonist of NMDA receptors), or by an NMDA receptor antagonist that acts at the D-serine binding site. Accordingly, the enhancement of synaptic transmission by nicotine was blocked when fluoroacetate was perfused, and restored with exogenous D-serine. Together, these results show that glial D-serine is essential for the long-term effects of nicotine on synaptic plasticity and raise the possibility that these cells could be possible therapeutic targets to impact the brain and its complex manifestations.

ÍNDICE

RESUMEN	III
SUMMARY	V
1. ANTECEDENTES	1
1.1 Células gliales, más que simples elementos de sostén.	1
1.2 Astrocitos, las estrellas del sistema nervioso central.	1
1.2.1 Función de los astrocitos en la sinapsis tripartita en la región CA1 del hipocampo.	4
1.2.2 Función de los astrocitos en la plasticidad sináptica en la región CA1 del hipocampo.	7
1.2.3 Los receptores muscarínicos en los astrocitos median los efectos de la acetilcolina sobre la transmisión sináptica en el hipocampo.	9
1.3 Efectos de la nicotina sobre la transmisión sináptica en la región CA1 del hipocampo.	9
2. HIPÓTESIS	12
3. OBJETIVO GENERAL	12
4. OBJETIVOS PARTICULARES	12
5. METODOLOGÍA	13
5.1 Cultivo de astrocitos de la región CA1 del hipocampo	13
5.2 Registro de las variaciones de la concentración de Ca^{2+} intracelular	14
5.3 Cuantificación de la liberación de D-serina glial	15
5.4 Obtención de rebanadas de hipocampo	15
5.5 Registro electrofisiológico	16
5.6 Administración de fármacos	16
5.7 Análisis de datos	17
6. RESULTADOS	19
6.1 Efecto del fluoroacetato sobre las respuestas de Ca^{2+} inducidas por ATP.	19
6.2 Efecto del fluoroacetato sobre la liberación de D-serina inducida por ATP	21

6.3 Efecto del fluoroacetato sobre las respuestas de Ca^{+2} inducidas por nicotina.	22
6.4 La nicotina potencia la transmisión sináptica en la región CA1 del hipocampo	24
6.5 Los receptores NMDA son necesarios para los efectos de larga duración producidos por la nicotina.	26
6.6 Las células gliales son necesarias para la inducción de los incrementos de la transmisión sináptica producidos por nicotina.	28
6.7 La D-serina glial es esencial en los efectos de la nicotina sobre la transmisión sináptica.	30
6.8 La potenciación de larga duración producida por estimulación eléctrica también depende de la D-serina glial	32
 7. DISCUSIÓN	 34
7.1 El fluoroacetato como una herramienta para interferir con las respuestas de Ca^{+2} de los astrocitos.	34
7.2 La D-serina glial como elemento indispensable en los procesos de plasticidad sináptica producidos por nicotina.	36
7.3 Perspectivas en la terapéutica de condiciones patológicas	42
 8. BIBLIOGRAFÍA	 44
9. López-Hidalgo, M., Salgado-Puga, K., Alvarado-Martínez, R., Medina, A. C., Prado-Alcalá, R., García-Colunga, J. (2012) Nicotine Uses Neuron-Glia Communication to Enhance Hippocampal Synaptic Transmission and Long-term Memory. PLoS ONE 7 (11): e49998.	

1. ANTECEDENTES

1.1 Células gliales, más que simples elementos de sostén.

Desde principios del siglo XIX, con el surgimiento de la teoría neuronal, se ha afirmado que son las neuronas los principales elementos celulares que componen al sistema nervioso. Además, el sistema nervioso central (SNC, cerebro y médula espinal) contiene 50 veces más células gliales que neuronas (Tekkök y Ransom, 2004). Sin embargo, los neurocientíficos han considerado tradicionalmente a estas células como simples aisladores físicos y químicos encargadas del mantenimiento de las neuronas (Tekkök y Ransom, 2004).

Las células gliales se pueden clasificar en dos tipos, la microglía y la macroglía. Las células de la microglía se encargan principalmente de las funciones inmunológicas del SNC. Por su parte, la macroglía está compuesta por las células ependimarias (las cuales se encuentran revistiendo los ventrículos del encéfalo y la medula espinal), los oligodendrocitos y células de Schwann, (encargadas de la mielinización de los axones), y los astrocitos (Fields y Stevens-Graham, 2002; Tekkök y Ransom, 2004) cuyas funciones se discutirán más adelante.

1.2 Astrocitos, las estrellas del sistema nervioso central.

A pesar de la dificultad en la definición de los astrocitos, estos pueden ser clasificados de acuerdo a sus características morfológicas como son: el tamaño de su cuerpo celular (alrededor de 10 μm) y localización, morfología, propiedades electrofisiológicas y la expresión de ciertos genes como la proteína ácido glial fibrilar (GFAP) o proteínas de unión a Ca^{2+} como la S100 β (Nedergaard et al., 2003; Nimmerjahn, 2009).

En el SNC podemos encontrar diferentes tipos de astrocitos, por ejemplo, en la sustancia gris están los astrocitos protoplásmicos; en la sustancia blanca los fibrosos; en la retina y cerebelo, los radiales; en el cerebelo y el bulbo olfatorio los astrocitos velados; y de manera interesante, los astrocitos intralaminares, que aparecen por primera vez en la escala filogenética en la corteza de los primates (Sulston et al., 1983; Nimmerjahn, 2009). Así, tomando en cuenta la diversidad de funciones que llevan a cabo estas células en las diferentes estructuras del SNC, una definición funcional del

término astrocito es difícil de establecerse. El concepto tradicional de los astrocitos se relaciona siempre con la función de servicio a las neuronas (regular y optimizar el ambiente que rodea a las neuronas vecinas); algunas de estas funciones incluyen la regulación del pH, el balance iónico, la remoción de desechos neuronales, la provisión de glucosa, entre muchos otros (Largo et al., 1996; Kreft et al., 2012). Sin embargo, la importancia de los astrocitos en el funcionamiento del sistema nervioso se evidencia cuando se analiza la proporción de astrocitos por neuronas en diferentes especies de invertebrados y vertebrados. En este sentido, en *C. elegans* las neuronas superan a los astrocitos 6:1 (Sulston et al., 1983); en roedores, como las ratas y ratones, la proporción de astrocitos por neurona aumenta (1:3); y en primates como los humanos se invierte (1.3 astrocitos por neurona) (Bass et al., 1971). Debido a que los requerimientos metabólicos de la neuronas no han cambiado mucho a lo largo de la evolución, esta expansión en el número de astrocitos por neurona no puede explicarse con las funciones tradicionalmente atribuidas a estas células (Nedergaard et al., 2003). Estos hallazgos sugirieron que la complejidad de los circuitos sinápticos así como la emergencia de funciones cognitivas requerían de la presencia de astrocitos para llevarse a cabo.

De particular importancia ha sido el estudio de la función de los astrocitos en la sustancia gris. Aquí, los astrocitos rodean una gran proporción de sinapsis (**Fig. 1**) de las cuales el 90% son glutamatérgicas (Magistretti, 2006). El porcentaje de sinapsis rodeadas por astrocitos (llamadas sinapsis tripartita) varía según la estructura cerebral y el tipo celular. Así, mientras en el hipocampo cerca del 60% de las sinapsis están rodeadas por astrocitos (Ventura y Harris, 1999; D'Antoni et al., 2008; Haydon et al., 2009; Kirischuk et al., 2012), en el cerebelo, el 67% de las fibras paralelas y el 94% de las fibras trepadoras están rodeadas por un astrocito. En el hipocampo los astrocitos muestran dominios claramente definidos en donde pueden hacer contacto con más de 100,000 sinapsis (Bushong et al., 2002). La pregunta que surge en este sentido es ¿cuál es la función que cumplen los astrocitos en las sinapsis? Si analizamos los astrocitos hipocámpales, llama la atención la gran variedad de transportadores, canales iónicos y receptores que expresan en su membrana plasmática (**Fig. 2**) lo que les permite detectar cambios en la composición del líquido extracelular.

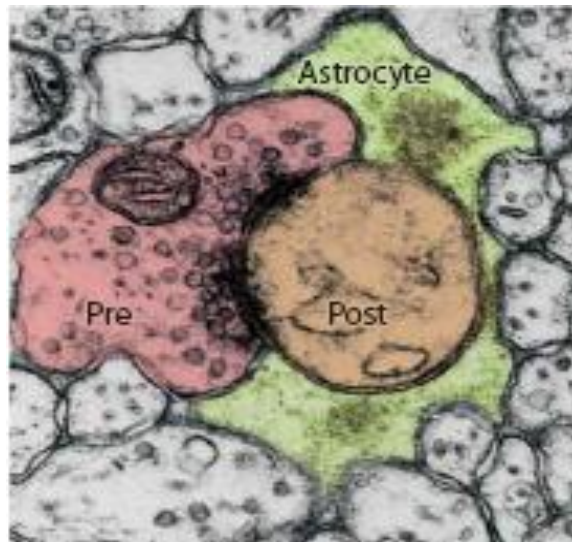


Figura 1. Microfotografía de la interacción entre los astrocitos y las neuronas en la región CA1 del hipocampo. Los astrocitos rodean con sus ramificaciones las sinapsis hipocámpales. Modificado de Peters, 1991.

A pesar de la expresión de canales iónicos de Na^+ , Ca^{+2} y K^+ (D'Antoni et al., 2008; Haydon et al., 2009; Kirischuk et al., 2012), los astrocitos no son capaces de generar potenciales de acción (Laming et al., 2000) (una de las razones por las que fueron consideradas como elementos pasivos). Sin embargo, con el surgimiento de las técnicas de imagen y su uso en la visualización de los cambios en la concentración del Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), quedó claro que los astrocitos no son entes pasivos. Más aún, responden a la presencia de sustancias endógenas (neurotransmisores) y exógenas (cocaína, nicotina, etc.) con incrementos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, su principal tipo de excitabilidad, y la subsecuente liberación de sustancias neuroactivas como óxido nítrico, glutamato, ATP, D-serina, entre otros (Bezzi et al., 1998; Coco et al., 2003; Ikeda y Murase, 2004; Mothet et al., 2006). Estas sustancias denominadas gliotransmisores, pueden entonces modificar la transmisión sináptica, plasticidad neuronal y contribuir así en el funcionamiento de los circuitos neuronales.

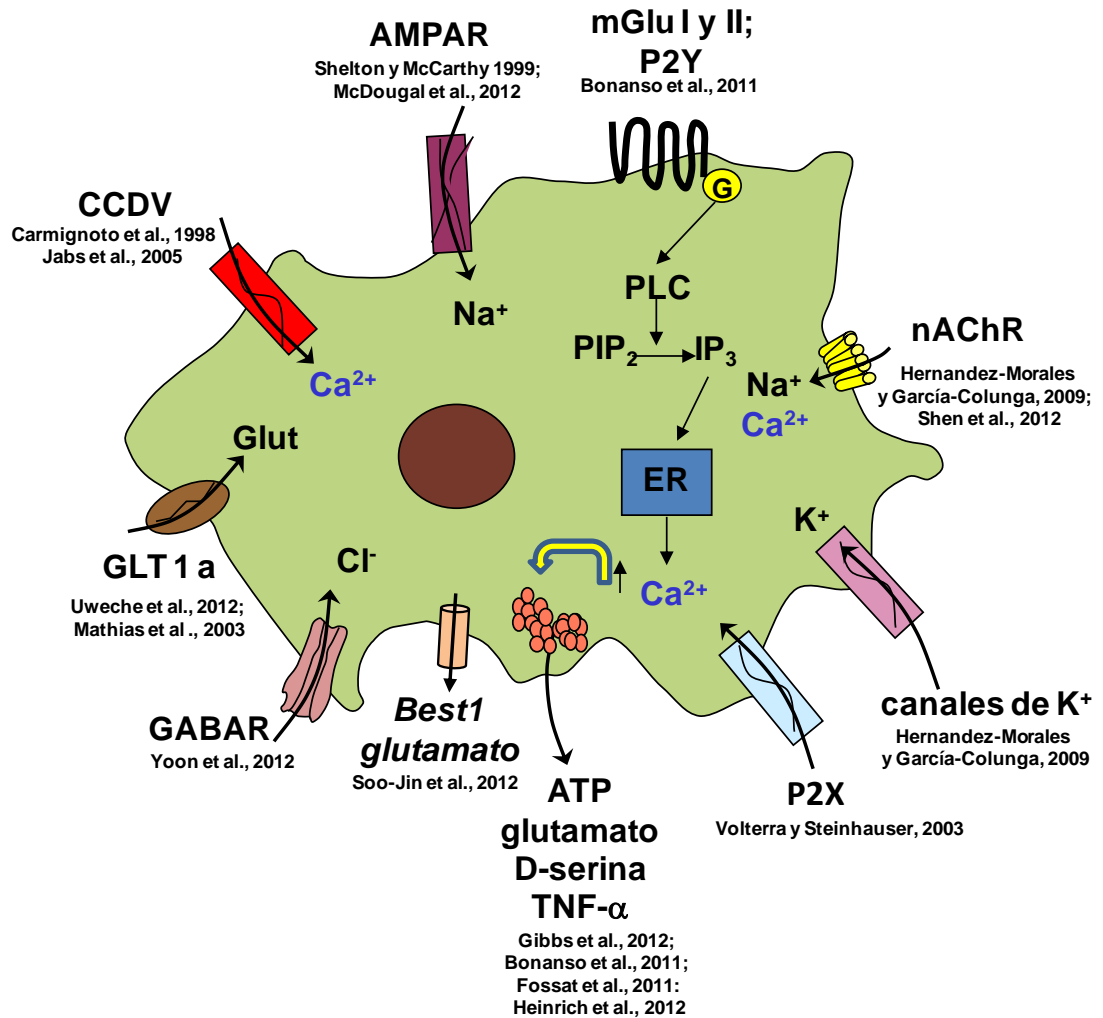


Figura 2. Los astrocitos de la región CA1 del hipocampo expresan una gran variedad de receptores y canales que le permiten detectar cambios en su medio extracelular. Receptores AMPA (AMPA); receptores metabotrópicos glutamatérgicos (mGlu I y II) y purinérgicos (P2Y); receptores para acetilcolina de tipo nicotínicos (nAChR); canales iónicos de K⁺, de Ca²⁺ (CCDV), receptores ionotrópicos purinérgicos (P2X) y GABAérgicos (GABAR). La activación de estos receptores de membrana pueden llevar al aumento en los niveles de Ca²⁺ intracelular producido por la entrada de Ca²⁺ por canales iónicos, por canales activados por ligando o bien por la liberación de los reservorios intracelulares. Los aumentos en el Ca²⁺ intracelular puede producir la liberación de gliotransmisores en un proceso de exocitosis o a través de hemicanales (*Best1*).

1.2.1 Función de los astrocitos en la sinapsis tripartita en la región CA1 del hipocampo.

Uno de los trabajos pioneros en el estudio de las interacciones astrocito-neurona fue realizado por Parpura y cols. en 1994. En este trabajo demostraron que la estimulación eléctrica de las colaterales de Schaffer producía un incremento en la

[Ca²⁺]_i en astrocitos vecinos en respuesta a la activación de receptores glutamatérgicos metabotrópicos presentes en los astrocitos. Los astrocitos activados pueden liberar gliotransmisores que pueden actuar sobre receptores presinápticos, postsinápticos y extrasinápticos, modificando así la transmisión sináptica en esta región (Araque et al., 1999; Jourdain et al., 2007; Olié y Mothet, 2009). A esta comunicación bidireccional que se establece entre los astrocitos y las neuronas que se establece en las sinapsis tripartitas, han sido mejor estudiadas estas interacciones celulares es en el hipocampo, en particular en la región CA1 del hipocampo. Una inmunohistoquímica dirigida para identificar a las neuronas y astrocitos nos permite visualizar la abundancia de estos últimos (y sus proyecciones) así como su localización casi restringida en el *stratum radiatum* (**Fig. 3**), que es precisamente el lugar en donde se establecen los contactos sinápticos entre las colaterales de Schaffer (proyecciones glutamatérgicas de las neuronas principales de la región CA3) y las piramidales de CA1.

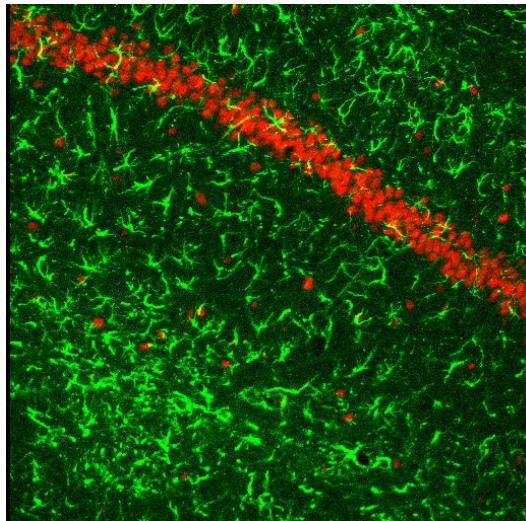


Figura 3. Identificación de la localización de los astrocitos y neuronas en la región CA1 del hipocampo de la rata. Los astrocitos se muestran en verde (células GFAP+), mientras que las neuronas se observan en rojo (NeuN+). Nótese que las neuronas se encuentran principalmente restringidas a la capa piramidal mientras que los astrocitos se localizan por arriba (*stratum oriens*) y por debajo de la piramidal (*stratum radiatum*).

En la región CA1 del hipocampo, las neuronas piramidales expresan receptores glutamatérgicos metabotrópicos así como ionotrópicos. La transmisión sináptica basal

depende en su mayoría de la activación de receptores AMPA/Kainato, debido a que estos canales poseen una gran afinidad al glutamato y a su alta probabilidad de apertura (Wollmuth y Sobolevsky, 2004). Debido a las subunidades que forman estos receptores, son permeables principalmente a Na^+ pero no a Ca^{2+} (Wollmuth y Sobolevsky, 2004; Kullmann y Lamsa, 2007). Además de los receptores AMPA/Kainato, estas neuronas presentan receptores NMDA los cuales son permeables Na^+ , K^+ y principalmente Ca^{2+} . Para que estos receptores se activen, además de requerir de la presencia de glutamato en la hendidura sináptica, es necesario que al mismo tiempo ocurran dos eventos, una despolarización de la membrana con el fin de remover el Mg^{2+} que se encuentra bloqueando el poro de estos receptores (Dingledine et al., 1999; Wollmuth y Sobolevsky, 2004) y que esté presente un co-agonista (glicina o D-serina) en su sitio de unión (**Fig. 4**). Estas particularidades le confieren a estos receptores la capacidad de actuar como detectores de la coincidencia de la actividad pre y postsináptica por lo que participan de manera importante en prácticamente todos los procesos de plasticidad sináptica en esta región (Malenka y Nicoll, 1993; Kullmann y Lamsa, 2007; Citri y Malenka, 2008).

Los astrocitos de la región CA1 del hipocampo tienen la capacidad de liberar tanto glutamato como D-serina (Bezzi et al., 1998; Mothet et al., 2000; Angulo et al., 2004; Henneberger et al., 2010) por lo que no es de extrañar que se encuentren involucrados en la transmisión sináptica basal y más aún en la plasticidad sináptica.

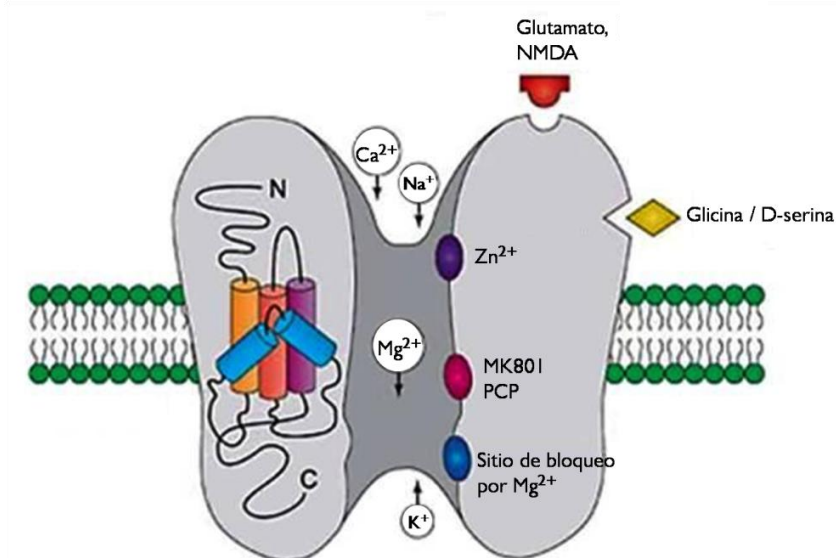


Figura 4. Esquema del receptor glutamatérgico tipo NMDA. Se muestran los sitios de unión al agonista (glutamato o NMDA), al co-agonista (glicina o D-serina), el bloqueo del poro por la interacción con el Mg^{2+} , la modulación de sustancias como el Zn^{2+} , así como la permeabilidad por cationes como el Na^+ y Ca^{+2} . Modificado de Smith, 2002.

1.2.2 Función de los astrocitos en la plasticidad sináptica en la región CA1 del hipocampo.

El término de plasticidad sináptica fue propuesto a mediados del siglo XX por el psicólogo Jerzy Konorski y retomado un año después por Donald Hebb. De manera general, se establece que la activación persistente de las neuronas presinápticas produce cambios metabólicos tanto en las neuronas pre como postsinápticas, que conlleva a un cambio en la eficiencia sináptica. En particular, las sinapsis del hipocampo tienen una gran capacidad de responder a patrones específicos de activación por lo que son altamente plásticas. En este sentido, Bliss y Gardner-Medwin (1973), fueron los primeros en describir un incremento en la transmisión sináptica en el hipocampo producido por una estimulación eléctrica de alta frecuencia (HFS, por sus siglas en inglés). Este incremento se mantenía estable por horas, por lo que a este proceso se le denominó potenciación de larga duración (LTP, por sus siglas en inglés).

Los astrocitos han sido relacionados con la LTP en estructuras como la médula espinal, el hipotálamo y el hipocampo (Yang et al., 2003; Panatier et al., 2006; Ikeda et al., 2007). En particular, Yang y cols, estudiaron la participación de los astrocitos en el

desarrollo del LTP en el hipocampo. En este trabajo, los autores mostraron que la presencia de los astrocitos era esencial para que se observara una LTP inducida por una HFS. La interferencia con la función de la D-serina, bien con un antagonista del sitio de unión a D-serina (DCKA, 5,7-dichlorokynurenic acid) o con la administración de una enzima que degrada a la D-serina (DAAO, D-aminoacid oxidase), producía el mismo efecto bloqueador, lo que sugirió fuertemente que era a través de la liberación de este co-agonista que los astrocitos participaban en la LTP.

Estos hallazgos fueron corroborados por el grupo de Rusakov (Henneberger et al., 2010), en donde la administración de una gliotoxina que arresta metabólicamente a los astrocitos, el fluoroacetato (FAC), inhibe por completo la LTP. De manera interesante, la LTP se restablece en su totalidad cuando se administra D-serina. Más aún, el bloqueo de los incrementos de la $[Ca^{2+}]_i$ así como de la exocitosis de la D-serina en astrocitos individuales, inhibe la inducción de la LTP en las sinapsis excitatorias vecinas como una consecuencia de la disminución de la ocupación de sitios del co-agonista en los receptores NMDA (Henneberger et al., 2010).

Los estudios de la participación de los astrocitos en la plasticidad sináptica en la región CA1 del hipocampo no se han restringido únicamente a la LTP, en el 2008, Zhang y cols. mostraron que la depresión de larga duración (LTD) requería de igual manera la integridad de la función de los astrocitos. En este trabajo, la administración del FAC bloqueó la depresión en las respuestas sinápticas. De manera interesante, al igual que sucede con la LTP, la LTD se recupera cuando en presencia de FAC se administra D-serina. Este hallazgo refuerza la importancia de los receptores NMDA en este proceso plástico (Malenka y Nicoll, 1993; Citri y Malenka, 2008) y la participación de los astrocitos como proveedores del co-agonista que permite el correcto funcionamiento de dichos receptores.

La LTP es considerada por muchos como la base celular y molecular que subyace a los procesos de aprendizaje y memoria (Morris et al., 1986; Whitlock et al., 2006; Albensi et al., 2007). Así, los hallazgos de la participación de los astrocitos en el LTP son congruentes con hallazgos conductuales. De esta manera, la administración de FAC redujo la memoria de largo plazo en pollos, evaluada en la tarea de evitación

inhibitoria (O'Dowd et al., 1994) y la evocación de la memoria evaluada en ratas con el laberinto acuático de Morris (Zhang et al., 2008). En este último trabajo, la memoria se recuperó con la administración exógena de D-serina.

1.2.3 Los receptores muscarínicos en los astrocitos median los efectos de la acetilcolina sobre la transmisión sináptica en el hipocampo.

El hipocampo recibe aferencias colinérgicas provenientes del septum y de la banda diagonal de Broca (Lewis y Shute, 1967). Aquí, la acetilcolina (ACh) modula la transmisión y plasticidad sináptica (Fernández de Sevilla y Buño, 2010) debido a la expresión de receptores para acetilcolina de tipo muscarínicos (mAChR) y nicotínicos (nAChR) en todos los elementos de la sinapsis (interneuronas, piramidales y en astrocitos) (Hernández-Morales y Gracia-Colunga, 2009; Jia et al., 2009; Fernández de Sevilla y Buño, 2010; Navarrete et al., 2012). El primer hallazgo de que los astrocitos respondían a la estimulación de fibras colinérgicas con incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ debido a la activación de mAChR fue publicado en el 2000 por Shelton y McCarthy y confirmado después por el grupo de Araque (2002, 2005 y 2012). Los astrocitos hipocámpales responden además a la aplicación tópica de ACh (Perea y Araque, 2005) y a la estimulación somatosensorial de la pata de la rata (la cual produce liberación de ACh en la región CA1 del hipocampo) (Navarrete et al., 2012). La activación de los astrocitos modifica la actividad de las neuronas, generando un aumento en las corrientes mediadas por los receptores NMDA en las neuronas piramidales (Perea y Araque, 2005) y permite la plasticidad sináptica que genera la ACh en la región CA1 del hipocampo (Navarrete et al., 2012).

1.3 Efecto de la nicotina sobre la transmisión sináptica en la región CA1 del hipocampo.

La nicotina es el principal componente del tabaco que produce adicción (Dani y De Biasi, 2001). Es un alcaloide que se encuentra en la planta del tabaco (*Nicotiana tabacum*) en donde cumple funciones de insecticida (Hukkanen et al., 2005). Cuando la nicotina es administrada, se distribuye rápidamente por diferentes tejidos incluyendo el cerebro, en donde es posible detectarla tan solo 10 s después de su administración a

nivel periférico (Hukkanen et al., 2005).

La nicotina tiene la capacidad de modular la función neuronal ya que es un agonista exógeno de los receptores para acetilcolina de tipo nicotínico (nAChRs). Estos receptores pertenecen a la superfamilia de canales iónicos regulados por ligando (Albuquerque et al., 2009). Están compuestos de cinco subunidades que forman una estructura pentamérica alrededor de un poro central. Hasta el momento se han descrito 12 subunidades de nAChR en el SNC: $\alpha 2$ - $\alpha 10$ y $\beta 2$ - $\beta 4$. Los nAChRs pueden estar conformados por la combinación entre subunidades α y β (heteroméricos) o estar compuestos por cinco subunidades α (homoméricos) (Albuquerque et al., 2009).

Debido a la alta permeabilidad al Na^+ y Ca^{2+} que poseen estos receptores, la activación de los nAChR produce una despolarización de las neuronas que los expresan (Seguela et al., 1993). En particular, en la región CA1 del hipocampo, los nAChRs (conformados por las subunidades $\alpha 7$, $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 3\beta 4$) se encuentran expresados en interneuronas así como en las neuronas pre y postsinápticas (Levin, 2002), por lo que no es de extrañar que la administración aguda y crónica de nicotina en rebanadas de hipocampo de la rata facilita la transmisión sináptica y la inducción del LTP (Radcliffe y Dani, 1998; Fujii et al., 2000; Yang et al., 2003; Yamazaki et al., 2006).

La administración de nicotina también mejora la función cognitiva en condiciones patológicas, como en pacientes con enfermedad de Alzheimer (Jones et al., 1992; Newhouse et al., 2002) y revierte los déficits cognitivos producidos por la lesión del sistema colinérgico en animales (Decker et al., 1992; Levin et al., 1993). Además, se ha propuesto que los cambios de larga duración inducidos por nicotina que están relacionados con la adicción al tabaco, usan los mismos mecanismos celulares en el hipocampo que se requieren durante un proceso normal de aprendizaje y memoria (Dani et al., 2001; Robbins y Everitt, 2002; Kelley, 2004; Zhang et al., 2010).

Los efectos celulares y conductuales de la nicotina se han explicado con base en la activación y desensibilización de los nAChRs presentes en las neuronas. Así, la nicotina puede facilitar la liberación de glutamato por parte de las colaterales de Schaffer (Le Magueresse y Cherubini, 2007; Nakauchi et al., 2007; Jia et al., 2009), disminuir la liberación de GABA de las interneuronas inhibitorias y despolarizar directamente a las piramidales de CA1 (Matsuyama y Matsumoto, 2003; Yamazaki et

al., 2006; Le Magueresse y Cherubini, 2007; Nakauchi et al., 2007; Jia et al., 2009). Sin embargo, los astrocitos expresan nAChRs (Gahring et al., 2004; Hernandez-Morales y Garcia-Colunga, 2009) y responden a los agonistas con incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ (Sharma y Vijayaraghavan, 2001), lo que abre la posibilidad de que los astrocitos pudieran estar mediando los efectos de la nicotina en el hipocampo. En el presente trabajo, se analizó el papel de la astrocitos en la potenciación de la transmisión sináptica inducida por nicotina en el hipocampo de la rata.

2. HIPÓTESIS

Los astrocitos median los efectos de la nicotina sobre la transmisión sináptica en la región CA1 del hipocampo.

3. OBJETIVO GENERAL

Explorar si en los efectos de la nicotina sobre la transmisión sináptica en la región CA1 del hipocampo están involucrados los astrocitos.

4. OBJETIVOS PARTICULARES

Para evaluar el papel de los astrocitos en la transmisión sináptica inducida por nicotina:

1. Caracterizar el efecto del fluoroacetato sobre los incrementos de Ca^{2+} inducidos por nicotina en astrocitos en cultivo.
2. Caracterizar el efecto de la nicotina sobre la transmisión sináptica de la región CA1 del hipocampo.
3. Analizar el efecto del fluoroacetato sobre la potenciación de la transmisión sináptica por nicotina en la región CA1 del hipocampo.
4. Estudiar la participación de la D-serina glial como mediador de los efectos de la nicotina en la transmisión sináptica de la región CA1 del hipocampo.

5. METODOLOGÍA

Todos los procedimientos fueron llevados a cabo de acuerdo con las normas y lineamientos éticos del NIH “Guide for the Care and Use of Experimental Animals” y fueron aprobados por el comité de investigación en animales del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

5.1 Cultivo de astrocitos de la región CA1 del hipocampo

Se utilizaron ratas macho recién nacidas (P0) de la cepa *Wistar*, las cuales fueron sacrificadas por decapitación. El cerebro se extrajo rápidamente y se bañó con una solución de registro (4 °C) que contenía (en mM): 136 NaCl, 2.5 KCl, 2 CaCl₂, 0.5 MgCl₂, 10 HEPES, y 10 D-glucosa con un pH de 7.4. Se obtuvo la región CA1 del hipocampo y se disoció mecánicamente con una pipeta Pasteur estéril. La suspensión celular fue depositada sobre portaobjetos tratados con poli-L-ornitina (0.01%) y 2 ml de medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, L-glutamina (2 mM), penicilina (100 U/ml) y estreptomicina (100 µg/ml). Para permitir el crecimiento selectivo de astrocitos, el medio se cambió 24 h después por neurobasal sin suero suplementado con glutamina (2 mM), penicilina (100 units/mL), estreptomicina (100 µg/mL) y G5. En estas condiciones, previamente ha sido demostrado en nuestro laboratorio (Hernández-Morales, 2009) que más del 95% de las células son astrocitos (**Fig. 5**). Las células se mantuvieron en una atmósfera húmeda a 37°C con 95% de O₂ y 5% CO₂. El medio fue remplazado cada 3 días. Para el registro de la [Ca²⁺]_i, se utilizaron astrocitos entre los días 6 y 9 después del cultivo.

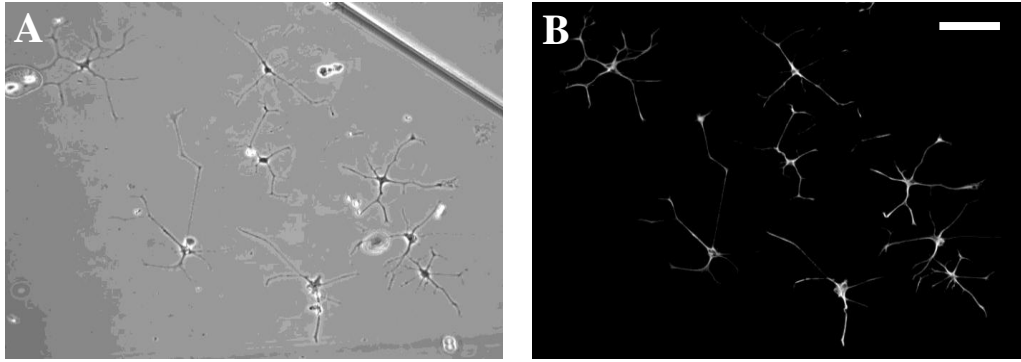


Figura 5. Identificación del tipo celular presente en los cultivos hipocampales. **A**, Imagen en contraste de fase de astrocitos de hipocampo en cultivo. **B**, Imagen en fluorescencia del mismo campo de astrocitos marcados con un anticuerpo contra GFAP. La barra en B representa 100 μm .

5.2 Registro de las variaciones de la concentración de Ca^{2+} intracelular

Las mediciones de la dinámica de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en astrocitos en cultivo se llevó a cabo con un microscopio confocal (Zeiss LSM 510) y el indicador sensible a Ca^{2+} Fluo-4 AM (Molecular Probes, Eugene Oregon, USA). Para esto, las células se incubaron con fluo-4 AM (10 μM) por 30 min a temperatura ambiente y se lavaron 3 veces por 10 min con solución de registro. Después de la incubación, las células se colocaron en la cámara de registro de un microscopio invertido (Axioskop 2FS mot, Carl Zeiss, Inc.) en donde fueron continuamente perfundidas (3 ml/min) con solución de registro.

El Fluo-4 fue excitado con un láser de argón con una longitud de onda de 488 nm y atenuado al 2.5%. Las imágenes de las células fueron tomadas a una frecuencia de 0.5 Hz. La emisión de la señal fue adquirida entre 500 y 530 nm. Los parámetros de iluminación y detección fueron digitalmente controlados y mantenidos constantes durante los experimentos. Para las mediciones de los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, las imágenes de fueron obtenidas en un mismo plano focal. Las regiones de interés (ROIs) se definieron sobre el cuerpo de los astrocitos.

5.3 Cuantificación de la liberación de D-serina glial

Para determinar la cantidad de D-serina liberada y el efecto del FAC sobre los niveles de este gliotransmisor, se utilizaron cultivos confluentes (90%) de astrocitos. Se recuperó el sobrenadante de los cultivos en condiciones basales (control) y después de la administración de ATP (60 s, 10 μ M) en presencia y ausencia de FAC (5 mM; 30 min de incubación previo a la administración de ATP) y se almacenó a -70°C hasta su posterior cuantificación. Los niveles de D-serina fueron medidos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, 1100 series, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) utilizando el método de fase reversa, con ayuda de una columna cromatográfica, C18 column (ESA HR 80, 4.6 X 80; 3 μ m) en un sistema de detección electroquímica (Coulochem III, USA). Las muestras fueron derivadas con una mezcla de ortoformaldehído y 2-mercaptoetanol (Castillo et al., 2008). Se utilizó como fase móvil amortiguador de Na^+ (50 mM) en una solución de metanol al 25% a pH 6.75, con un flujo de 1.2 ml/min. Se realizaron curvas de concentración con diferentes dosis de D-serina (Sigma Aldrich) al inicio y fin de cada día de análisis, lo que nos permitió evaluar el funcionamiento del equipo a lo largo del día. Las muestras se analizaron por duplicado. La concentración de D-serina en cada grupo experimental fue expresada en μ mole por gramo de proteína (μ mole/g proteína). Para determinar la concentración de proteínas se recolectaron las células de cada plato de cultivo y se utilizó el método de Bradford de acuerdo a como fue reportado previamente (Mejia-Toiber, 2010).

5.4 Obtención de rebanadas de hipocampo

Se utilizaron ratas macho de la cepa *Wistar* de 120 gramos, las cuales fueron anestesiadas con éter y sacrificadas por decapitación. El cerebro fue rápidamente removido y colocado en una solución con sacarosa al 4°C que contenía (en mM): sacarosa 238, KCl 3, K_2HPO_4 2.5, MgCl_2 2.5, NaHCO_3 25 y glucosa 30 (pH 7.4). Se obtuvieron rebanadas transversales de la región CA1 del hipocampo (400 μ m) con un vibratomo. Previo a su registro, se mantuvieron por al menos 1 h con fluido cerebroespinal artificial -FCA- (en mM): NaCl 126, KCl 3, NaHCO_3 25, MgCl_2 1, CaCl_2 2, and glucosa 11 (pH 7.4). Posterior a esto, las rebanadas fueron transferidas a la cámara de registro en donde fueron continuamente bañadas (flujo de 2 ml/min) con

FAC durante todo el experimento. Todas las soluciones fueron continuamente burbujeadas con 95% O₂/5% CO₂ y mantenidas a temperatura ambiente (22-25 °C).

5.5 Registro electrofisiológico

Se realizaron registros electrofisiológicos de campo de las respuestas sinápticas (EFP) en la región de CA1 del hipocampo. Las respuestas sinápticas fueron registradas en el *stratum radiatum* con pipetas de borosilicato, las cuales fueron llenadas con NaCl 2 M y con una resistencias de entre 1.5 y 2 MΩ. Para producir las respuestas sinápticas se colocó un electrodo bipolar de platino (25 μm diámetro; FHC Inc., Bowdoin ME, USA) en el *stratum radiatum* y se estimularon las colaterales de Schaffer con un pulso de corriente o pulsos pareados de una duración de 150 μs y una frecuencia de 0.33Hz. La amplitud del pulso se ajustó en cada experimento para producir una respuesta del 60-70% de la respuesta máxima. En el caso de los pulsos pareados, éstos se aplicaron con un intervalo interpulso de 60 ms. La razón entre las respuestas de los pulsos pareados se definió como la pendiente del segundo EFP (P2) y la pendiente del primer EFP (P1), es decir P2/P1 (PPR). Para la inducción de la potenciación de larga duración (LTP), en presencia de picrotoxina (un antagonista de los receptores GABA_A), la estimulación consistió en 2 trenes de pulsos de 1 s a una frecuencia de 100 Hz (HFS) con un intervalo inter-tren de 5 s. Las señales electrofisiológicas fueron registradas con un amplificador Axopatch-200B (Axon Instruments, CA), filtradas a 10 KHz, digitalizadas con un convertidor analógico-digital y almacenadas en el disco duro de una PC para su posterior análisis con el software Clampfit 9.0 (Axon Instruments, CA) y Sigma Plot.

5.6 Administración de fármacos

Para los experimentos en cultivos, la nicotina (1 μM), el ATP (10 μM) y el fluoroacetato (FAC, 5 mM) se diluyeron en la solución de registro y fueron administrados por perfusión en el baño. Para los experimentos en rebanadas, los fármacos se diluyeron en FCA y se aplicaron después de 30 min de registro estable (basal). Dependiendo del propósito de cada experimento, las rebanadas se incubaron con ácido D-(–)-2-amino-5-phosphonopentanoico (AP5, 50 μM), D-serina (20 μM), nicotina (1 μM), FAC (5 mM), mecamilamina (50 μM) y la D-amino ácido oxidasa

(DAAO, 0.1 U/ml). A excepción de la DAAO, los fármacos fueron preparados a partir de una solución concentrada, en agua destilada y diluidos en la solución de registro. La DAAO fue disuelta en pirofosfato de Na^+ (20 mM, pH 8-8.5) y mezclada con flavina adenina dinucleótido (10 μM).

5.7 Análisis de datos

Las variaciones de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se muestran como $\% \Delta F/F_0$, en donde F_0 es la fluorescencia basal adquirida al inicio de cada experimento (60 s) y ΔF es el cambio de la fluorescencia con respecto a la basal. El área bajo la curva se analizó para cada respuesta y se presenta como el promedio \pm el E.E. de todas las respuestas en cada condición. Los efectos de los fármacos se analizaron con una ANOVA de medidas repetidas seguido de una prueba *posthoc* Fisher. Se consideraron como significativas aquellas diferencias con una $p \leq 0.05$.

Para la cuantificación de D-serina se promediaron las dos mediciones de cada placa de cultivo. Se utilizó la curva de concentración de D-serina para extrapolar los datos y se normalizaron con la cantidad de proteína contenida cada placa de cultivo. Los resultados se compararon con una ANOVA no paramétrica (Kruskall-Wallis), debido a que los grupos no presentaban una distribución normal.

Para los registros electrofisiológicos, se analizó la pendiente de la fase de descenso de los EFP. Los resultados del análisis del curso temporal del tratamiento se normalizaron respecto al promedio de la basal. Cada punto de la gráfica corresponde al promedio de 20 estímulos (5 min de registro). Los resultados de la proporción de pulsos pareados de cada rebanada se muestran con círculos. El promedio y el E.E. de todas las respuestas se representan con una gráfica de barras. Para su inclusión, sólo se tomaron en cuenta aquellas rebanadas cuyos registros mantuvieran una basal estable.

Las comparaciones de las medias de los resultados electrofisiológicos y de Ca^{2+} , se realizaron con una ANOVA de una vía de medidas repetidas seguida de una prueba *posthoc* Fisher. Se consideraron como diferencias estadísticamente significativas cuando $p \leq 0.05$. Cuando sólo dos grupos se compararon, se usó una prueba *t*-Student.

Para las gráficas del curso temporal de las respuestas, los resultados se presentan como el promedio \pm EE, de las pendientes del EFP relativo a la basal (el promedio de

los primeros 30 min de registro). Los efectos tempranos y tardíos corresponden al promedio de las respuestas medidas entre los 10 y 20 min y los 50 y 60 min (respectivamente) después de la administración de nicotina, de FAC o la estimulación eléctrica. Estos dos componentes fueron comparados con la pendiente de la basal (control) usando la ANOVA de medidas repetidas. Debido a los cambios que produce la administración de FAC, cuando la nicotina o la estimulación eléctrica fueron precedidas por FAC, las respuestas sinápticas previas a la nicotina o a la HFS fueron usadas como otro grupo control para comparar. Para determinar las diferencias significativas entre los grupos, se utilizó la prueba posthoc Fisher. Cuando sólo dos grupos se compararon, se usó una prueba *t*-Student.

6. RESULTADOS

El fluoroacetato (FAC) ha sido utilizado para interferir con la función glial en estructuras como la médula espinal, la corteza prefrontal y el hipocampo (Largo et al., 1996; Ikeda et al., 2007; Henneberger et al., 2010; Fossat et al., 2012), por lo que decidimos utilizarlo para responder nuestra hipótesis. Por esta razón, los resultados de la presente tesis se dividen en dos partes. En la primera, caracterizamos el efecto del FAC sobre las respuestas de Ca^{+2} en astrocitos en cultivo. En la segunda parte, nos enfocamos a analizar el papel de los astrocitos en los efectos de la nicotina sobre la transmisión sináptica en la región CA1 del hipocampo.

6.1 Efecto del fluoroacetato sobre las respuestas de Ca^{2+} inducidas por ATP

Con el propósito de analizar los efectos del FAC para inhibir los incrementos de Ca^{+2} en los astrocitos, utilizamos el ATP para inducir las respuestas de Ca^{+2} . El neurotransmisor ATP fue elegido ya que la mayoría de los astrocitos responden a esta sustancia (James et al., 2011) ya que es una señal química usada entre los astrocitos para la comunicación autócrina y parácrina (Guthrie et al., 1999; Koizumi, 2010). Como era de esperarse, la mayoría de los astrocitos (98 %, 276 de 281 astrocitos) respondieron al ATP (10 μM , 1 min) con respuestas de Ca^{+2} . Las respuestas se caracterizaron por presentar de entre 1 a 4 transitorios en el transcurso de 5 min. La respuesta máxima se observó 104 ± 6.5 s después de iniciada la administración del ATP con una amplitud promedio de $114.32 \pm 4.98\% \Delta\text{F}/\text{F}_0$ (**Fig. 6a, d**).

Con el fin de analizar el efecto del FAC sobre estas respuestas de Ca^{+2} , los astrocitos (276 de 10 cultivos) fueron incubados con FAC a una concentración (5 mM) que inhibe las funciones astrocíticas en otras preparaciones (Ikeda y Murase, 2004; Henneberger et al., 2010; Fossat et al., 2012). El FAC por sí sólo no modificó significativamente la $[\text{Ca}^{+2}]_i$ basal ($p = 0.179$; control, 1.86 ± 0.32 en unidades arbitrarias -ua-; FAC 30 min, 2.24 ± 0.28 ua; FAC 60 min, 2.14 ± 0.28 ua; lavado 1.81 ± 0.3 ua). Sin embargo, en presencia de FAC, los incrementos significativos en $[\text{Ca}^{+2}]_i$ producidos por la administración de ATP (**Fig. 6a**) se vieron reducidos (**Fig. 6b**) y completamente recuperada después de lavado el FAC (**Fig. 6c**). La administración de

FAC por 30 min disminuyó significativamente la amplitud de las respuestas de Ca^{+2} ($p < 0.01$; $83.28 \pm 2.63\% \Delta F/F_0$) lo que fue más evidente después de 60 min de administración de FAC (**Fig. 6d**; $p < 0.01$; $47.32 \pm 3.01 \% \Delta F/F_0$). De manera interesante, el efecto del ATP fue recuperado después de 30 min de lavado y no se encontraron diferencias significativas con respecto al control (**Fig. 6d**; $p = 0.185$; $116.68 \pm 3.40\% \Delta F/F_0$). Como una medida de la cantidad de iones de Ca^{+2} involucrada en las señales se analizó el área bajo la curva de las respuestas. En concordancia con el análisis de la amplitud, la administración de FAC (por 30 y 60 min) disminuyó significativamente la $[\text{Ca}^{+2}]_i$ inducida por ATP (68% y 80% respectivamente; $p < 0.01$) misma que se recuperó completamente después de 30 min de lavado ($p < 0.01$).

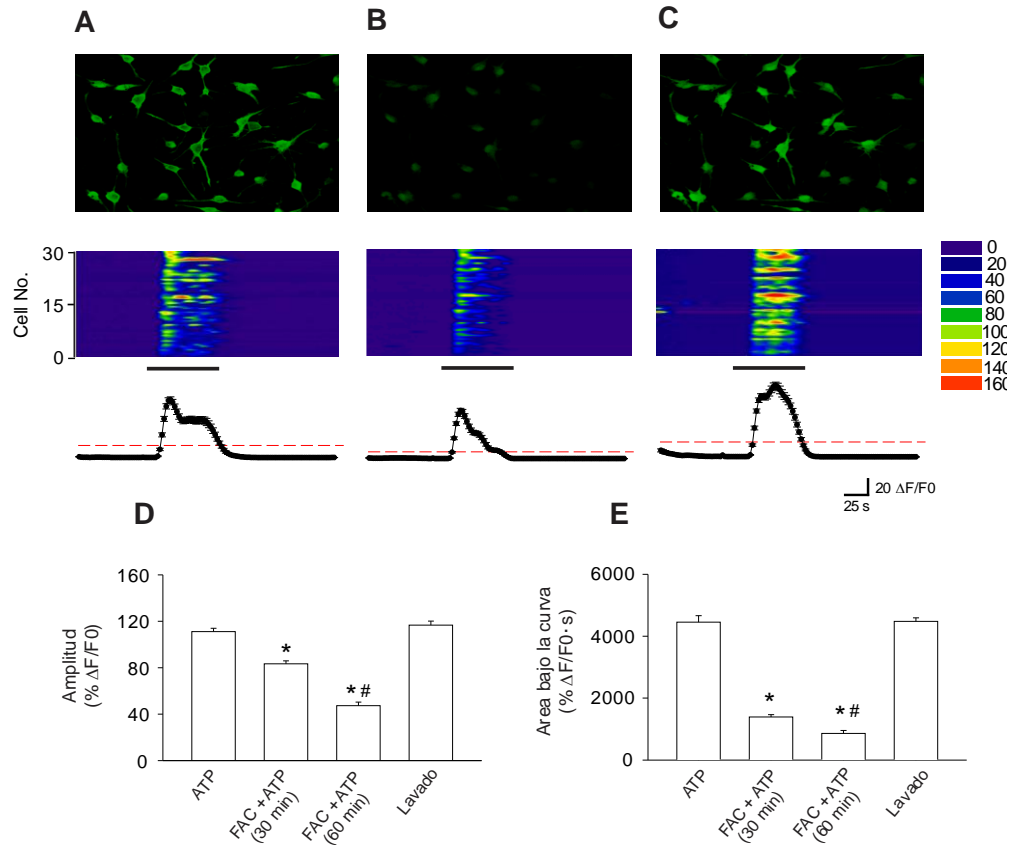


Figura 6. El fluoroacetato disminuye la $[Ca^{2+}]_i$ de astrocitos inducidas por ATP. Imagen de astrocitos en cultivo y matriz del curso temporal de las respuestas representativas de $[Ca^{2+}]_i$ calculada para todas las células de un cultivo (30 células), en presencia de ATP (10 μ M, 1 min) antes **A**, después de 30 min de incubación con fluoroacetato (FAC; 5 mM) en **B**, y 30 min después de la remoción del FAC en **C**. La escala de color indica el cambio en la amplitud de las respuestas de Ca^{2+} con respecto a la basal ($\Delta F/F_0$). El promedio \pm E.E. de las respuestas para **A-C** se muestra en la parte inferior (respectivamente). Las líneas punteadas representan el 95% de intervalo de confianza. Las barras horizontales indican el tiempo de la administración de la ATP. **D-E**, Análisis de la amplitud máxima de las respuestas y del área bajo la curva de las respuestas de Ca^{2+} inducidas por ATP calculado para todos los astrocitos analizados (276 células provenientes de 10 cultivos). * $p \leq 0.05$, para las diferencias con respecto al control; # $p \leq 0.05$ para las diferencias con respecto al ATP + fluoroacetato (ATP + FAC) ANOVA de una vía de medidas repetidas seguida de una prueba posthoc de Fisher.

6.2 Efecto del fluoroacetato sobre la liberación de D-serina inducida por ATP.

Diversos grupos han mostrado que la liberación de gliotransmisores por parte de los astrocitos depende del incremento de $[Ca^{2+}]_i$ (Jourdain et al., 2007; Liu et al., 2011; Verkhratsky et al., 2012). Así, nos planteamos conocer si el FAC afectaba la liberación

de gliotransmisores como la D-serina. Para esto, utilizamos cultivos confluentes de astrocitos a los cuales se les administró ATP (60 s, 10 μ M) en ausencia (control) y presencia de FAC (5 mM). La administración de ATP produjo un incremento en la liberación de D-serina de un 177% en comparación con el grupo control (**Fig.7**). Cuando las células fueron incubadas con FAC por 60 min, se bloqueó la liberación de D-serina inducida por ATP en comparación con el control (110%) (control, 2.96 ± 1.033 ; ATP, 5.27 ± 1.41 ; FAC + ATP, 3.26 ± 1.07 ; nmol/mg proteína).

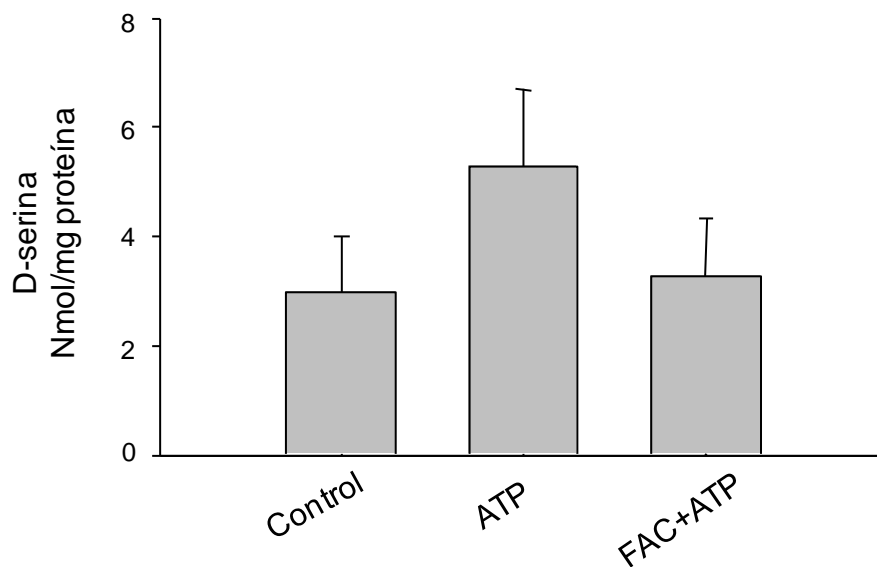


Figura 7. Efecto del FAC sobre la liberación de D-serina en astrocitos en cultivo. La administración de ATP (10 μ M, 60 s) incrementa la liberación de D-serina medida con HPLC. La incubación de los astrocitos con FAC (60 min) evita la liberación de D-serina inducida por ATP (n = 4).

6.3 Efecto del fluoroacetato sobre las respuestas de Ca^{+2} inducidas por nicotina.

Una vez analizado el efecto del FAC sobre las respuestas inducidas por ATP, evaluamos el efecto de esta gliotoxina sobre las respuestas inducidas por nicotina. Para esto, administramos una dosis de nicotina cercana a la que se alcanza en el cerebro del humano después de haber fumado un cigarro (Rose et al., 2010). En respuesta a la nicotina (1 μ M, 1 min), el 72% de los astrocitos (122 de 169 provenientes de 8 cultivos) respondieron con incrementos en $[Ca^{+2}]_i$. De acuerdo con su curso temporal, se observaron dos tipos de respuestas, unas respuestas rápidas, alcanzando un incremento

máximo 127 ± 1.8 s después de administrada la nicotina y cuyas respuestas regresaron a la basal en el transcurso del registro (presentando uno o dos transitorios) (33% de los astrocitos) y unas respuestas lentas (66%) que respondieron con respuestas sostenidas en el incremento de $[Ca^{+2}]_i$ (**Fig. 8**).

Para analizar el efecto del FAC sobre las respuestas de Ca^{+2} provocadas por la administración de nicotina, los astrocitos (122 provenientes de 8 cultivos) fueron incubados con FAC (5 mM) por 30 ó 60 min. La figura 8 muestra respuestas de Ca^{+2} típicas a la nicotina (24 astrocitos de un cultivo) obtenidas antes (**Fig 8a**), durante la administración de FAC (**Fig 8b**) y después de la remoción de FAC (**Fig 8c**). La administración de nicotina produjo un incremento significativo de la $[Ca^{+2}]_i$ por arriba de la basal, que se ve reducida por la presencia de FAC y parcialmente recuperada después del lavado de FAC. Con el propósito de cuantificar los cambios en las señales de Ca^{+2} , la amplitud y el área bajo la curva fue analizada. El promedio de la amplitud de las respuestas inducidas por nicotina (122 astrocitos provenientes de 8 cultivos) fue de 54.36 ± 5.38 % $\Delta F/F_0$. La administración de FAC por 30 y 60 min disminuyó significativamente la amplitud de las respuestas de Ca^{+2} (**Fig. 8d**; $p < 0.01$; 22.55 ± 3.05 y 21.48 ± 7.30 % $\Delta F/F_0$, respectivamente). Después del tiempo de incubación con FAC, los astrocitos se mantuvieron 30 min con solución de registro para su recuperación y se evaluó una vez más el efecto de la nicotina. En estas condiciones, la amplitud promedio de las respuestas de Ca^{+2} provocadas por nicotina no fue recuperada (**Fig. 8d**; $p < 0.01$; 17.07 ± 2.54 % $\Delta F/F_0$). La administración de FAC redujo de manera significativa ($p < 0.01$) las respuestas provocadas por la administración de nicotina cuando los astrocitos fueron tratados por 30 min (87 % y 60 min (92 %) con respecto al control y fue parcialmente recuperado (67 % con respecto al control) después de la remoción del FAC (**Fig 8e**).

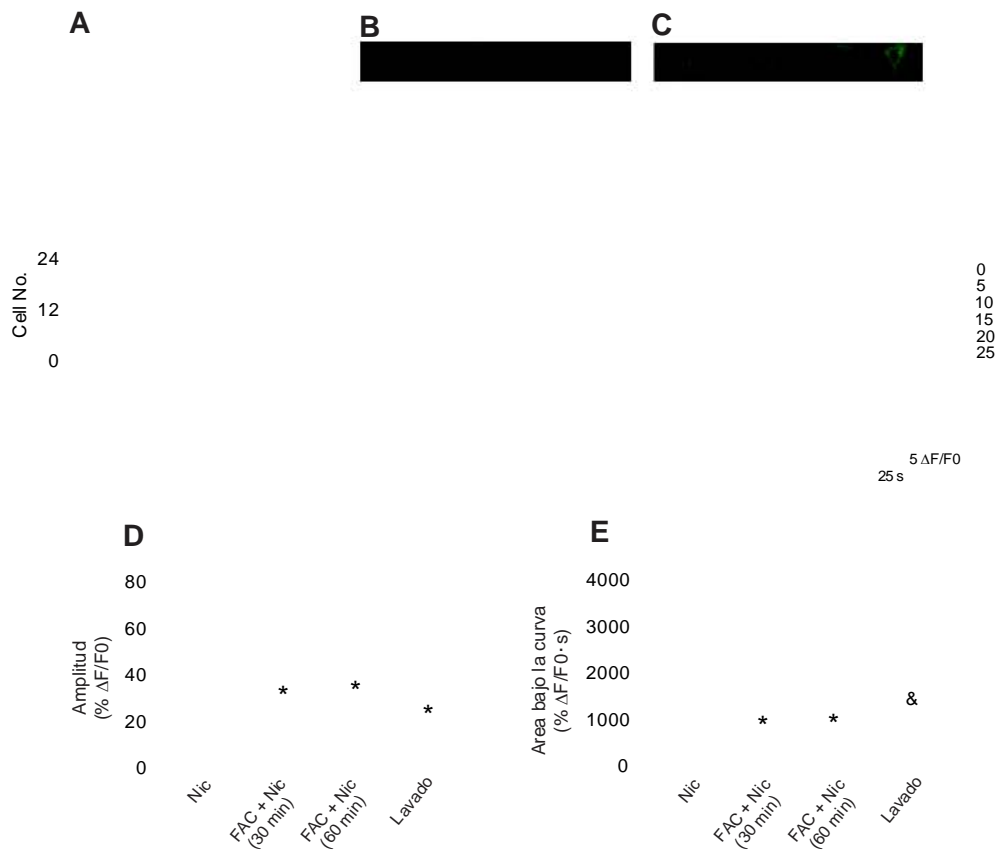


Figura 8. El fluoroacetato disminuye la $[Ca^{2+}]_i$ de astrocitos inducidas por nicotina. Imagen de astrocitos en cultivo y matriz del curso temporal de las respuestas representativas de $[Ca^{2+}]_i$ calculada para todas las células de un cultivo (24 células), en presencia de nicotina (Nic; 1 μ M, 1 min) antes **A**, después de 30 min de incubación con fluoroacetato (FAC; 5 mM) en **B**, y 30 min después de la remoción del FAC en **C**. La escala de color indica el cambio en la amplitud de las respuestas de Ca^{2+} con respecto a la basal ($\Delta F/F_0$). El promedio \pm E.E. de las respuestas para **A-C** se muestra en la parte inferior (respectivamente). Las líneas punteadas representan el 95% de intervalo de confianza. Las barras horizontales indican el tiempo de la administración de la nicotina. **D-E**, Análisis de la amplitud máxima de las respuestas y del área bajo la curva de las respuestas de Ca^{2+} inducidas por nicotina calculado para todos los astrocitos analizados (122 células provenientes de 8 cultivos). * $p \leq 0.05$, para las diferencias con respecto al control; # $p \leq 0.05$ para las diferencias con respecto a la nicotina + fluoroacetato (Nic + FAC) ANOVA de una vía de medidas repetidas, seguida de una prueba posthoc de Fisher..

6.4 La nicotina potencia la transmisión sináptica en la región CA1 del hipocampo

Diversos grupos han mostrado que la nicotina modula la transmisión sináptica en diferentes estructuras del SNC incluyendo el hipocampo (He et al., 2003; Kenney y Gould, 2008). En el presente trabajo, nos planteamos caracterizar los efectos de la

administración de la nicotina sobre la transmisión sináptica en nuestras condiciones experimentales. Para esto, registramos los potenciales de campo en el *stratum radiatum* de la región CA1 del hipocampo producidos por la estimulación de las colaterales de Schaffer (**Fig. 9a**). Para cada experimento, obtuvimos la relación entre la intensidad de estimulación y la amplitud de la respuesta (curva entrada-salida). En nuestras condiciones experimentales, el umbral de las respuestas se alcanzó con $\sim 40 \mu\text{A}$ y se saturó con intensidades cercanas a 0.6 mA por lo que la intensidad del pulso de prueba fue establecida generalmente entre 120 y $150 \mu\text{A}$.

La administración de nicotina a una concentración cercana a la que se alcanza después de un cigarro: $520\text{-}720 \text{ nM}$ (Rose et al., 2010), produjo por sí sola un incremento en la transmisión sináptica que fue máxima 15 min después de su administración ($204 \pm 45\%$ en comparación con la basal, **Fig. 9b**). Una vez alcanzado este punto, las respuestas sinápticas disminuyeron lentamente, pero se mantuvieron por encima de la basal ($135 \pm 19\%$) por al menos 60 min después de la administración de nicotina (**Fig. 9b**). El análisis de varianza (ANOVA) de los efectos tempranos y tardíos de la nicotina (ver sección de materiales y métodos) mostró un efecto significativo del tratamiento ($F_{2,20} = 8.36$; $p = 0.002$). La prueba de Fisher indicó que tanto el componente temprano como el tardío fueron significativos con respecto al control ($p \leq 0.001$ y $p \leq 0.05$ respectivamente **Fig. 9f**). Con el propósito de conocer si la nicotina estaba utilizando mecanismos presinápticos o postsinápticos en la inducción de la potenciación en la transmisión sináptica, se analizó la proporción de las pendientes de las respuestas producidas por los pulsos pareados (PPR, P2/P1) antes, durante y 60 min después de la administración de nicotina. El análisis de la PPR mostró un efecto significativo de la nicotina ($F_{3,30} = 4.327$; $p = 0.012$). La prueba de Fisher indicó una disminución de la PPR durante la administración de nicotina con respecto al control ($p = 0.007$: **Fig. 9b**) sin efecto sobre los componentes tempranos y tardíos ($p = 0.74$; $p = 0.78$ respectivamente, **Fig. 9b**).

La nicotina es un agonista exógeno de los receptores para acetilcolina de tipo nicotínico (nAChRs). Así, con el objeto de corroborar que los efectos de la nicotina sobre la transmisión sináptica eran mediados por los nAChRs, administramos un antagonista no selectivo para estos receptores, la mecamilamina.. Como era de

esperarse, en presencia de este antagonista, la nicotina no modificó la transmisión sináptica ($F_{2,10} = 0.33$, $p = 0.72$; **Fig. 9d**).

6.5 Los receptores NMDA son necesarios para los efectos de larga duración producidos por la nicotina.

Existe controversia acerca del papel de los receptores NMDA como mediadores de los efectos de la nicotina sobre la transmisión sináptica (He et al., 2003; Yamazaki et al., 2006). En este sentido, con el fin de determinar si estos receptores participaban en los efectos de la nicotina, administramos un antagonista de los receptores NMDA, el AP5, antes, durante y después de la administración de nicotina. En estas condiciones, un pequeño incremento del EFP durante el componente temprano fue observado por efecto de la administración de nicotina, sin efecto alguno cuando se analizó el componente tardío ($p = 0.028$; $p = -0.22$; **Fig. 9e**). Adicionalmente, una vez establecida la potenciación inducida por nicotina (componente tardío), el AP5 fue administrado y la pendiente del EFP regresó a la basal ($p = 0.495$ con respecto a la basal, **Fig. 9f**), indicando que la nicotina induce una plasticidad sináptica de larga duración dependiente de la actividad de los receptores NMDA. La administración de AP5 por sí sola no produjo ningún cambio significativo sobre la pendiente del EFP con respecto al control (t -pareada, $p = 0.89$; **Fig. 10**).

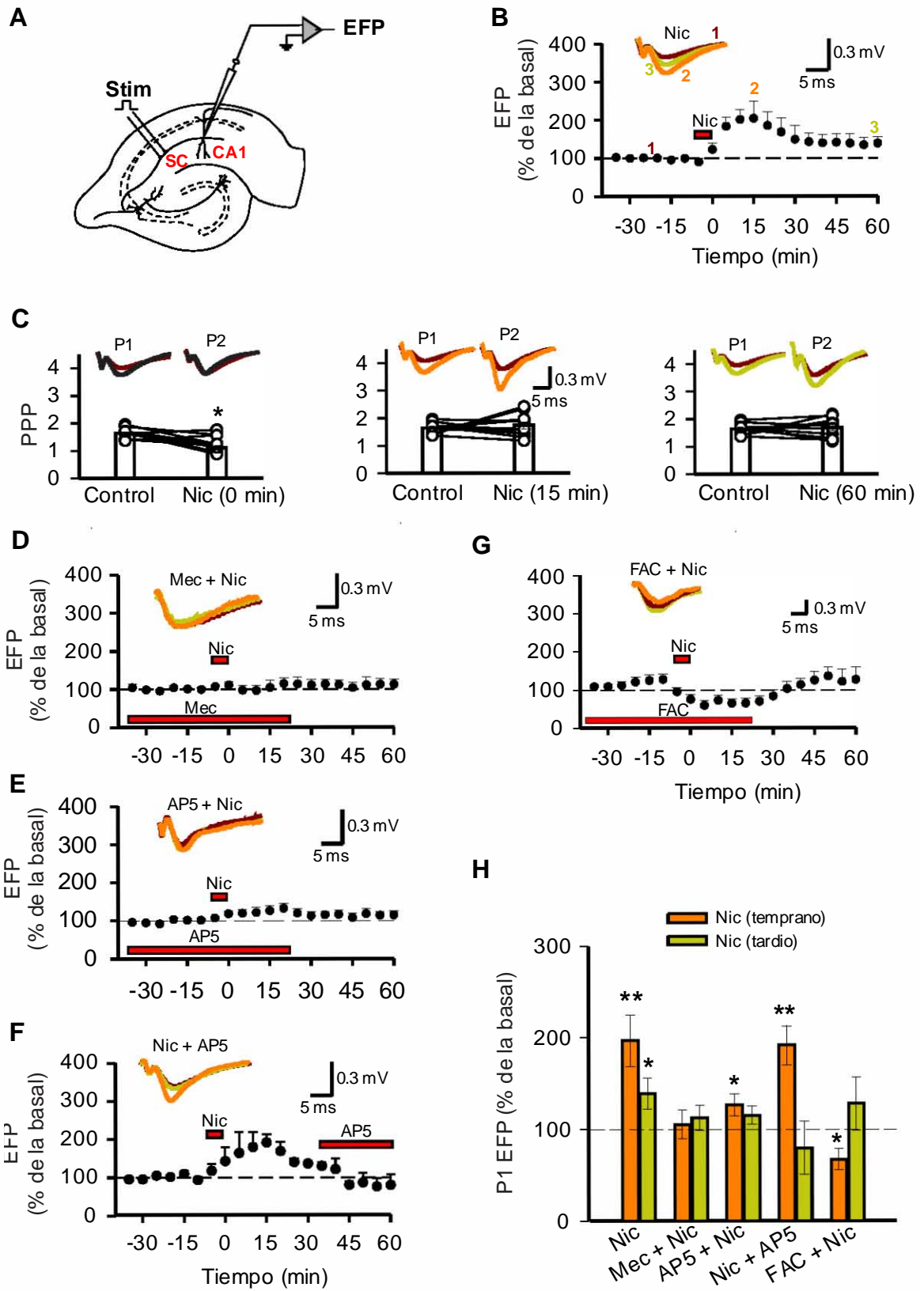


Figura 9. La potenciación de la transmisión sináptica producida por nicotina depende de la activación de receptores nicotínicos y de NMDA. **A**, Arreglo experimental. **B**, análisis de la pendiente de los EFP antes, durante y después de la administración de nicotina (Nic; 1 μ M). **C**, Análisis de la proporción de las respuestas de los pulsos pareados (P2/P1) para las respuestas obtenidas a distintos tiempos después de la administración de nicotina (0, 15 y 60 minutos, respectivamente). Para ésta y las siguientes figuras, las columnas representan el promedio \pm E.E. de los resultados en cada condición y los círculos conectados corresponden a las respuestas de cada experimento. Para esta y las siguientes figuras en los insertos se muestran trazos representativos de los EFP antes (control, café) y después de la administración de nicotina (temprano, naranja; tardío verde) en ausencia y presencia de la droga correspondiente. El efecto de la nicotina en presencia de un antagonista de receptores nicotínicos (mecamilamina; Mec 50 μ M) se muestra en **D**. El efecto de un antagonista de receptores NMDA (AP5; 50 μ M) administrados antes y después de la aplicación de nicotina se muestran en **E** y **F**, respectivamente. **G**, Pendiente de los EFP en función de tiempo, antes y después de la aplicación de nicotina sola y en combinación con fluoroacetato (FAC; 5 mM). Las barras horizontales indican el tiempo de la aplicación de las drogas. El resumen de los efectos de **B, D-G** se muestra en el apartado **H**. Para esta y las subsecuentes figuras, los resultados se muestran como el promedio \pm E.E. de la pendiente de los EFP como un porcentaje de la basal, después de 20-30 min (temprano, naranja) o 50-60 min (tardío, verde) de la administración de nicotina, en ausencia y presencia de la droga correspondiente a cada panel. * $p \leq 0.05$, ** $p < 0.01$, ANOVA de una vía de medidas repetidas, seguida de una prueba posthoc Fisher.

6.6 Las células gliales son necesarias para la inducción de los incrementos de la transmisión sináptica producidos por nicotina.

Debido que los astrocitos expresan nAChRs funcionales (Sharma y Vijayaraghavan, 2001; Hernandez-Morales y Garcia-Colunga, 2009; Shen y Yakel, 2012), nos preguntamos si estas células podrían estar mediando los efectos de la nicotina sobre la transmisión sináptica en la región CA1 del hipocampo. Para responder esto, decidimos utilizar el FAC. Debido a que altas dosis de FAC o largos periodos de administración de este fármaco puede tener efectos contraproducentes sobre las neuronas, decidimos utilizar la misma concentración de FAC que usamos en cultivos (5 mM), ya que además ha sido previamente reportada que por sí sola no afecta la función neuronal. Debido a que el efecto del FAC sobre los incrementos de Ca^{2+} inducidos por nicotina en astrocitos en cultivos son máximos a los 30 min y no cambian con incubaciones de 60 min, decidimos utilizar estos mismos tiempos de incubación para el estudio con rebanadas.

La administración del FAC a las rebanadas hipocampales produjo un incremento máximo en las respuestas sinápticas de $150 \pm 17\%$ (**Fig. 10**). Con el propósito de conocer si el incremento de larga duración del EFP estaba también

mediado por receptores NMDA, administramos AP5. En estas condiciones el FAC siguió incrementado la pendiente de las respuestas sinápticas (t -pareada $p = 0.02$; **Fig. 10**), lo que sugiere que el efecto del FCA no depende de la actividad de los receptores NMDA.

De manera interesante, en presencia de FAC la nicotina no incremento la transmisión sináptica (**Fig. 9G**), sugiriendo un importante papel de los astrocitos en los efectos de la nicotina, en su lugar, una disminución significativa en el EFP fue observada en el componente temprano ($p = 0.048$), sin ningún efecto sobre el componente tardío ($p = 0.326$; **Fig. 9H**).

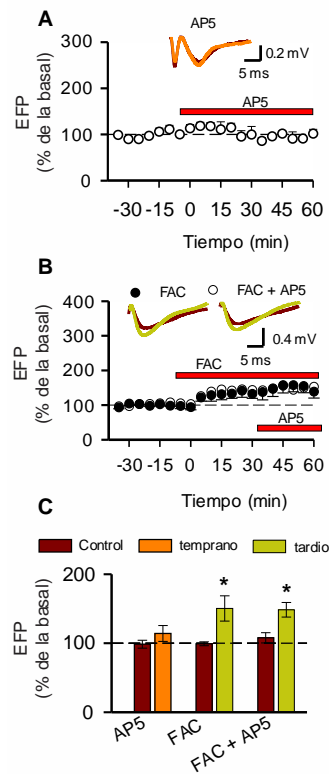


Figura 10. El efecto del fluoroacetato sobre la transmisión sináptica no depende de la activación de receptores NMDA. Curso temporal de los cambios en la pendiente de los EFP producidos por la administración de: **A**, El antagonista de receptores NMDA, AP5 (50 μ M); **B**, fluoroacetato (FAC, 5 mM) solo o en combinación con AP5. En los insertos en **A-B** se muestran trazos representativos. **C**, resumen de los experimentos **A** y **B**. se grafica el promedio \pm E.E. de la pendiente de P1 (como porcentaje respecto al control) antes y después de la administración de nicotina (ver figura 9 para los detalles). * $p \leq 0.05$, ** $p < 0.01$, ANOVA de una vía de medidas repetidas, seguida de una prueba posthoc Fisher.

6.7 La D-serina glial es esencial en los efectos de la nicotina sobre la transmisión sináptica.

Debido a que previamente mostramos que se requiere de los receptores NMDA y la participación de las células gliales para que la nicotina incremente la transmisión sináptica, nos preguntamos si los astrocitos podrían estar modulando la activación de los receptores NMDA a través de la liberación del gliotransmisor D-serina (principal co-agonista endógeno de los receptores NMDA). Para responder esta pregunta, administramos un agonista (D-serina) y un antagonista (DCKA) del sitio de unión a glicina de los receptores NMDA. La aplicación de estas drogas por sí solas no produjo cambios en la pendiente del EFP con respecto al control (*t*-Student pareada, D-serina: $p = 0.95$; DCKA: $p = 0.47$; **Fig. 11a-c**). En presencia de D-serina, la nicotina siguió incrementando significativamente ($F_{2,16} = 8.14$, $p = 0.004$) los componentes temprano y tardío ($p = 0.001$ and 0.01 , respectivamente) (**Fig. 12a**) y la máxima potenciación fue similar a la nicotina sola (*t*-pareada, $p = 0.28$). Interesantemente, en presencia de DCKA, la nicotina no indujo una potenciación de la pendiente del EFP. Más aun, una depresión de las respuestas sinápticas ($F_{2,8} = 14.24$, $p = 0.002$) fue observada en el componente tardío (temprano, $p = 0.24$; tardío $p \leq 0.008$; **Fig. 12a,e**).

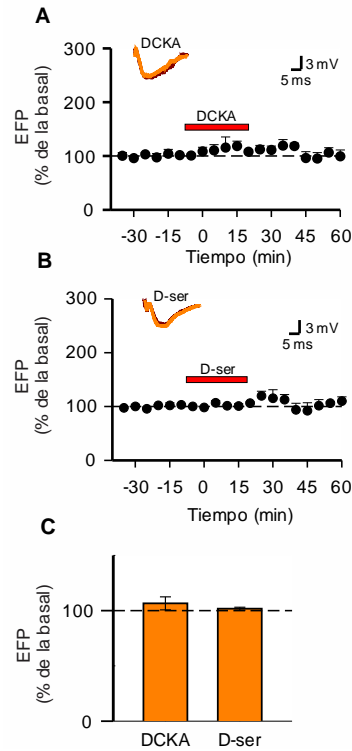


Figura 11. Efecto de la D-serina exógena sobre la transmisión sináptica. Curso temporal de la pendiente de los EFP antes, durante y después de la aplicación de un antagonista para el sitio de unión a D-serina del receptor NMDA (**A**, DCKA, 200 nM) así como de D-serina (**B**, D-ser; 20 μM). En los insertos de **A** y **B** se muestran trazos representativos de las respuestas sinápticas antes y después de la administración de los fármacos (ver figura 8 para los detalles). **C**, resumen de los experimentos en **A-B** en donde se representa el promedio ± E.E. de la pendiente de los EFP antes y durante la aplicación de D-ser (ver figura 9 para los detalles). * $p \leq 0.05$, ** $p < 0.01$, ANOVA de una vía de medidas repetidas, seguida de una prueba posthoc Fisher.

Si bien la D-serina exógena parecía no estar afectando el efecto de la nicotina, los resultados con la DCKA sugerían un papel importante de la D-serina, así que evaluamos la participación de la D-serina endógena en la potenciación de las respuestas sinápticas inducidas por nicotina. Para responder esto, incubamos a las rebanadas de hipocampo con una enzima que degrada la D-serina endógena, la DAAO (Zhang et al., 2008). En estas condiciones, no observamos los incrementos en la transmisión sináptica producidos por la nicotina ($F_{2,12} = 0.35$, $p = 0.5$; **Fig. 12c,e**), lo que fortalecía la hipótesis inicial. Para confirmar la participación de la D-serina en los efectos de la nicotina, nos preguntamos si la administración exógena de la D-serina era capaz de restaurar el efecto de la nicotina que había sido bloqueado por el FAC. Cuando la

nicotina se administró en presencia de FAC y D-serina, se observó un efecto significativo sobre la pendiente del EFP ($F_{3,21} = 7.195$, $p = 0.002$), tanto en el componente temprano como en el tardío con respecto al control ($p = 0.027$; $p \leq 0.001$; Fig. 12d,e).

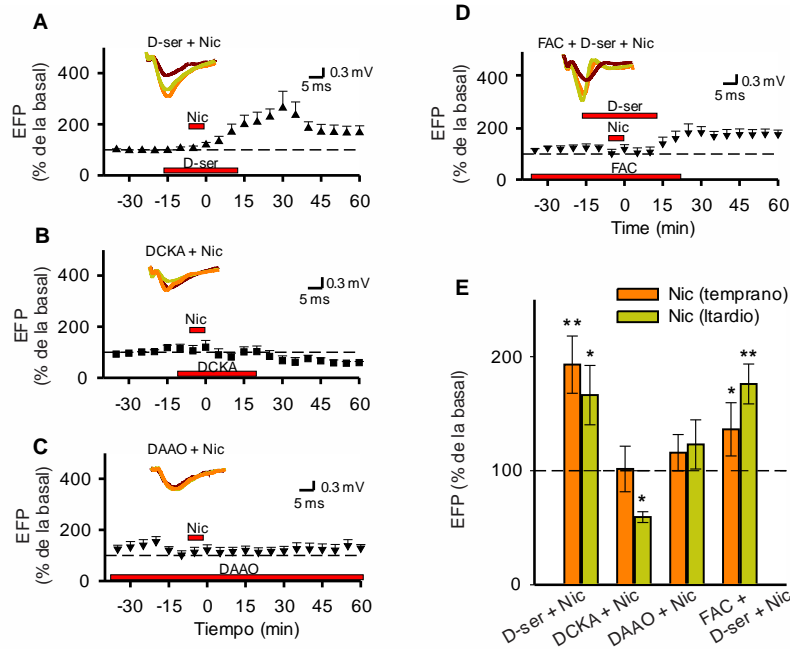


Figura 12. La D-serina glial es necesaria para que la nicotina potencie la transmisión sináptica. Curso temporal de la pendiente de los EFP antes y después de la administración de nicotina (Nic; 1mM) en combinación con: D-serina (A, D-ser, 20 μ M), un antagonista para el sitio de unión a D-serina del receptor NMDA (B, DCKA, 200 nM), una enzima que degrada la D-ser endógena; DAAO (C, 0.1 U/ml); o D-ser en presencia de fluoracetato (D, FAC, 5 mM). El resumen de los experimentos en A-D (como porcentaje respecto al control) se muestra en E. Se grafica el promedio \pm E.E. * $p \leq 0.05$, ** $p < 0.01$, ANOVA de una vía de medidas repetidas, seguida de una prueba posthoc Fisher.

6.8 La potenciación de larga duración producida por estimulación eléctrica también depende de la D-serina glial

Existe controversia en relación con la participación de los astrocitos en la LTP inducida por una estimulación eléctrica de alta frecuencia (HFS) (Agulhon et al., 2010; Henneberger et al., 2010). En este sentido, quisimos analizar el efecto del FAC sobre la LTP inducida eléctricamente. Como se observa en la figura 13, la HFS produjo un incremento del 50% en la pendiente del EFP, que se mantiene por al menos 1 h (t -pareada, $p = 0.003$; Fig. 13c). En presencia de FAC, la potenciación de las respuestas

no se observó ($p = 0.47$; **Fig. 13c**). De manera interesante, al igual que ocurrió con la facilitación de las respuestas sináptica por parte de la nicotina, la potenciación de las respuestas fue completamente recuperada cuando se administró D-serina exógena ($p = 0.005$; **Fig. 13**). La aplicación de la HFS sola o en presencia de FAC así como en combinación con D-serina no modificaron la PPR (t -pareada, $p = 0.76, 0.67, \text{ and } 0.193$, respectivamente; **Fig. 13c**).

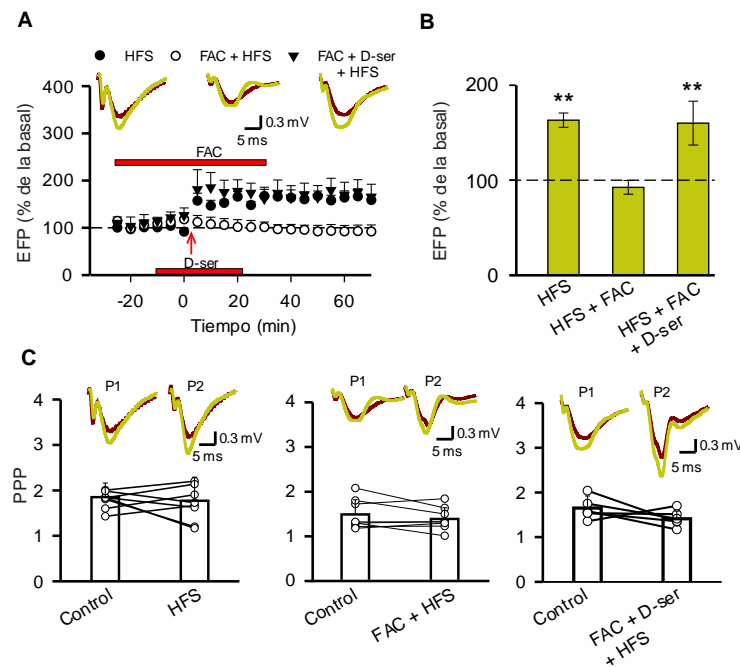


Figura 13 La LTP inducida por una estimulación eléctrica también depende de la D-serina glial.

A, cambios en la pendiente de las respuestas sinápticas producida por la estimulación de alta frecuencia (HFS, la flecha indica el momento de la aplicación de la estimulación) en ausencia y presencia de fluoroacetato (FAC, 5 mM), y D-serina (D-ser, 20 μ M). **B**, resumen de los cambios en la pendiente de los EFP antes (control, café) y 50-60 después de la aplicación del HFS (tardía, verde) en ausencia y presencia de FAC y D-ser. ** $p < 0.01$, ANOVA de una vía de medidas repetidas, seguida de una prueba posthoc Fisher. **C**, análisis de la proporción de las respuestas sinápticas producidas por la estimulación de pulsos pareado en las mismas condiciones que en **A** para el componente tardío. Se muestran trazos representativos de las respuestas sinápticas registradas antes (control, café) y 60 min después de la aplicación del HFS en ausencia y presencia de FAC y D-ser.

7. DISCUSIÓN

La participación de las células gliales en el funcionamiento del SNC es ahora un hecho innegable, sin embargo, su participación como mediadores de los efectos de algunas drogas, como la nicotina, para inducir cambios fisiológicos no había sido examinado. En el presente trabajo mostramos primero que el FAC, al disminuir las respuestas de Ca^{2+} inducidas por ATP y nicotina, es una buena herramienta para interferir con la función de los astrocitos. Además, con la ayuda de esta gliotoxina mostramos que la D-serina endógena liberada por los astrocitos, al actuar como un co-agonista de los receptores NMDA, es esencial para que la nicotina potencie la transmisión sináptica en la región CA1 del hipocampo de la rata.

7.1 El fluoroacetato como una herramienta para afectar las respuestas de Ca^{+2} de los astrocitos

Las células gliales expresan nAChRs y responden a diferentes agonistas como la acetilcolina, la colina y la nicotina con incrementos en la concentración de Ca^{2+} (Sharma y Vijayaraghavan, 2001; Oikawa et al., 2005; Delbro et al., 2009; Velez-Fort et al., 2009; Shen y Yakel, 2012). La activación de los nAChRs en los astrocitos permite la entrada de Ca^{2+} el cual puede además inducir la liberación de Ca^{2+} de los reservorios intracelulares (Sharma y Vijayaraghavan, 2001). Las diferencias en los perfiles de las respuestas de Ca^{2+} inducidas por nicotina podrían ser explicadas por la expresión de diferentes subunidades de nAChRs. Debido a que la permeabilidad del Ca^{2+} es casi 15 veces más alta para los receptores $\alpha 7$ que para los $\alpha 4\beta 2$ (Fucile, 2004), los astrocitos que expresen subunidades $\alpha 7$ tendrían entonces señales de Ca^{2+} más rápidas y de mayor amplitud que los que expresan las subunidades $\alpha 4\beta 2$. En condiciones fisiológicas, estos receptores pueden ser activados por aferentes colinérgicas provenientes del septum o de la banda diagonal de Broca (Navarrete et al., 2012), y también por nicotina en fumadores activos y pasivos (Le Houezec, 2003).

Por otro lado, es bien sabido que la mayoría de los astrocitos responden al ATP con incrementos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ debido a que expresan receptores ionotrópicos (P2X) y

metabotrópicos (P2Y) (Koizumi, 2010; James et al., 2011). Los receptores P2X son permeables a Na^+ , K^+ , y Ca^{2+} mientras que los receptores P2Y están acoplados a proteínas G que activan la vía de la fosfolipasa C/inositol trifosfato con la subsecuente liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (Koizumi, 2010; Butt, 2011). Los receptores P2X son también permeables a ATP, el cual puede ser liberado en respuesta a la actividad neuronal y glial y activar así a astrocitos vecinos, produciendo una onda de Ca^{2+} poblacional (Guthrie et al., 1999; Koizumi, 2010; Butt, 2011). En el presente trabajo, la administración de FAC disminuyó también las respuestas de Ca^{2+} inducidas por ATP, lo cual podría implicar que los efectos del FAC no están restringidos a la interferencia con la función en los astrocitos, sino que además puede ser extendida a la comunicación entre los astrocitos y consecuentemente afectar las respuestas de Ca^{2+} inducidas por otras sustancias.

Los mecanismos por los cuales el FAC afecta las respuestas de Ca^{2+} inducidas por nicotina y ATP es aún poco claro, aunque parecen ser diferentes para nicotina y para ATP. Podría ser una consecuencia del bloqueo del metabolismo oxidativo de los astrocitos y por lo tanto la disminución en la formación de intermediarios del ciclo del ácido tricarbólico como el citrato, la glutamina y el ATP (Fonnum et al., 1997). Por ejemplo, el ATP intracelular se requiere para la fosforilación de las proteínas (Edelman et al., 1987) y por lo tanto podría modular el funcionamiento de los nAChRs y purinérgicos así como la actividad de sus respectivas vías intracelulares. Así, las respuestas de Ca^{2+} inducidas por ATP o nicotina podrían ser diferencialmente afectadas, siendo más sensible al FAC la vía de la nicotina. Debido a que los astrocitos responden a la actividad glial y neuronal con respuestas de Ca^{2+} , y los incrementos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ son esenciales para la liberación de gliotransmisores (Schipke y Kettenmann, 2004; Koizumi, 2010), resultan congruentes las tendencias de los experimentos con HPLC, en donde el FAC disminuye los niveles de D-serina inducidos por la administración de ATP.

7.2 La D-serina glial como elemento indispensable en los procesos de plasticidad sináptica producidos por nicotina

La nicotina modula la transmisión sináptica y facilita la inducción de la potenciación a través de la activación de los nAChRs (Yamazaki et al., 2006; Nakauchi et al., 2007; Albuquerque et al., 2009). Más aun, la activación de los nAChRs *per se* incrementa la transmisión sináptica en el hipocampo y otras estructuras cerebrales (Matsuyama et al., 2000; Wang et al., 2001; Yamazaki et al., 2006; Tang y Dani, 2009). Además del papel importante de las neuronas, en el presente trabajo mostramos que el bloqueo de la función de las células gliales con FAC es suficiente para bloquear por completo los efectos de la nicotina sobre la transmisión sináptica.

En el hipocampo, distintos tipos de plasticidad sináptica dependen de la disponibilidad de D-serina (Zhang et al., 2008; Henneberger et al., 2010; Papouin et al., 2012). Por otro lado, la potenciación de la transmisión sináptica inducida por nicotina depende de la actividad del receptor NMDA (Yamazaki et al., 2006, López-Hidalgo et al., 2012). De esta manera, era muy probable que la D-serina estuviera mediando los efectos de la nicotina. Los resultados del presente trabajo indican que los astrocitos, muy probablemente a través de la liberación de D-serina, determinan la plasticidad sináptica inducida por nicotina que depende de los receptores NMDA. Esto se basa en nuestros hallazgos de que la D-serina exógena restaura por completo los efectos de la nicotina sobre la plasticidad sináptica que habían sido previamente bloqueados por el FAC. Este hallazgo es congruente con reportes previos en donde el FAC disminuye los niveles de D-serina (pero no de glicina) en la corteza prefrontal. (Kanematsu et al., 2006; Fossat et al., 2011).

Aunque la D-serina y su enzima sintetizadora (la serina racemasa) han sido encontradas en neuronas (Williams et al., 2006; Miya et al., 2008; Rosenberg et al., 2010; Wolosker, 2011), la D-serina proveniente de las neuronas no fue capaz de mantener los efectos de la nicotina cuando las células gliales fueron arrestadas con FAC. Este hecho refuerza la idea de que los astrocitos son la principal fuente de este aminoácido (Mothet et al., 2006; Oliet y Mothet, 2009). En el presente trabajo

mostramos además que la nicotina no facilita la transmisión sináptica cuando la D-serina endógena es degradada por efecto de la DAAO. Este resultado corrobora la necesidad de este gliotransmisor y también, debido a que la DAAO no degrada a la glicina (Zhang et al., 2008), excluye una posible participación de la glicina endógena como mediador de los efectos de la nicotina.

El FAC ha sido ampliamente usado para bloquear las funciones gliales (Muir et al., 1986; Ikeda y Murase, 2004; Zhang et al., 2008; Fossat et al., 2011). Algunas de las consecuencias de la administración del FAC son la reducción de las concentraciones del ATP en los elementos gliales pero no en los neuronales (Keyser y Pellmar, 1994), así como la inhibición de la liberación de glutamina, ATP, adenosina y glutamato de las células gliales (Heinrich et al., 2012; Uwechue et al., 2012). Diversos autores refieren una disminución en la transmisión sináptica por efecto de la administración del FAC. Sin embargo (Berg-Johnsen et al., 1993; Larrosa et al., 2006; Canals et al., 2008; Bonansco et al., 2011), también ha sido reportado que el FAC no afecta la actividad espontánea de los potenciales postsinápticos (Bacci et al., 2002) y que incrementa la transmisión glutamatérgica mediada por receptores AMPA, pero no las mediadas por receptores NMDA (Henneberger et al., 2010; López-Hidalgo et al., 2012). Esta potenciación de la transmisión sináptica por el FAC puede ser explicado como una reducción de los astrocitos para recapturar glutamato de la hendidura sináptica (Swanson y Graham, 1994) y/o por la disminución de la transmisión sináptica inhibitoria mediada por los astrocitos (Kang et al., 1998).

En el presente trabajo mostramos que los astrocitos responden a la nicotina con incrementos de Ca^{2+} el cual es un requisito para la exocitosis de D-serina (Mothet et al., 2005). Por otro lado, el FAC es capaz de reducir los incrementos de Ca^{2+} inducidos por ATP y nicotina (López-Hidalgo et al., 2012) y reduce las respuestas de Ca^{2+} en astrocitos inducidas por la activación de receptores acoplados a proteínas G (Greenwood y Bushell, 2010; Gibbs et al., 2012). Más aun, el FAC disminuye la liberación de D-serina en rebanadas de corteza prefrontal (Kanematsu et al., 2006; Fossat et al., 2012), así como la liberación de D-serina inducida por ATP de astrocitos hipocámpales en cultivo (el presente trabajo). De esta manera, es muy posible que la

nicotina esté actuando directamente sobre los astrocitos para inducir la liberación de D-serina. De esta manera, cuando el FAC es administrado, se disminuyen los incrementos de Ca^{2+} inducidos por nicotina con la subsecuente reducción de los niveles de D-serina, lo que podría afectar la función del receptor NMDA, necesario para la plasticidad inducida por nicotina (Yamazaki et al., 2002; Yamazaki et al., 2006) y por HFS.

La mayoría de los cambios en la transmisión sináptica en la región CA1 del hipocampo requiere de la activación de los receptores NMDA (Malenka y Nicoll, 1993; Citri y Malenka, 2008). Estos receptores sirven como detectores de coincidencia de la actividad pre y postsináptica (Malenka y Bear, 2004) debido a que requieren, además de la presencia de glutamato y del co-agonista, una despolarización de la membrana para remover el bloqueo del Mg^{2+} de su canal iónico (Mayer et al., 1984).

En el presente trabajo, nosotros observamos una disminución de la PPR durante la administración de la nicotina, lo que sugiere un incremento en la liberación de glutamato por parte de las colaterales de Schaffer. Esto puede ser explicado por la activación de nAChRs presinápticos por parte de la nicotina. Sin embargo, otra posible explicación es que la nicotina promoviera la liberación de glutamato de los astrocitos, el cual activaría a los receptores metabotrópicos de glutamato, los cuales a su vez inducen la liberación de glutamato por parte de las colaterales de Schaffer (Perea y Araque, 2007; Bonansco et al., 2011). Sin embargo, 15 min después de la administración de nicotina, el efecto sobre la liberación de glutamato podría haber sido lavado dejando únicamente mecanismos postsinapticos para sostener el incremento en la transmisión sináptica de larga duración. En este contexto, un posible escenario podría ser que en presencia de nicotina, diversos efectos participaran en conjunto: una desinhibición de las interneuronas GABAérgicas (Rosato-Siri et al., 2006; Yamazaki et al., 2006), un incremento en la excitabilidad de las neuronas postsinápticas (Szabo et al., 2008; Albuquerque et al., 2009), un incremento en la liberación de glutamato (Le Magueresse y Cherubini, 2007; Nakauchi et al., 2007; Jia et al., 2009), y la liberación de D-serina de los astrocitos (López-Hidalgo et al., 2012) para incrementar la transmisión sináptica dependiente de NMDA. Una representación parcial de estos eventos se muestra en la figura 14. Tomando todo esto en consideración, resulta

comprensible que la D-serina exógena, por sí sola, no indujera ningún incremento sobre la transmisión sináptica.

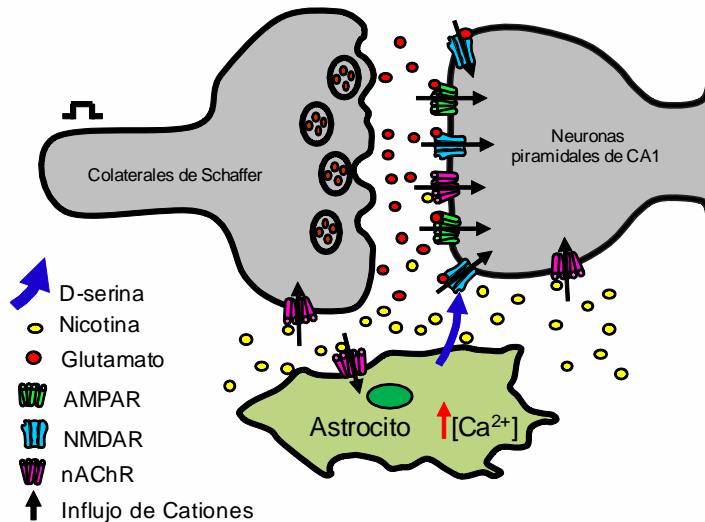


Figura. 14. Esquema que resume los mecanismos implicados en la potenciación de la transmisión sináptica producida por la administración de nicotina.

El glutamato liberado por las colaterales de Schaffer por la estimulación eléctrica del pulso de prueba y la activación de nAChRs presentes en la presinapsis, interactúa con receptores AMPA y NMDA en la neurona postsináptica. La nicotina activaría también nAChRs presentes en los astrocitos. En estos últimos induciría un incremento de Ca^{2+} con la subsecuente liberación de D-serina que se uniría a los receptores NMDA de la postsinapsis. Al mismo tiempo, la nicotina activaría receptores nicotínicos en la membrana de las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo.

Los astrocitos modulan las sinapsis CA3-CA1 a través de la liberación de diversos gliotransmisores (además de la D-serina) como el ATP (Fellin et al., 2006; Gibbs et al., 2012) y el glutamato (Perea y Araque, 2007; Bonansco et al., 2011). En el presente trabajo el papel de la D-serina en los efectos de larga duración de la nicotina fue analizado. Sin embargo, más experimentos son necesarios para evaluar un posible papel de otros gliotransmisores como posibles mediadores de los efectos de la nicotina sobre la transmisión sináptica y la plasticidad. De particular importancia es el glutamato

liberado por los astrocitos que podría estar participando en los efectos tempranos de la nicotina.

Aunque la relación entre los mecanismos celulares de la plasticidad sináptica y los procesos cognitivos no es aún clara, existe un consenso de que aquellos representan los fundamentos básicos de la memoria y el aprendizaje (Bliss y Collingridge, 1993; Lynch, 2004; Whitlock et al., 2006). En concordancia con esto, resultados del laboratorio en colaboración con el grupo del Dr. Roberto Prado, muestran que el FAC produce amnesia cuando se evalúa la memoria de largo plazo utilizando la tarea de evitación inhibitoria y que se restaura por completo cuando se administra D-serina (100 μM *ic*) exógena. Estos mismos resultados se observan con la facilitación de la memoria de largo plazo inducida por la administración de nicotina intraperitoneal (0.4 mg/kg), el arresto de los astrocitos es suficiente para bloquear por completo los efectos amnésicos de la nicotina y al igual que sucede con la memoria basal, se revierten por completo cuando se administró D-serina (**Fig. 15**) (Salgado-Puga, 2010; Lopez-Hidalgo et al., 2012).

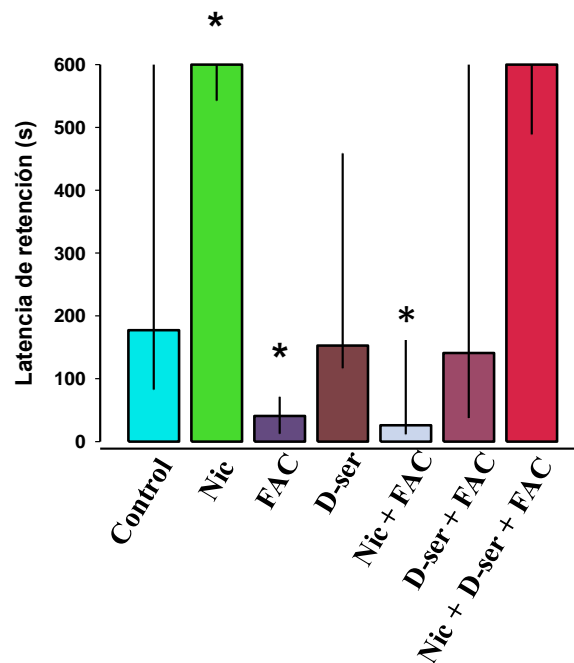


Figura 15. Efecto de la nicotina, el FAC y la D-serina sobre la consolidación de la memoria de largo plazo en la tarea de evitación inhibitoria. La administración de nicotina (0.4 mg/ kg de peso. *ip*) aumenta la memoria de largo plazo medida como la latencia de retención en la tarea de evitación inhibitoria. La administración de FAC (5 mM, *ic*) sola o 40 min antes de la administración de nicotina produce amnesia. La administración de D-serina (100 μ M, *ic*) es capaz de revertir la amnesia producida por el FAC tanto en condiciones basales como la estimulada por nicotina. Se grafica la mediana y el rango intercuartilar de la latencia de retención . * $p < 0.05$ Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney. nicotina (Nic); D-serina (D-ser); Fluoroacetato (FAC).

La señalización colinérgica mediada por receptores nicotínicos y muscarínicos participa en la transmisión sináptica y plasticidad del hipocampo (Marti Barros et al., 2004; Hasselmo, 2006; Levin et al., 2006; Kenney y Gould, 2008; Fernandez de Sevilla y Buno, 2010). Los astrocitos han sido implicados como mediadores de la acetilcolina (Araque et al., 2002; Perea y Araque, 2005; Guizzetti et al., 2008). Recientemente fue reportado que la estimulación de las aferentes colinérgicas median la plasticidad sináptica a través de la activación de receptores muscarínicos presentes en los astrocitos (Takata et al., 2011; Navarrete et al., 2012). En el hipocampo, la potenciación de larga

duración de la transmisión sináptica inducida por acetilcolina fue analizada en presencia de un bloqueador de receptores de NMDA (Navarrete et al., 2012). En este sentido, un posible papel de la D-serina no fue considerado. Sin embargo, una posibilidad interesante a evaluar es si los astrocitos usan diferentes mecanismos para modular la plasticidad sináptica inducida en condiciones fisiológicas por acetilcolina, o por nicotina cuando se fuma.

7.3 Perspectivas en la terapéutica de condiciones patológicas

La adicción a las drogas se encuentra íntimamente relacionada con los procesos de aprendizaje y memoria. De hecho, ha sido previamente reportado que la nicotina modifica los mismos mecanismos celulares usados para el aprendizaje y la memoria para inducir la adicción (Dani et al., 2001; Nestler, 2002; Robbins y Everitt, 2002; Kelley, 2004; Placzek et al., 2009; Zhang et al., 2010). Debido a que los astrocitos median los efectos de la nicotina en la memoria de largo plazo (Lopez-Hidalgo et al., 2012) y existe un incremento de las respuestas mediadas por receptores NMDA en respuesta a la administración crónica de nicotina (Yamazaki et al., 2006), existe la posibilidad de que los astrocitos (probablemente a través de la liberación de D-serina) pudieran estar involucrados en la adicción de la nicotina. En este sentido sería interesante analizar si las interacciones físicas y químicas entre las neuronas y los astrocitos hipocampales se encuentran modificadas durante la adicción y si estas interacciones juegan un papel en el establecimiento de la adicción.

La señalización colinérgica mediada por nAChRs se encuentra implicada también en condiciones fisiopatológicas tales como las enfermedades de Alzheimer y Parkinson (Quik et al., 2007; Srivareerat et al., 2011), la esquizofrenia (Brunzell y McIntosh, 2012) y la depresión (Mineur y Picciotto, 2010), entre muchas otras. De esta manera, el papel de los astrocitos como mediadores de los efectos de la nicotina en estas patologías necesita ser analizado. Algunas preguntas surgen en este sentido: ¿Están involucrados los astrocitos en el efecto neuroprotector de la nicotina contra la pérdida de las neuronas dopaminérgicas (Quik et al., 2007)?, ¿participan los astrocitos

en la potenciación de larga duración inducida por nicotina en el sistema mesolímbico dopaminérgico relacionado con los sistemas de recompensa y la adicción a las drogas (Mansvelder y McGehee, 2000)? En este sentido, experimentos adicionales deberán ser enfocados para responder estas preguntas y entender el papel de los astrocitos en los efectos de la nicotina, así como en el complejo funcionamiento del SNC, que nos permitan, además, el desarrollo de nuevas estrategias, así como el desarrollo de drogas que ayude a mejorar la calidad de vida de los pacientes.

8. BIBLIOGRAFIA

- Agulhon C, Fiacco TA, McCarthy KD (2010) Hippocampal short- and long-term plasticity are not modulated by astrocyte Ca²⁺ signaling. *Science* 327:1250-1254.
- Albensi BC, Oliver DR, Toupin J, Odero G (2007) Electrical stimulation protocols for hippocampal synaptic plasticity and neuronal hyper-excitability: are they effective or relevant? *Exp Neurol* 204:1-13.
- Albuquerque EX, Pereira EF, Alkondon M, Rogers SW (2009) Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 89:73-120.
- Angulo MC, Kozlov AS, Charpak S, Audinat E (2004) Glutamate released from glial cells synchronizes neuronal activity in the hippocampus. *J Neurosci* 24:6920-6927.
- Araque A, Martin ED, Perea G, Arellano JI, Buno W (2002) Synaptically released acetylcholine evokes Ca²⁺ elevations in astrocytes in hippocampal slices. *J Neurosci* 22:2443-2450.
- Araque A, Sanzgiri RP, Parpura V, Haydon PG (1999) Astrocyte-induced modulation of synaptic transmission. *Can J Physiol Pharmacol* 77:699-706.
- Bacci A, Sancini G, Verderio C, Armano S, Pravettoni E, Fesce R, Franceschetti S, Matteoli M (2002) Block of glutamate-glutamine cycle between astrocytes and neurons inhibits epileptiform activity in hippocampus. *J Neurophysiol* 88:2302-2310.
- Bass NH, Hess HH, Pope A, Thalheimer C (1971) Quantitative cytoarchitectonic distribution of neurons, glia, and DNA in rat cerebral cortex. *J Comp Neurol* 143:481-490.
- Berg-Johnsen J, Paulsen RE, Fonnum F, Langmoen IA (1993) Changes in evoked potentials and amino acid content during fluorocitrate action studied in rat hippocampal cortex. *Exp Brain Res* 96:241-246.
- Bezzi P, Carmignoto G, Pasti L, Vesce S, Rossi D, Rizzini BL, Pozzan T, Volterra A (1998) Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. *Nature* 391:281-285.
- Bliss TV, Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361:31-39.
- Bliss TV, Gardner-Medwin AR (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232:357-374.
- Bonansco C, Couve A, Perea G, Ferradas CA, Roncagliolo M, Fuenzalida M (2011) Glutamate released spontaneously from astrocytes sets the threshold for synaptic plasticity. *Eur J Neurosci* 33:1483-1492.
- Brunzell DH, McIntosh JM (2012) Alpha7 nicotinic acetylcholine receptors modulate motivation to self-administer nicotine: implications for smoking and schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 37:1134-1143.
- Bushong EA, Martone ME, Jones YZ, Ellisman MH (2002) Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J Neurosci* 22:183-192.

- Butt AM (2011) ATP: a ubiquitous gliotransmitter integrating neuron-glia networks. *Semin Cell Dev Biol* 22:205-213.
- Canals S, Larrosa B, Pintor J, Mena MA, Herreras O (2008) Metabolic challenge to glia activates an adenosine-mediated safety mechanism that promotes neuronal survival by delaying the onset of spreading depression waves. *J Cereb Blood Flow Metab* 28:1835-1844.
- Citri A, Malenka RC (2008) Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 33:18-41.
- Coco S, Calegari F, Pravettoni E, Pozzi D, Taverna E, Rosa P, Matteoli M, Verderio C (2003) Storage and release of ATP from astrocytes in culture. *J Biol Chem* 278:1354-1362.
- D'Antoni S, Berretta A, Bonaccorso CM, Bruno V, Aronica E, Nicoletti F, Catania MV (2008) Metabotropic glutamate receptors in glial cells. *Neurochem Res* 33:2436-2443.
- Dani JA, De Biasi M (2001) Cellular mechanisms of nicotine addiction. *Pharmacol Biochem Behav* 70:439-446.
- Dani JA, Ji D, Zhou FM (2001) Synaptic plasticity and nicotine addiction. *Neuron* 31:349-352.
- Decker MW, Majchrzak MJ, Anderson DJ (1992) Effects of nicotine on spatial memory deficits in rats with septal lesions. *Brain Res* 572:281-285.
- Delbro D, Westerlund A, Bjorklund U, Hansson E (2009) In inflammatory reactive astrocytes co-cultured with brain endothelial cells nicotine-evoked Ca(2+) transients are attenuated due to interleukin-1beta release and rearrangement of actin filaments. *Neuroscience* 159:770-779.
- Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF (1999) The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 51:7-61.
- Edelman AM, Blumenthal DK, Krebs EG (1987) Protein serine/threonine kinases. *Annu Rev Biochem* 56:567-613.
- Fellin T, Pascual O, Haydon PG (2006) Astrocytes coordinate synaptic networks: balanced excitation and inhibition. *Physiology (Bethesda)* 21:208-215.
- Fernandez de Sevilla D, Buno W (2010) The muscarinic long-term enhancement of NMDA and AMPA receptor-mediated transmission at Schaffer collateral synapses develop through different intracellular mechanisms. *J Neurosci* 30:11032-11042.
- Fields RD, Stevens-Graham B (2002) New insights into neuron-glia communication. *Science* 298:556-562.
- Fonnum F, Johnsen A, Hassel B (1997) Use of fluorocitrate and fluoroacetate in the study of brain metabolism. *Glia* 21:106-113.
- Fossat P, Turpin FR, Sacchi S, Dulong J, Shi T, Rivet JM, Sweedler JV, Pollegioni L, Millan MJ, Olié SH, Mothet JP (2011) Glial D-serine gates NMDA receptors at excitatory synapses in prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 22:595-606.
- Fossat P, Turpin FR, Sacchi S, Dulong J, Shi T, Rivet JM, Sweedler JV, Pollegioni L, Millan MJ, Olié SH, Mothet JP (2012) Glial D-serine gates NMDA receptors at excitatory synapses in prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 22:595-606.
- Fucile S (2004) Ca²⁺ permeability of nicotinic acetylcholine receptors. *Cell Calcium* 35:1-8.

- Fujii S, Jia Y, Yang A, Sumikawa K (2000) Nicotine reverses GABAergic inhibition of long-term potentiation induction in the hippocampal CA1 region. *Brain Res* 863:259-265.
- Gahring LC, Persiyarov K, Rogers SW (2004) Neuronal and astrocyte expression of nicotinic receptor subunit beta4 in the adult mouse brain. *J Comp Neurol* 468:322-333.
- Gibbs ME, Shleper M, Mustafa T, Burnstock G, Bowser DN (2012) ATP derived from astrocytes modulates memory in the chick. *Neuron Glia Biol* 1-10.
- Greenwood SM, Bushell TJ (2010) Astrocytic activation and an inhibition of MAP kinases are required for proteinase-activated receptor-2-mediated protection from neurotoxicity. *J Neurochem* 113:1471-1480.
- Guizzetti M, Moore NH, Giordano G, Costa LG (2008) Modulation of neuritogenesis by astrocyte muscarinic receptors. *J Biol Chem* 283:31884-31897.
- Guthrie PB, Knappenberger J, Segal M, Bennett MV, Charles AC, Kater SB (1999) ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves. *J Neurosci* 19:520-528.
- Hasselmo ME (2006) The role of acetylcholine in learning and memory. *Curr Opin Neurobiol* 16:710-715.
- Haydon PG, Blendy J, Moss SJ, Rob Jackson F (2009) Astrocytic control of synaptic transmission and plasticity: a target for drugs of abuse? *Neuropharmacology* 56 Suppl 1:83-90.
- He J, Deng CY, Zhu XN, Yu JP, Chen RZ (2003) Different synaptic mechanisms of long-term potentiation induced by nicotine and tetanic stimulation in hippocampal CA1 region of rats. *Acta Pharmacol Sin* 24:398-402.
- Heinrich A, Ando R, Turi G, Rozsa B, Sperlagh B (2012) K(+) depolarization evokes ATP, adenosine and glutamate release from glia in rat hippocampus: a microelectrode biosensor study. *Br J Pharmacol*
- Henneberger C, Papouin T, Oliet SH, Rusakov DA (2010) Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes. *Nature* 463:232-236.
- Hernández-Morales M (2009) Efectos de la nicotina sobre la corriente de potasio y receptores nicotínicos en astrocitos de la region CA1 del hipocampo. Tesis de doctorado, pp 1- 81 Queretaro: UNAM.
- Hernandez-Morales M, Garcia-Colunga J (2009) Effects of nicotine on K⁺ currents and nicotinic receptors in astrocytes of the hippocampal CA1 region. *Neuropharmacology* 56:975-983.
- Hukkanen J, Jacob P, 3rd, Benowitz NL (2005) Metabolism and disposition kinetics of nicotine. *Pharmacol Rev* 57:79-115.
- Ikeda H, Murase K (2004) Glial nitric oxide-mediated long-term presynaptic facilitation revealed by optical imaging in rat spinal dorsal horn. *J Neurosci* 24:9888-9896.
- Ikeda H, Tsuda M, Inoue K, Murase K (2007) Long-term potentiation of neuronal excitation by neuron-glia interactions in the rat spinal dorsal horn. *Eur J Neurosci* 25:1297-1306.
- James LR, Andrews S, Walker S, de Sousa PR, Ray A, Russell NA, Bellamy TC (2011) High-throughput analysis of calcium signalling kinetics in astrocytes stimulated with different neurotransmitters. *PLoS One* 6:e26889.

- Jia Y, Yamazaki Y, Nakauchi S, Sumikawa K (2009) Alpha2 nicotine receptors function as a molecular switch to continuously excite a subset of interneurons in rat hippocampal circuits. *Eur J Neurosci* 29:1588-1603.
- Jones GM, Sahakian BJ, Levy R, Warburton DM, Gray JA (1992) Effects of acute subcutaneous nicotine on attention, information processing and short-term memory in Alzheimer's disease. *Psychopharmacology (Berl)* 108:485-494.
- Jourdain P, Bergersen LH, Bhaukaurally K, Bezzi P, Santello M, Domercq M, Matute C, Tonello F, Gundersen V, Volterra A (2007) Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength. *Nat Neurosci* 10:331-339.
- Kanematsu S, Ishii S, Umino A, Fujihira T, Kashiwa A, Yamamoto N, Kurumaji A, Nishikawa T (2006) Evidence for involvement of glial cell activity in the control of extracellular D-serine contents in the rat brain. *J Neural Transm* 113:1717-1721.
- Kang J, Jiang L, Goldman SA, Nedergaard M (1998) Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nat Neurosci* 1:683-692.
- Kelley AE (2004) Memory and addiction: shared neural circuitry and molecular mechanisms. *Neuron* 44:161-179.
- Kenney JW, Gould TJ (2008) Modulation of hippocampus-dependent learning and synaptic plasticity by nicotine. *Mol Neurobiol* 38:101-121.
- Keyser DO, Pellmar TC (1994) Synaptic transmission in the hippocampus: critical role for glial cells. *Glia* 10:237-243.
- Kirschuk S, Parpura V, Verkhratsky A (2012) Sodium dynamics: another key to astroglial excitability? *Trends Neurosci* 35:497-506.
- Koizumi S (2010) Synchronization of Ca²⁺ oscillations: involvement of ATP release in astrocytes. *FEBS J* 277:286-292.
- Kreft M, Bak LK, Waagepetersen HS, Schousboe A (2012) Aspects of astrocyte energy metabolism, amino acid neurotransmitter homeostasis and metabolic compartmentation. *ASN Neuro* 4:
- Kullmann DM, Lamsa KP (2007) Long-term synaptic plasticity in hippocampal interneurons. *Nat Rev Neurosci* 8:687-699.
- Laming PR, Kimelberg H, Robinson S, Salm A, Hawrylak N, Muller C, Roots B, Ng K (2000) Neuronal-glial interactions and behaviour. *Neurosci Biobehav Rev* 24:295-340.
- Largo C, Cuevas P, Somjen GG, Martin del Rio R, Herreras O (1996) The effect of depressing glial function in rat brain in situ on ion homeostasis, synaptic transmission, and neuron survival. *J Neurosci* 16:1219-1229.
- Larrosa B, Pastor J, Lopez-Aguado L, Herreras O (2006) A role for glutamate and glia in the fast network oscillations preceding spreading depression. *Neuroscience* 141:1057-1068.
- Le Houezec J (2003) Role of nicotine pharmacokinetics in nicotine addiction and nicotine replacement therapy: a review. *Int J Tuberc Lung Dis* 7:811-819.
- Le Magueresse C, Cherubini E (2007) Presynaptic calcium stores contribute to nicotine-elicited potentiation of evoked synaptic transmission at CA3-CA1 connections in the neonatal rat hippocampus. *Hippocampus* 17:316-325.
- Levin ED (2002) Nicotinic receptor subtypes and cognitive function. *J Neurobiol* 53:633-640.

- Levin ED, Christopher NC, Briggs SJ, Rose JE (1993) Chronic nicotine reverses working memory deficits caused by lesions of the fimbria or medial basalocortical projection. *Brain Res Cogn Brain Res* 1:137-143.
- Levin ED, McClernon FJ, Rezvani AH (2006) Nicotinic effects on cognitive function: behavioral characterization, pharmacological specification, and anatomic localization. *Psychopharmacology (Berl)* 184:523-539.
- Liu T, Sun L, Xiong Y, Shang S, Guo N, Teng S, Wang Y, Liu B, Wang C, Wang L, Zheng L, Zhang CX, Han W, Zhou Z (2011) Calcium triggers exocytosis from two types of organelles in a single astrocyte. *J Neurosci* 31:10593-10601.
- Lopez-Hidalgo M, Salgado-Puga K, Alvarado-Martinez R, Medina AC, Prado-Alcala RA, Garcia-Colunga J (2012) Nicotine Uses Neuron-Glia Communication to Enhance Hippocampal Synaptic Transmission and Long-term Memory. *PLoS One* 7:e49998.
- Lynch MA (2004) Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev* 84:87-136.
- Magistretti PJ (2006) Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. *J Exp Biol* 209:2304-2311.
- Malenka RC, Bear MF (2004) LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 44:5-21.
- Malenka RC, Nicoll RA (1993) NMDA-receptor-dependent synaptic plasticity: multiple forms and mechanisms. *Trends Neurosci* 16:521-527.
- Mansvelder HD, McGehee DS (2000) Long-term potentiation of excitatory inputs to brain reward areas by nicotine. *Neuron* 27:349-357.
- Marti Barros D, Ramirez MR, Dos Reis EA, Izquierdo I (2004) Participation of hippocampal nicotinic receptors in acquisition, consolidation and retrieval of memory for one trial inhibitory avoidance in rats. *Neuroscience* 126:651-656.
- Matsuyama S, Matsumoto A (2003) Epibatidine induces long-term potentiation (LTP) via activation of alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) in vivo in the intact mouse dentate gyrus: both alpha7 and alpha4beta2 nAChRs essential to nicotinic LTP. *J Pharmacol Sci* 93:180-187.
- Matsuyama S, Matsumoto A, Enomoto T, Nishizaki T (2000) Activation of nicotinic acetylcholine receptors induces long-term potentiation in vivo in the intact mouse dentate gyrus. *Eur J Neurosci* 12:3741-3747.
- Mayer ML, Westbrook GL, Guthrie PB (1984) Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature* 309:261-263.
- Mejia-Toiber JA (2010) Caracterización funcional *in vitro* e *in vivo* de las líneas celulares GABAérgicas MS213-20 y M213-20 CL-4, provenientes de la eminencia ganglionar de la rata Sprague-Dawley. Tesis de doctorado, pp 1-76 Querétaro: UNAM.
- Mineur YS, Picciotto MR (2010) Nicotine receptors and depression: revisiting and revising the cholinergic hypothesis. *Trends Pharmacol Sci* 31:580-586.
- Miya K, Inoue R, Takata Y, Abe M, Natsume R, Sakimura K, Hongou K, Miyawaki T, Mori H (2008) Serine racemase is predominantly localized in neurons in mouse brain. *J Comp Neurol* 510:641-654.
- Morris RG, Hagan JJ, Rawlins JN (1986) Allocentric spatial learning by hippocampectomised rats: a further test of the "spatial mapping" and "working memory" theories of hippocampal function. *Q J Exp Psychol B* 38:365-395.

- Mothet JP, Parent AT, Wolosker H, Brady RO, Jr., Linden DJ, Ferris CD, Rogawski MA, Snyder SH (2000) D-serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:4926-4931.
- Mothet JP, Pollegioni L, Ouanounou G, Martineau M, Fossier P, Baux G (2005) Glutamate receptor activation triggers a calcium-dependent and SNARE protein-dependent release of the gliotransmitter D-serine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:5606-5611.
- Mothet JP, Rouaud E, Sinet PM, Potier B, Jouvenceau A, Dutar P, Videau C, Epelbaum J, Billard JM (2006) A critical role for the glial-derived neuromodulator D-serine in the age-related deficits of cellular mechanisms of learning and memory. *Aging Cell* 5:267-274.
- Muir D, Berl S, Clarke DD (1986) Acetate and fluoroacetate as possible markers for glial metabolism in vivo. *Brain Res* 380:336-340.
- Nakauchi S, Brennan RJ, Boulter J, Sumikawa K (2007) Nicotine gates long-term potentiation in the hippocampal CA1 region via the activation of alpha2* nicotinic ACh receptors. *Eur J Neurosci* 25:2666-2681.
- Navarrete M, Perea G, Fernandez de Sevilla D, Gomez-Gonzalo M, Nunez A, Martin ED, Araque A (2012) Astrocytes mediate in vivo cholinergic-induced synaptic plasticity. *PLoS Biol* 10:e1001259.
- Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA (2003) New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci* 26:523-530.
- Nestler EJ (2002) Common molecular and cellular substrates of addiction and memory. *Neurobiol Learn Mem* 78:637-647.
- Newhouse P, Tatro A, Naylor M, Quealey K, Delgado P (2002) Alzheimer disease, serotonin systems, and tryptophan depletion. *Am J Geriatr Psychiatry* 10:483-484.
- Nimmerjahn A (2009) Astrocytes going live: advances and challenges. *J Physiol* 587:1639-1647.
- O'Dowd BS, Gibbs ME, Sedman GL, Ng KT (1994) Astrocytes implicated in the energizing of intermediate memory processes in neonate chicks. *Brain Res Cogn Brain Res* 2:93-102.
- Oikawa H, Nakamichi N, Kambe Y, Ogura M, Yoneda Y (2005) An increase in intracellular free calcium ions by nicotinic acetylcholine receptors in a single cultured rat cortical astrocyte. *J Neurosci Res* 79:535-544.
- Oliet SH, Mothet JP (2009) Regulation of N-methyl-D-aspartate receptors by astrocytic D-serine. *Neuroscience* 158:275-283.
- Panatier A, Theodosis DT, Mothet JP, Touquet B, Pollegioni L, Poulain DA, Oliet SH (2006) Glia-derived D-serine controls NMDA receptor activity and synaptic memory. *Cell* 125:775-784.
- Papouin T, Ladepeche L, Ruel J, Sacchi S, Labasque M, Hanini M, Groc L, Pollegioni L, Mothet JP, Oliet SH (2012) Synaptic and extrasynaptic NMDA receptors are gated by different endogenous coagonists. *Cell* 150:633-646.
- Parpura V, Basarsky TA, Liu F, Jęftinija K, Jęftinija S, Haydon PG (1994) Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature* 369:744-747.
- Perea G, Araque A (2005) Properties of synaptically evoked astrocyte calcium signal reveal synaptic information processing by astrocytes. *J Neurosci* 25:2192-2203.

- Perea G, Araque A (2007) Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science* 317:1083-1086.
- Placzek AN, Zhang TA, Dani JA (2009) Nicotinic mechanisms influencing synaptic plasticity in the hippocampus. *Acta Pharmacol Sin* 30:752-760.
- Quik M, O'Neill M, Perez XA (2007) Nicotine neuroprotection against nigrostriatal damage: importance of the animal model. *Trends Pharmacol Sci* 28:229-235.
- Radcliffe KA, Dani JA (1998) Nicotinic stimulation produces multiple forms of increased glutamatergic synaptic transmission. *J Neurosci* 18:7075-7083.
- Robbins TW, Everitt BJ (2002) Limbic-striatal memory systems and drug addiction. *Neurobiol Learn Mem* 78:625-636.
- Rosato-Siri M, Cattaneo A, Cherubini E (2006) Nicotine-induced enhancement of synaptic plasticity at CA3-CA1 synapses requires GABAergic interneurons in adult anti-NGF mice. *J Physiol* 576:361-377.
- Rose JE, Mukhin AG, Lokitz SJ, Turkington TG, Herskovic J, Behm FM, Garg S, Garg PK (2010) Kinetics of brain nicotine accumulation in dependent and nondependent smokers assessed with PET and cigarettes containing ¹¹C-nicotine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:5190-5195.
- Rosenberg D, Kartvelishvily E, Shleper M, Klinker CM, Bowser MT, Wolosker H (2010) Neuronal release of D-serine: a physiological pathway controlling extracellular D-serine concentration. *FASEB J* 24:2951-2961.
- Salgado-Puga K (2010) Participación de los astrocitos en la memoria de largo plazo facilitada por nicotina. Tesis de licenciatura, pp 1-56 Querétaro: UNAM.
- Schipke CG, Kettenmann H (2004) Astrocyte responses to neuronal activity. *Glia* 47:226-232.
- Seguela P, Wadiche J, Dineley-Miller K, Dani JA, Patrick JW (1993) Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain alpha 7: a nicotinic cation channel highly permeable to calcium. *J Neurosci* 13:596-604.
- Sharma G, Vijayaraghavan S (2001) Nicotinic cholinergic signaling in hippocampal astrocytes involves calcium-induced calcium release from intracellular stores. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:4148-4153.
- Shen JX, Yakel JL (2012) Functional alpha7 Nicotinic ACh Receptors on Astrocytes in Rat Hippocampal CA1 Slices. *J Mol Neurosci* 48:14-21.
- Srivareerat M, Tran TT, Salim S, Aleisa AM, Alkadhi KA (2011) Chronic nicotine restores normal Abeta levels and prevents short-term memory and E-LTP impairment in Abeta rat model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 32:834-844.
- Sulston JE, Schierenberg E, White JG, Thomson JN (1983) The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 100:64-119.
- Swanson RA, Graham SH (1994) Fluorocitrate and fluoroacetate effects on astrocyte metabolism in vitro. *Brain Res* 664:94-100.
- Szabo SI, Zelles T, Vizi ES, Lendvai B (2008) The effect of nicotine on spiking activity and Ca²⁺ dynamics of dendritic spines in rat CA1 pyramidal neurons. *Hippocampus* 18:376-385.
- Takata N, Mishima T, Hisatsune C, Nagai T, Ebisui E, Mikoshiba K, Hirase H (2011) Astrocyte calcium signaling transforms cholinergic modulation to cortical plasticity in vivo. *J Neurosci* 31:18155-18165.

- Tang J, Dani JA (2009) Dopamine enables in vivo synaptic plasticity associated with the addictive drug nicotine. *Neuron* 63:673-682.
- Tekkök SB, Ransom BR (2004) The glial-neuronal interactions and signalling: an introduction. In: *Glial neuronal signaling*(Papura, V., ed), pp 1-19.
- Uwechue NM, Marx MC, Chevy Q, Billups B (2012) Activation of glutamate transport evokes rapid glutamine release from perisynaptic astrocytes. *J Physiol* 590:2317-2331.
- Velez-Fort M, Audinat E, Angulo MC (2009) Functional alpha 7-containing nicotinic receptors of NG2-expressing cells in the hippocampus. *Glia* 57:1104-1114.
- Ventura R, Harris KM (1999) Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes. *J Neurosci* 19:6897-6906.
- Verkhatsky A, Rodriguez JJ, Papura V (2012) Calcium signalling in astroglia. *Mol Cell Endocrinol* 353:45-56.
- Wang J, Chen YB, Zhu XN, Chen RZ (2001) Activation of p42/44 mitogen-activated protein kinase pathway in long-term potentiation induced by nicotine in hippocampal CA1 region in rats. *Acta Pharmacol Sin* 22:685-690.
- Whitlock JR, Heynen AJ, Shuler MG, Bear MF (2006) Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science* 313:1093-1097.
- Williams SM, Diaz CM, Macnab LT, Sullivan RK, Pow DV (2006) Immunocytochemical analysis of D-serine distribution in the mammalian brain reveals novel anatomical compartmentalizations in glia and neurons. *Glia* 53:401-411.
- Wolosker H (2011) Serine racemase and the serine shuttle between neurons and astrocytes. *Biochim Biophys Acta* 1814:1558-1566.
- Wollmuth LP, Sobolevsky AI (2004) Structure and gating of the glutamate receptor ion channel. *Trends Neurosci* 27:321-328.
- Yamazaki Y, Hamaue N, Sumikawa K (2002) Nicotine compensates for the loss of cholinergic function to enhance long-term potentiation induction. *Brain Res* 946:148-152.
- Yamazaki Y, Jia Y, Niu R, Sumikawa K (2006) Nicotine exposure in vivo induces long-lasting enhancement of NMDA receptor-mediated currents in the hippocampus. *Eur J Neurosci* 23:1819-1828.
- Yang Y, Ge W, Chen Y, Zhang Z, Shen W, Wu C, Poo M, Duan S (2003) Contribution of astrocytes to hippocampal long-term potentiation through release of D-serine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:15194-15199.
- Zhang TA, Tang J, Pidoplichko VI, Dani JA (2010) Addictive nicotine alters local circuit inhibition during the induction of in vivo hippocampal synaptic potentiation. *J Neurosci* 30:6443-6453.
- Zhang Z, Gong N, Wang W, Xu L, Xu TL (2008) Bell-shaped D-serine actions on hippocampal long-term depression and spatial memory retrieval. *Cereb Cortex* 18:2391-2401.

Nicotine Uses Neuron-Glia Communication to Enhance Hippocampal Synaptic Transmission and Long-term Memory

Mónica López-Hidalgo¹, Karla Salgado-Puga¹, Reynaldo Alvarado-Martínez¹, Andrea Cristina Medina², Roberto A. Prado-Alcalá², Jesús García-Colunga^{1*}

¹ Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla, Querétaro, México,

² Departamento de Neurobiología Conductual y Cognitiva, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla, Querétaro, México

Abstract

Nicotine enhances synaptic transmission and facilitates long-term memory. Now it is known that bi-directional glia-neuron interactions play important roles in the physiology of the brain. However, the involvement of glial cells in the effects of nicotine has not been considered until now. In particular, the gliotransmitter D-serine, an endogenous co-agonist of NMDA receptors, enables different types of synaptic plasticity and memory in the hippocampus. Here, we report that hippocampal long-term synaptic plasticity induced by nicotine was annulled by an enzyme that degrades endogenous D-serine, or by an NMDA receptor antagonist that acts at the D-serine binding site. Accordingly, both effects of nicotine: the enhancement of synaptic transmission and facilitation of long-term memory were eliminated by impairing glial cells with fluoroacetate, and were restored with exogenous D-serine. Together, these results show that glial D-serine is essential for the long-term effects of nicotine on synaptic plasticity and memory, and they highlight the roles of glial cells as key participants in brain functions.

Citation: López-Hidalgo M, Salgado-Puga K, Alvarado-Martínez R, Medina AC, Prado-Alcalá RA, et al. (2012) Nicotine Uses Neuron-Glia Communication to Enhance Hippocampal Synaptic Transmission and Long-term Memory. PLoS ONE 7(11): e49998. doi:10.1371/journal.pone.0049998

Editor: Jean-Pierre Mothet, CNRS - Université Aix Marseille, France

Received: June 8, 2012; **Accepted:** October 19, 2012; **Published:** November 21, 2012

Copyright: © 2012 López-Hidalgo et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by Grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología México (81911 and 128259) and by a Grant from Dirección General de Asuntos del Personal Académico, U.N.A.M. (IN204809). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: garciacolunga@unam.mx

Introduction

The role of astrocytes in the central nervous system has been redefined, and they are now accepted as the third element in the synapses, alongside the pre- and postsynaptic neurons, astrocytes sense neuronal activity and respond with Ca^{2+} elevations which, in turn, can induce the release of gliotransmitters such as ATP, glutamate, and D-serine [1,2]. For instance, astrocytes surround a substantial portion of synapses which are largely glutamatergic [3]. In the hippocampus almost 60% of synapses have an apposed astrocytic process [4,5]. The release of the gliotransmitter D-serine, an endogenous co-agonist of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors [6,7], has been implicated in different types of activity-dependent synaptic plasticity including long-term potentiation and depression [8,9,10,11].

On the other hand, nicotine is considered to be the main addictive substance of tobacco, and it affects several brain functions due to its affinity for nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) [12]. Nicotine has effects on mnemonic functions; for example, nicotine improves long-term spatial memory, as measured in the Morris Water Maze [13,14] and procedural learning, evaluated in the one-trial step-through inhibitory-avoidance task [15,16]. Administration of nicotine also enhances cognitive functions in pathological conditions such as Alzheimer's disease

[13,17,18], and it reverses memory deficits caused by a lesion of the cholinergic system [19,20,21,22].

The effect of nicotine on hippocampal synaptic plasticity has been widely documented [20,22] and is known to involve the activation and desensitization of nAChRs present on interneurons and pyramidal neurons [23,24,25,26,27]. Furthermore, the fact that hippocampal astrocytes express nAChRs [28,29] and respond to nAChR agonists by increasing their intracellular Ca^{2+} concentration [30], raises the possibility that astrocytes could also be mediating nicotine effects in the hippocampus. Although there is no evidence of causality between long-term synaptic plasticity and memory, glial cells are critical for some types of memory [11,31,32]. Thus, glial cells could also mediate nicotine facilitation of long-term memory and the enhancement of synaptic transmission. In the present work, we show that glial cells, very likely through the release of D-serine, are essential for nicotine potentiation of synaptic transmission and nicotine facilitation of long-term memory.

Materials and Methods

Ethics Statement

All procedures were carried out in strict accordance with the recommendations of the National Institutes of Health *Guide for the Care and Use of Experimental Animals* and were approved by the local

Animal Research Committee of the Instituto de Neurobiología at Universidad Nacional Autónoma de México.

Hippocampal Slices

Transverse hippocampal slices (400 μm thick) from 120–130 g male Wistar rats were obtained in an ice-cold solution containing (in mM): sucrose 238, KCl 3, NaHCO_3 25, MgCl_2 2.5, and glucose 30 (pH 7.4). The slices were then transferred to a submersion chamber for storage in artificial cerebrospinal fluid (ACSF) containing (in mM): NaCl 126, KCl 3, NaHCO_3 25, MgCl_2 1, CaCl_2 2, and glucose 11 (pH 7.4). The slices were allowed to stabilize for at least 1 h before starting the recordings. A single slice was then gently transferred to the recording chamber where it was superfused throughout the experiment with ACSF at a flow rate of 2 ml/min. All solutions were continuously bubbled with 95% O_2 /5% CO_2 and maintained at room temperature (22–25°C).

Electrophysiological Recordings

A concentric bipolar platinum electrode (25 μm diameter; FHC Inc., Bowdoin ME, USA) was placed in the *stratum radiatum* of the CA1 hippocampal region to stimulate Schaffer collaterals. Evoked field potentials (EFP) were recorded in the *stratum radiatum* using glass electrodes filled with 2 M NaCl and with a resistance of 1–2 M Ω . When required, the paired-pulse protocol was applied to induce synaptic responses. The test stimulus duration was 150 μs with an interpulse interval of 60 ms (Fig. 1A). The stimulus intensity was adjusted in each experiment to elicit 60–70% of the maximum response. A paired-pulse was delivered every 15 s. The paired-pulse ratio (PPR) was defined as the quotient between the slope of the second response (P2) and the slope of the first response (P1), i.e., P2/P1. This parameter was used to evaluate changes in the probability of neurotransmitter release from Schaffer collaterals [33,34]. Each point on the time course graphs corresponds to the mean of 20 stimuli (5 min of recording). To induce long-term potentiation of synaptic transmission, in the presence of 50 μM picrotoxin (an antagonist of the GABA_A receptors) we applied two, 1-s trains of high-frequency stimulation (HFS, 100 Hz) with a 5-s inter-train interval. The EFP were recorded with an Axopatch-200B amplifier (Axon Instruments, CA) and filtered at 5 KHz. Data were acquired and stored for offline analysis with Digidata 1200, Clampfit 9.0 (Axon Instruments, CA) and Sigma plot 9.0 software.

Behavioral Tests

Adult male Wistar rats (250–350 g at the time of surgery) were housed individually in a temperature-controlled (24°C) colony room and maintained on a 12-h/12-h light/dark cycle (lights on at 7:00 A.M.). Food and water were provided *ad libitum* throughout the experiment.

Surgical procedure. The rats were adapted to the laboratory *vivarium* for at least one week before surgery. They were anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg, i.p.), received atropine sulfate (1 mg/kg, i.p.), and were positioned in a stereotaxic instrument (Stoelting Co., IL). Stainless steel guide cannulae (23-gauge) were bilaterally implanted into the dorsal hippocampus (AP = -4.0, L \pm 2.6, V = -2.5); the nose bar was set at -3.3 mm from the interaural line [35]. The cannulae were affixed to the skull using two screws and dental acrylic, and a stylet was inserted in each cannula and retained there at all times except during the injections. The rats were allowed seven days to recover from surgical procedures before the initiation of training.

Training and memory tests. The rats were trained in a one-trial step-through inhibitory-avoidance task. The training and

retention testing were carried out in an apparatus with two distinct compartments, separated by a guillotine door. The safe compartment (30 \times 30 \times 30 cm) had walls and lid of red-colored acrylic with a floor of stainless steel bars (6 mm in diameter, separated by 9 mm). This compartment was illuminated by a 10-Watt light bulb located in the center of its lid. The other, shock compartment had front and back walls and floor made of stainless steel with end walls and lid made of red-colored acrylic. The compartment was 30 cm long and 25 cm deep. The walls and floor were shaped as a trough, 20 cm wide at the top and 8 cm wide at the bottom. In the middle of the floor, a 1.5-cm slot separated the two stainless steel plates that made up the walls and floor. When in this compartment, the rats were in contact with both plates that can be electrified and, thereby, deliver aversive stimulation consistently to every subject. A square-pulse stimulator (Grass S-48), in series with a constant current unit (Grass CCU-1A), generated the electric shock. The duration of shock and the measurement of latencies to cross from one compartment to the other were accomplished with automated equipment. The conditioning box was located inside a dark, sound-proof room provided with background masking noise.

Rats were placed in the safe compartment; 10 s later the guillotine door was opened, and latency to enter was recorded (training latency). When the rat was completely inside the dark compartment the door was closed and a foot-shock (0.7 mA) was delivered. After 5 s, the door was opened, allowing the animal to escape into the first compartment (escape latency). After 30 s in the safe compartment the animal was put back in its home cage. Forty-eight hours later, during the retention test (long-term memory), the same procedure was followed except that the foot-shock was not delivered. The test was terminated either when the rat entered the dark compartment or after 600 s without entry, and a score of 600 was assigned to the retention latency.

Microinjection procedure. The bilateral infusions into the hippocampus (0.5 μl /side) were made through 30-gauge injection needles connected to a Hamilton microsyringe by polyethylene tubing. The injection needles were inserted into the guide cannulae and protruded 1 mm beyond the tip of the cannulae. The infusion rate was 0.5 $\mu\text{l}/\text{min}$ and was controlled by an automated microinfusion pump (WPI, 220i). At the end of the infusion, the injection needles remained inside the guide cannulae for 60 s to insure diffusion away from the injector tip. The injection procedure was carried out in a different room from that in which training and testing took place.

Drugs

For electrophysiological experiments, the drugs were diluted in ACSF and applied in the superfusion bath. In all experiments, 30 min of stable baseline was recorded before each drug administration. Depending on the purpose of each experiment, slices were incubated with D-(-)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (AP5, 50 μM), D-serine (20 μM), 5,7-dichlorokynurenic acid (DCKA, 200 nM), nicotine (1 μM), fluoroacetate (FAC, 5 mM), mecamylamine (50 μM), or D-amino acid oxidase (DAAO, 0.1 U/ml). The DAAO enzyme was dialyzed for 8–10 h at 4°C against 20 mM sodium pyrophosphate pH 8–8.5 containing 10 μM flavin adenine dinucleotide and stored at -20°C until use. For the behavioral tests, the drugs were diluted in 0.9% NaCl and administered at different times before training: FAC (5, 10, 20, or 40 mM at 40 min), D-serine (100 μM at 40 min) and AP5 (50 mM at 20 min) in the CA1 hippocampal region, or nicotine (1 ml/kg at 15 min with doses of 0.2, 0.4, or 0.6 mg/kg) subcutaneously. All the drugs were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis MO).

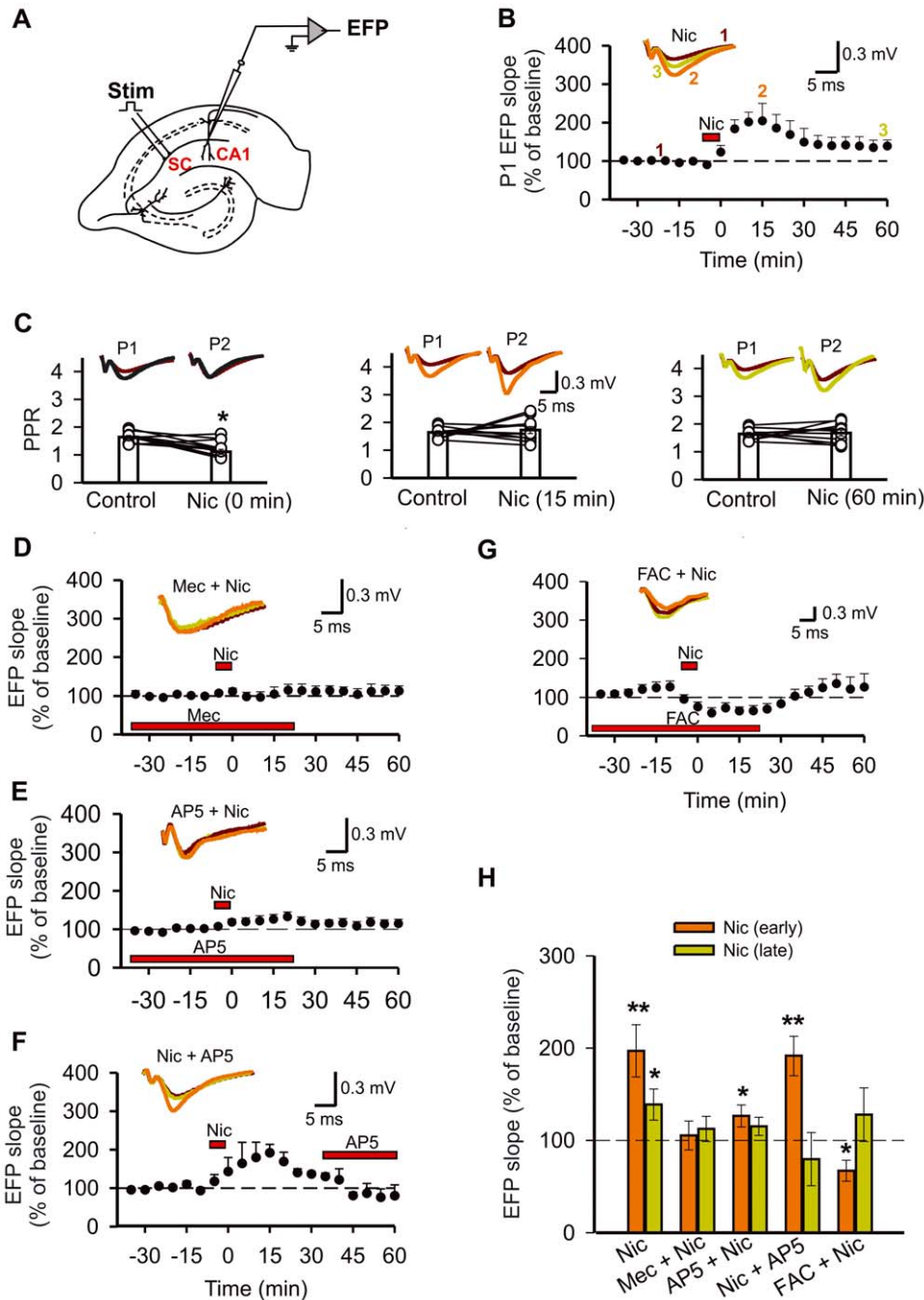


Figure 1. Nicotine potentiation of synaptic transmission depends of glial cell activity. A, Experimental arrangement for recording the evoked field potential (EFP) using a stimulation electrode (Stim) located in Schaffer collaterals (SC). B, the EFP slope before, during, and after nicotine administration (Nic; 1 μ M, 7 min). The numerals in B (1, 2 and 3) indicate the time at which the representative traces (insets) were taken. The color of the numeral correlates with the color of the trace. The same code was used for the subsequent figures. C, The PPR and representative traces from experiments in B, before (Control, brown), during (black), and after nicotine administration (15 min, orange; 60 min, green). Columns represent the mean \pm S.E.M. of results in each condition. Connected circles correspond to individual experiments. Effects on the EFP slope of nicotine combined with mecamylamine, a non-selective antagonist of nAChRs, (D, Mec; 50 μ M); with AP5, an antagonist of NMDA receptors (E, F, AP5; 50 μ M); or in the presence of fluoroacetate (G, FAC; 5 mM). Insets, for this and subsequent figures, they show representative traces for EFP responses before (brown) and after nicotine administration (early, orange; late, green) in the absence and presence of the test drug. Horizontal bars indicate the timing of drug application. H, Summary of the experiments in B, D–G. For this and subsequent figures, the results are the mean \pm S.E.M. of the EFP slope expressed as percent of baseline. 10–20 min (early, orange) and 50–60 min (late, green) after nicotine administration, in the absence or presence of the test drug. The dashed line indicates the normalized basal level in each condition (* p <0.05, ** p <0.01, one-way repeated-measures ANOVA, *post hoc* Fisher test).

doi:10.1371/journal.pone.0049998.g001

Statistical Analysis

In each of the electrophysiological experiments, data were obtained from 5 to 11 slices. For the time course plots, the results are shown as means \pm S.E.M. of the EFP slope, relative to baseline (the mean of the first 30 min of recording). The early and late effects correspond to the mean measured from 10 to 20 and 50 to 60 min, respectively, after electrical stimulation, nicotine, or FAC administration. These two components were compared to the baseline EFP slope (control) using the repeated-measures one-way ANOVA. Due to changes produced by FAC, when nicotine or HFS was preceded by FAC, the synaptic responses previous to nicotine or HFS were used as another group to compare. To determine if there were significant differences between measurements, the *post hoc* Fisher test was used. When only two groups were compared a Student's *t*-test was used. If the measurements were done in the same slices, then paired Student's *t*-test was utilized.

In the behavioral experiments, only the rats in which the cannulae were located in the CA1 hippocampal region were included in the analyses. The final sample size for each group was between 6 and 11 rats. Because the measurement of retention was truncated at 600 s, nonparametric statistics were used. Independent Kruskal-Wallis analyses of variance were computed to compare training, escape, and retention latencies among groups. When appropriate, the Mann-Whitney U test was used to make comparisons between any two groups.

Results

Glial Cells Are Required for Long-term Nicotine Effects in Synaptic Transmission

It is well known that nicotine modulates synaptic plasticity in the hippocampus [20,36]. Thus, the effects of nicotine on synaptic transmission were evaluated by measuring the EFP slope and the PPR produced in the CA1 hippocampal region by stimulating Schaffer collaterals (Fig. 1A).

First, we applied a brief administration (7 min) of a low concentration of nicotine (1 μ M), close to the brain nicotine concentration after smoke one cigarette: 520–770 nM [37]. Thus, nicotine by itself increased the EFP slope of P1 in hippocampal slices (Fig. 1B). Maximal potentiation was observed 15 min after nicotine administration ($204 \pm 45\%$ relative to baseline). Later, the responses of synaptic transmission diminished but remained above baseline after 60 min of nicotine administration ($135 \pm 19\%$ relative to baseline; Fig. 1B).

The statistical analysis (ANOVA) of the early and late effects of nicotine showed a significant treatment effect ($F_{2,20} = 8.36$; $p = 0.002$). The Fisher test indicated that both early and late components (see Materials and Methods) were significantly different from the control ($p < 0.001$, $p = 0.03$, respectively; Fig. 1H). The analysis of the PPR showed a significant effect of nicotine ($F_{3,30} = 4.327$; $p = 0.012$). The Fisher test indicated a decrease of the PPR during the nicotine administration with respect to the control ($p = 0.007$; Fig. 1C, right panel), without an effect on the early and late components ($p = 0.74$, $p = 0.78$, respectively; Fig. 1C). The role of nAChRs was revealed when slices were preincubated with mecamylamine, a non-selective nAChR antagonist; in this condition, nicotine did not modify the EFP slope ($F_{2,10} = 0.33$, $p = 0.72$; Fig. 1D, H).

The involvement of NMDA receptors in nicotine potentiation of synaptic transmission is controversial [27,36]. To determine if these receptors were participating, nicotine was applied in the continuous presence of an antagonist of the NMDA receptors, AP5. In this condition, a small enhancement of the early

component was observed when nicotine was administered, without affecting the responses of the late component ($p = 0.028$, $p = 0.22$, respectively; Fig. 1E, H). Additionally, once established the nicotine potentiation of synaptic transmission (late component), AP5 was applied and the EFP slope returned to the baseline ($p = 0.495$ with respect to baseline; Fig. 1F, H), indicating that nicotine induced a NMDA receptor-dependent long-lasting synaptic plasticity. The administration of AP5 alone to hippocampal slices did not affect the EFP slope with respect to the control (paired *t*-test, $p = 0.89$; Fig. S1A, C).

Because hippocampal astrocytes express functional nAChRs [29,30,38] we asked whether glial cells were mediating long-term enhancement of synaptic transmission by nicotine. To determine the role of glial cells in this synaptic plasticity, we studied the effects of FAC, a selective inhibitor of glial cell metabolism [39,40]. Perfusion of the hippocampal slices with FAC led to an increase in the EFP slope relative to baseline (late, $150 \pm 17\%$; paired *t*-test, $p = 0.02$; Fig. S1B, C). To determine whether this increase was also mediated by NMDA receptors, AP5 was applied after the onset of FAC administration. Under this condition FAC still increased the EFP slope (paired *t*-test, $p = 0.02$; Fig. S1B, C), which suggest that the effect of FAC was not dependent on NMDA receptors.

Interestingly, when nicotine was administered in the presence of FAC, a significant reduction of the synaptic responses was observed in the early component ($p = 0.048$), without any effect on the late component ($p = 0.326$). Because FAC administration increased synaptic transmission, a depotentiation of the responses rather than a depression would better describe this effect [41].

Glial D-serine Is Necessary for the Long-term Effects of Nicotine on Synaptic Transmission

Because NMDA receptors are required for the enhancement of synaptic transmission by nicotine, and the gliotransmitter D-serine is involved in synaptic plasticity [7,10,11], we hypothesized that D-serine could also mediate the long-term effects of nicotine on synaptic transmission. To address this point, D-serine and DCKA (an agonist and an antagonist of the NMDA receptors, respectively, both acting at the glycine-binding site) were administered. The application of these drugs by themselves did not induce changes in synaptic transmission with respect to their controls (paired *t*-test, D-serine: $p = 0.95$; DCKA: $p = 0.47$; Fig. S2A–C). In the presence of D-serine, nicotine potentiated synaptic transmission ($F_{2,16} = 8.14$, $p = 0.004$) of both the early and late components ($p = 0.001$ and 0.01 , respectively; Fig. 2A, E), and the maximal potentiation was similar to that with nicotine alone (paired *t*-test $p = 0.28$). Interestingly, in the presence of DCKA, nicotine potentiation of synaptic transmission was not observed. Moreover, after nicotine administration, a significant depression ($F_{2,8} = 14.24$, $p = 0.002$) of synaptic responses was observed in the late component (early $p = 0.24$; late $p \leq 0.008$; Fig. 2B, E).

When hippocampal slices were superfused before (60 min), during, and after nicotine application with DAAO, an enzyme that specifically degrades endogenous D-serine [11], nicotine again failed to potentiate synaptic transmission ($F_{2,12} = 0.35$, $p = 0.5$; Fig. 2C, E). Together, these results strongly suggest that endogenous D-serine is provided by glial cells and that it is required for the long-lasting enhancement of synaptic transmission by nicotine. If this is true, exogenous D-serine in the presence of FAC should restore nicotine effects. Indeed, when nicotine was administered in the presence of FAC and D-serine, a significant effect on EFP was found ($F_{3,21} = 7.195$, $p = 0.002$). The *post hoc* analyses showed a significant increase in the early and late components ($p = 0.027$, $p \leq 0.001$; Fig. 2D, E).

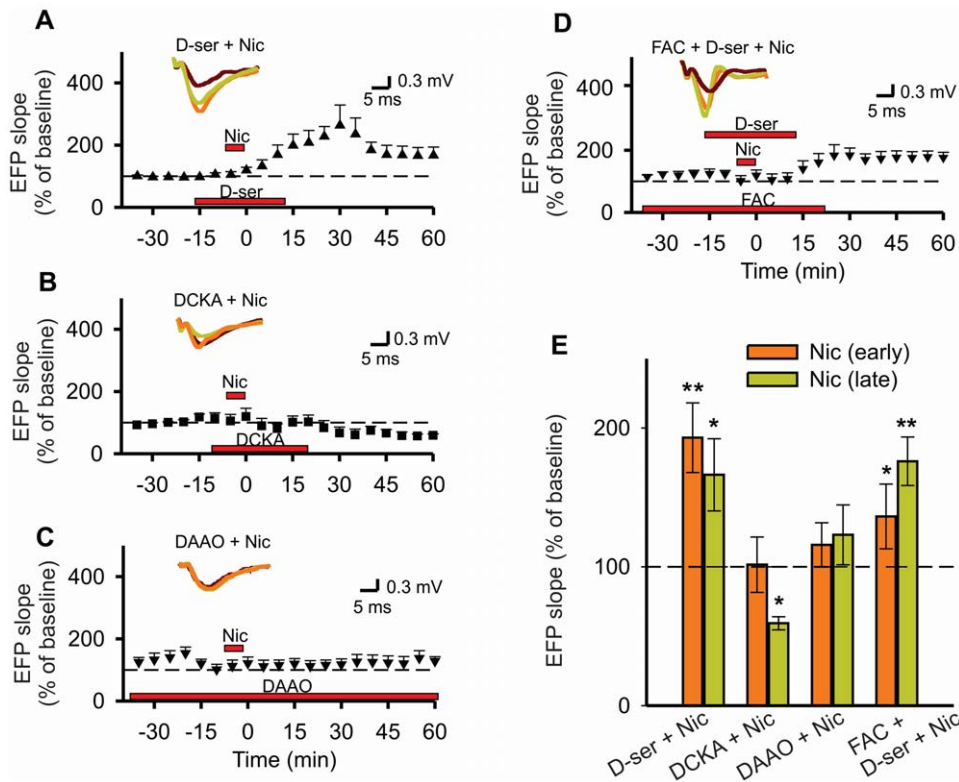


Figure 2. Glial D-serine is necessary for nicotine potentiation of synaptic transmission. The EFP slope as a function of time before and after administration of nicotine (Nic, 1 μ M) in combination with: D-serine (A, D-ser, 20 μ M); DCKA (B, 200 nM), an antagonist of NMDA receptors at the glycine-binding site; DAAO (C, 0.1 U/ml), a specific enzyme that degrades D-serine; or D-serine in the presence of FAC (D, 5 mM). Insets, representative traces with the indicated drugs (see Fig. 1 for details). E, Summary of the experiments in A–D; data represent the mean \pm S.E.M. of the EFP slope (as percent of control), after nicotine administration (see Fig. 1 for details), (* p <0.05, ** p <0.01, one-way repeated-measures ANOVA, *post hoc* Fisher test).

doi:10.1371/journal.pone.0049998.g002

Furthermore, another type of synaptic plasticity, electrically induced long-term potentiation, which has been suggested as the cellular basis of the learning and memory processes [42,43] depends also on glial D-serine [9,44]. Thus, we tested whether FAC and exogenous D-serine affected long-term potentiation induced by high-frequency electrical stimulation (HFS). Accordingly, the EFP slope in hippocampal slices immediately increased after HFS and was sustained for at least 60 min (p =0.003, paired t -test; Fig. S3A, B). In the presence of FAC this long-term potentiation of synaptic responses was not observed (p =0.47; Fig. S3A, B). The potentiation of synaptic responses blocked by FAC was completely restored when exogenous D-serine was administered (p =0.005; Fig. S3A, B). The HFS alone or in the presence of FAC, or FAC plus D-serine did not change the PPR (t -test, p =0.76, 0.67, and 0.193, respectively; Fig. S3C).

Nicotine Facilitates Long-term Memory

Nicotine is known to improve long-term hippocampal-dependent memory in both laboratory animals and humans [13,14,20,45,46,47]. Here, the long-term memory was evaluated with the one-trial step-through inhibitory-avoidance task by measuring the retention score.

When a single, acute dose of nicotine (0.2, 0.4, and 0.6 mg/kg) was systemically administered 15 min before the training, no significant differences among the groups were found when training (H [3]=7.15, p =0.07) and escape (H [3]=0.34,

p =0.95) latencies were analyzed (Fig. 3A). Unless otherwise stated, the same results regarding training and escape latencies were found in the remaining behavioral experiments (Fig. 4A, C; Fig. 5A).

The fact that there were no significant differences in training latencies among the groups indicates that nicotine and the other drugs that were administered in the remaining experiments of this study did not interfere with the motor and perceptual mechanisms necessary for performance during training. Furthermore, the lack of differences in escape latencies argues against deficiencies in sensitivity to the foot-shock. Therefore, changes in the retention performance in the various experiments can be attributed to the differential effects of the treatments.

Regarding retention latencies (long-term memory), a significant treatment effect became evident (H [3]=8.92, p =0.03). Pair-wise comparisons revealed that the group that had been treated with 0.4 mg/kg had a significantly higher retention score than each of the other groups (p <0.05 for each comparison), while no differences were found among the other groups (Fig. 3B) consistent with previous works [16].

Nicotine Facilitation of Long-term Memory Depends on NMDA Receptors

Because nicotine facilitation of long-term memory requires NMDA receptors [15,47,48] and because glial cells are the main source of D-serine [6], we reasoned that glial D-serine could be mediating the nicotine effects on long-term memory. Firstly, to

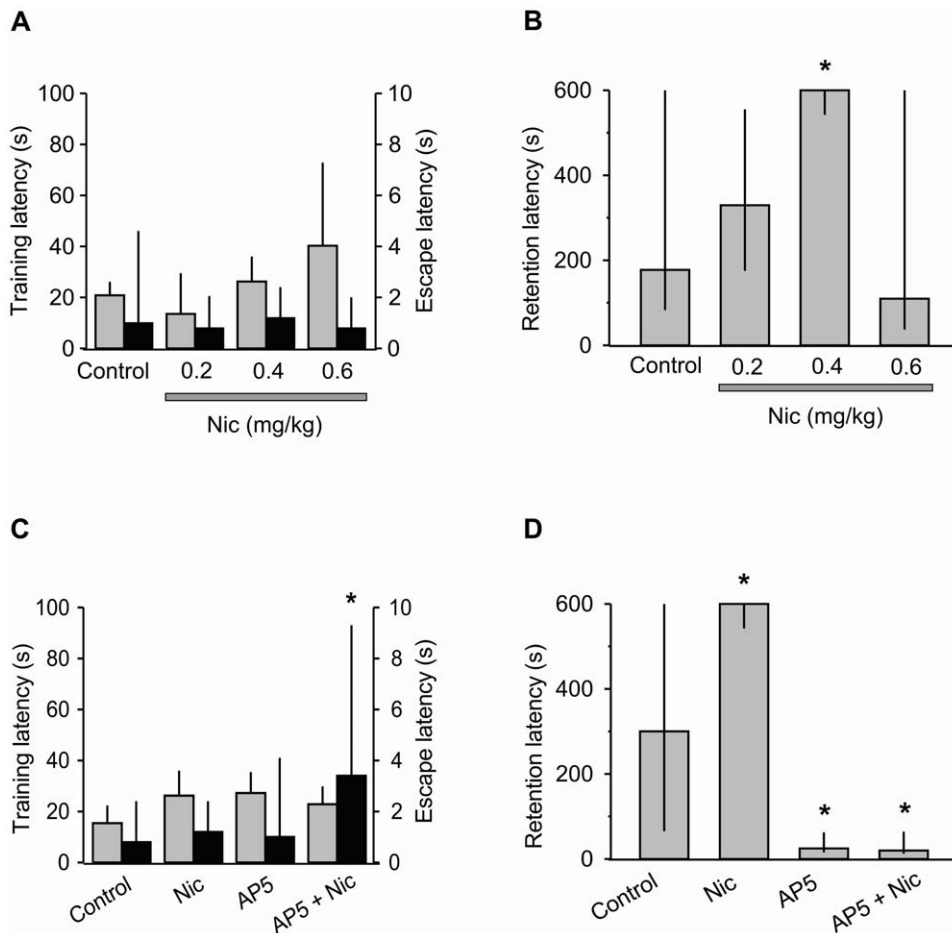


Figure 3. Nicotine facilitation of long-term memory depends on NMDA receptors. Training (gray columns) and escape (black columns) latencies of rats that had been treated with: A, different doses of nicotine (Nic); or C, Nic (0.4 mg/kg, same data as in A), AP5 (50 mM), or a combination of both drugs. Retention latency in the inhibitory avoidance task: B, at different doses of Nic; or D, with Nic (0.4 mg/kg, same data as in A) and 50 mM AP5 alone or in combination. For this and Figs. 4, 5, median and interquartile ranges of latency scores are depicted. * $p \leq 0.05$ vs. Control, Kruskal-Wallis, *post hoc* U-Mann-Whitney. doi:10.1371/journal.pone.0049998.g003

evaluate the role of NMDA receptors in both normal and nicotine-facilitated long-term memory, 50 mM AP5 was bilaterally administered in the CA1 hippocampal region before the training, either alone or combined with 0.4 mg/kg of nicotine.

Escape latencies differed significantly among the groups ($H [3] = 8.47$, $p = 0.04$); the group that received combined administration of nicotine and AP5 showed higher escape latencies than the control, nicotine, and AP5 groups ($p = 0.02$ for each comparison; Fig. 3C). Regarding retention scores, a highly significant treatment effect was found ($H [3] = 21.24$, $p < 0.0001$). The *post hoc* U test indicated that the nicotine group had higher retention scores than the other groups (p values ranging between 0.05 and 0.005); on the other hand, the AP5 and AP5+nicotine groups had significantly lower latencies than the other groups (p values ranging between 0.03 and 0.0003); lastly, the AP5 and AP5+nicotine groups did not differ significantly from each other (Fig. 3D).

Taken together, these results show that NMDA receptors are required both for the formation of normal memory and for the facilitatory effect of nicotine on memory. Consequently, the activation of nAChRs is not sufficient to improve memory because improvement was annulled by blocking NMDA receptors.

Long-term Memory Depends on Glial D-serine

The roles of glial cells in long-term memory have been little studied [11,31]. Consequently, to explore if glial cells are implicated in memory formation, the effects of FAC (an inhibitor of glial cell metabolism) were analyzed. Vehicle, 5, 10, 20, or 40 mM FAC was applied bilaterally in the CA1 hippocampal region before training. The Kruskal-Wallis ANOVA showed significant differences in retention among the groups ($H [4] = 10.20$, $p = 0.04$). The *post hoc* U test indicated that there were no significant differences among the FAC groups, and that the three higher doses of FAC produced significantly lower retention scores (amnesia) than the vehicle control (p values ranging between 0.04 and 0.01; Fig. 4B). These results indicated that the activity of glial cells is critically involved in long-term memory formation.

To determine if glial D-serine was also involved in long-term memory, the effect of D-serine alone and in the presence of FAC was analyzed. The statistical analysis showed significant differences among the groups ($H [3] = 11.66$, $p = 0.01$), and pair-wise comparisons indicated that D-serine by itself did not change long-term memory, but it completely restored the long-term memory that had been blocked by FAC (p values ranging between 0.05 and 0.01; Fig. 4D). These results confirmed that the activity

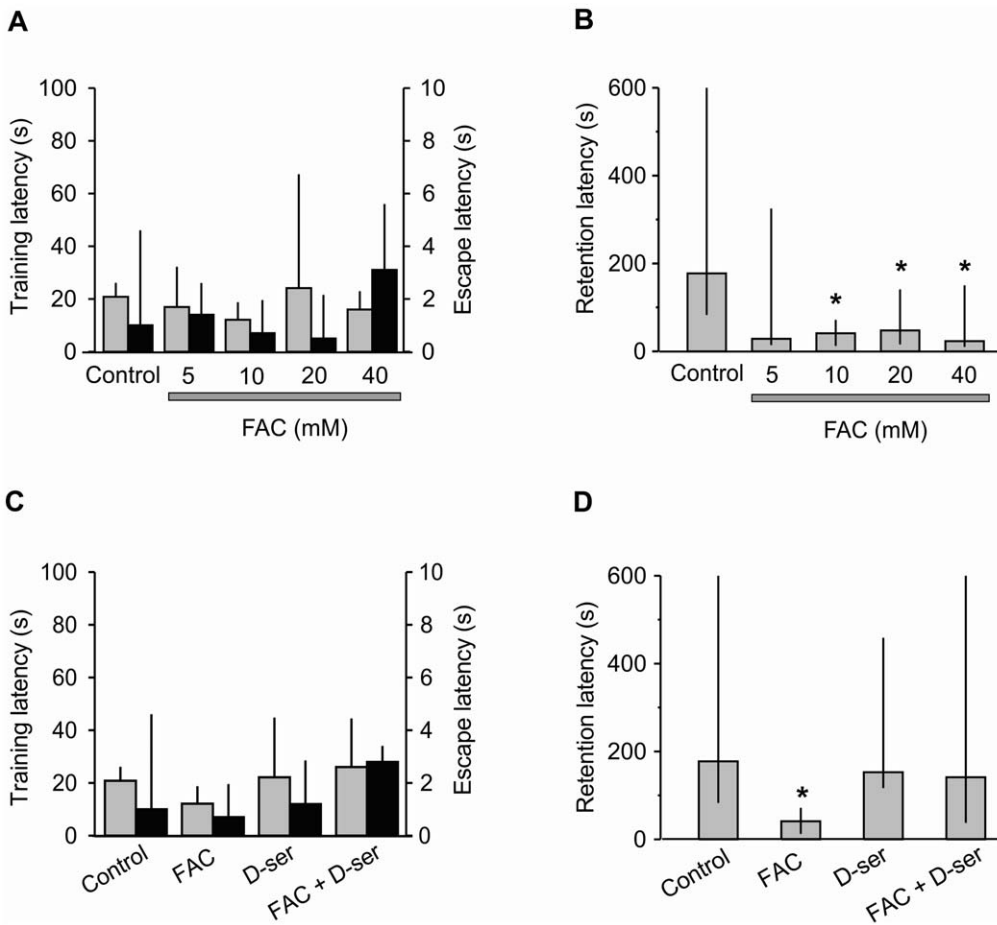


Figure 4. Long-term memory depends on glial D-serine Training (gray columns) and escape (black columns) latencies at: **A**, different concentrations of FAC; or **C**, with FAC (10 mM, same data as in **A**), D-serine alone (D-ser, 100 μ M), or in combination. Retention latency in the inhibitory-avoidance task at: **B**, different concentrations of FAC; or **D**, with FAC (10 mM, same data as in **A**), D-serine alone, and D-serine in combination with 10 mM FAC. * $p \leq 0.05$, Kruskal-Wallis, *post hoc* U-Mann-Whitney. doi:10.1371/journal.pone.0049998.g004

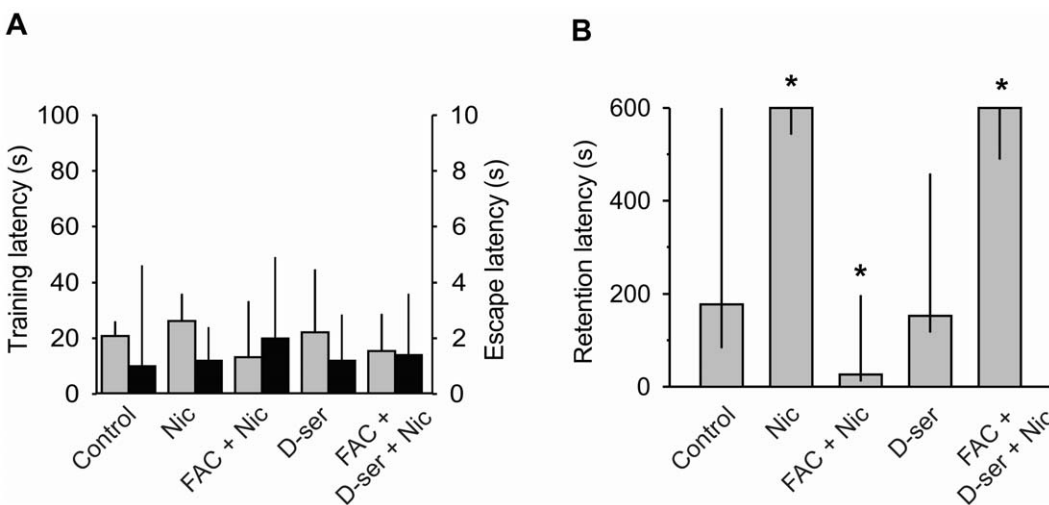


Figure 5. Long-term memory facilitated by nicotine depends on glial D-serine. **A**, Training (gray columns) and escape (black columns) latencies with nicotine (Nic, 0.4 mg/kg, same data as in Fig. 3A), Nic and FAC (10 mM), D-serine (D-ser, 100 μ M), and Nic, FAC and D-ser. **B**, Retention latency in the inhibitory-avoidance task in rats subjected to the same experimental conditions as in **A**. * $p \leq 0.05$, Kruskal-Wallis, *post hoc* U-Mann-Whitney. doi:10.1371/journal.pone.0049998.g005

of glial cells is required for the formation of memory, as shown above, very likely through the release of D-serine.

Glial D-serine is Necessary for Long-term Memory Facilitated by Nicotine

Because glial D-serine mediates nicotine potentiation of synaptic transmission in hippocampal slices (see Fig. 2B–D) and because NMDA receptors are also required for facilitation of long-term memory by nicotine (see Fig. 3D), it might be that the gliotransmitter D-serine is also involved in long-term memory facilitated by nicotine. To examine this possibility, we tested the effects of nicotine, D-serine, or the combined administration of FAC+nicotine, or FAC+D-serine+nicotine on the inhibitory-avoidance task. From the retention scores, a highly significant treatment effect became evident ($H [4] = 21.71$, $p = 0.001$). When compared with the control group, nicotine (0.4 mg/kg) produced a highly significant improvement of memory ($p = 0.03$; Fig. 5B). When FAC (10 mM) was infused bilaterally into the CA1 region of hippocampus before nicotine, it produced not only a complete blockade of the nicotine effects, but also an amnesic state ($p = 0.05$; Fig. 5B). By itself, D-serine (100 μ M) did not modify retention of the task. To determine if the gliotransmitter D-serine was also mediating the facilitatory effects of nicotine on long-term memory, FAC was bilaterally co-administrated with D-serine in the CA1 hippocampal region prior to nicotine administration. As expected, the blocking effects of FAC on nicotine facilitation of long-term memory were completely abolished by adding D-serine ($p = 0.05$; Fig. 5B). These results clearly indicate that glial D-serine is involved in the facilitating effect of nicotine on long-term memory. The endogenous D-serine is sufficient for memory formation because exogenous D-serine has no effect on retention. Thus, to facilitate memory, the activation of both nAChRs by nicotine and NMDA receptors, possibly by D-serine released from glial cells, is required.

Discussion

Although considerable information has accumulated on the roles of glial cells in synaptic plasticity, the possibility that they mediate the actions of drugs, such as nicotine, has not been examined. Here we show that the effects of nicotine on plasticity and memory depend on the proper function of glial cells. Moreover, our results show that glial D-serine is required for nicotine to potentiate synaptic transmission in the hippocampus and facilitate long-term memory.

Glial D-serine Mediates Long-term Effects of Nicotine

Nicotine modulates hippocampal synaptic transmission and facilitates long-term potentiation through activating nAChRs [12,26,27]. Furthermore, activation of nAChRs *per se* enhances synaptic transmission in the hippocampus and other cerebral regions [27,49,50,51]. Besides the relevant role of neurons, here we showed that the impairment of glial function with FAC is enough to completely block nicotine effects on synaptic transmission and memory. In the hippocampus, several types of synaptic plasticity depend on the availability of the D-serine [9,11,44,52], and the nicotine potentiation of synaptic transmission depends of NMDA receptor activity [27,53] and present work; therefore, it seemed very likely that D-serine was involved in nicotine effects. The results presented here indicate that astrocytes, probably through the release of D-serine, govern the NMDA receptor-dependent synaptic plasticity induced by nicotine. This is based on our finding that exogenous D-serine completely restored the effects of nicotine on synaptic plasticity that had been blocked with FAC

which is congruent with previous reports where FAC decreases the level of D-serine but not of glycine in the prefrontal cortex [8,53].

Although D-serine and the synthesizing enzyme (serine racemase) have been found in neurons [54,55,56,57], neuronal D-serine was not able to maintain nicotine effects when glial cells were arrested with FAC, which reinforces the idea that astrocytes are the main source of this D-amino acid [7,52]. We also demonstrated that nicotine did not facilitate synaptic transmission when DAAO was added. This result corroborates the requirement for D-serine and also, because DAAO does not degrade glycine [11], it excludes any significant role for endogenous glycine in mediating the nicotine effects.

It has been reported that, depending on the source of the enzyme, the DAAO might have impurities or low activity [6,58]. In our experimental conditions the basal synaptic transmission was not modified in the presence of DAAO for 90 min. In this basal activity AMPA receptors were involved, suggesting that DAAO does not interfere neither with glutamate nor AMPA receptor activity [6,59]. In this sense, although endogenous glutamate is available to potentiate synaptic activity by nicotine, the depletion of endogenous D-serine by DAAO avoids the activation of NMDA receptors, and then nicotine potentiation of synaptic transmission. Moreover, two other approaches were directed toward the D-serine pathway to eliminate their actions: **a**) the impairment of the release of D-serine by FAC [8,53] **b**) the antagonism of the D-serine binding site at NMDA receptors by DCKA [9,44], reinforcing that D-serine is involving in the enhancement of synaptic transmission by nicotine.

FAC has been widely used to impair glial functions [8,11,60,61]. Some of the consequences of using FAC are the reduction of ATP concentrations in glial but not neuronal elements [62], and inhibition of the stimulated efflux of glutamine, ATP, adenosine, and glutamate from glial cells [63,64]. Thus, several authors refer a reduction in synaptic transmission by FAC [65,66,67,68]. However, it has also been reported that FAC does not affect the spontaneous postsynaptic potentials [69], and that FAC increases glutamatergic transmission mediated by AMPA receptors [9] but not by NMDA receptors (present work). This potentiation of synaptic transmission induced by FAC might be explained by a reduction of the capability of astrocytes to reuptake glutamate from the synaptic cleft [70] and/or by a decrease of the inhibitory synaptic transmission mediated by astrocytes [71].

Glial cells express nAChRs and responds to different agonists as acetylcholine, choline and nicotine, resulting in increases of intracellular Ca^{2+} concentration [30,38,72,73,74] that is required for the exocytosis of D-serine [75]. On the other hand, FAC is able to reduce the intracellular Ca^{2+} responses in astrocytes induced by activation of G-protein-coupled receptors [76,77]. Thus, it is possible that nicotine is acting directly on astrocytes to induce the release of D-serine and then, when FAC is administrated, a reduction of the nicotine-evoked Ca^{2+} increases in glial cells with the subsequent decrease in the level of this gliotransmitter would affect the NMDA receptor function that is required for the long-term enhancement of synaptic transmission by nicotine [27,78] as well as on the plasticity induced by HFS.

Most of the changes in synaptic transmission in the CA1 hippocampal region require the activation of NMDA receptors [79,80]. These receptors serve as coincidence detectors of presynaptic and postsynaptic activity [81] because they require, besides the presence of glutamate and the co-agonist, a membrane depolarization to remove the Mg^{2+} blocking from their ion channel [82].

In the present work we observed a decrease of the PPR during the administration of nicotine, suggesting an increase of glutamate

release from Schaffer collaterals. This could be explained by activation of presynaptic nAChRs at early times; nevertheless, another option is that nicotine would induce the release of glutamate from the astrocytes that in turn would activate presynaptic metabotropic glutamate receptors that increase glutamate release from Schaffer collaterals [66,83]. However, 15 min after nicotine administration, the effect of nicotine on the glutamate release may have been washed out, and only postsynaptic effects mediated by NMDA receptors remained and were maintained for at least 60 min. In this context, a possible scenario would be that, in the presence of nicotine, several effects would participate in concert: a disinhibition of GABAergic interneurons [27,84], an increase in the excitability of the postsynaptic neuron [12,85], an increase of glutamate release by nAChR activation [23,24,26], and the release from astrocytes of D-serine (present work) to enhance NMDA receptor-dependent synaptic transmission. A partial view of all these events is depicted in Figure 6. Taking all this in consideration, it is understandable that exogenous D-serine, by itself, did not induce an increase in long-term synaptic transmission.

Additionally, it has been shown that astrocytes modulate the CA3-CA1 synapses through the release of several gliotransmitters (besides D-serine) like ATP [76,86] and glutamate [66,83]. In the present work the role of D-serine in the long-lasting effects of nicotine was analyzed. However, further experiments will be necessary to evaluate the roles of other gliotransmitters mediating nicotine effects in synaptic transmission, plasticity and behavior; particularly, the role of astrocytic glutamate in the presynaptic effect of nicotine.

Although the links between cellular and molecular mechanisms of long-term synaptic plasticity with cognitive processes are not completely understood, there is a consensus that they represent the basic fundamentals for learning and memory [42,87]. In fact, long-term potentiation is induced during learning and memory [43].

Furthermore, the long-term potentiation induced by HFS and the inhibitory-avoidance task produce the same cellular responses in the hippocampus: an increase in the field potentials, as well as phosphorylation of the AMPA and NMDA receptors [43]. Accordingly with the results of HFS, FAC produced a lower retention score (amnesia). Because FAC impaired astrocytes [8,9], and D-serine completely restore the amnesia produced by FAC, the amnesia could be explained by the lack of glial D-serine.

The administration of nicotine facilitated long-term memory. For instance, it has been shown a facilitation of retention of inhibitory avoidance by pre- and post-training administration of nicotine into the dorsal hippocampus; the facilitation was also seen when nicotine was infused before testing for long-term memory [88], we show that nicotine effects on memory depend on the presence of D-serine (presumably released from glial cells) and the consequent activation of NMDA receptors, possibly following a similar sequence of cellular and molecular events previously described [43].

Cholinergic signaling involving muscarinic and/or nicotinic acetylcholine receptors participates in hippocampal synaptic transmission as well as in learning and memory [20,46,88,89,90]. Astrocytes have been implicated as mediators of acetylcholine [91,92,93], although the mediation has been attributed mainly to muscarinic receptors. It was reported recently that stimulation of cholinergic afferents mediate synaptic plasticity through activation of astrocytic muscarinic acetylcholine receptors [10,94]. In the hippocampal cholinergic-induced long-term potentiation of synaptic transmission, the NMDA receptors were blocked [94]. In this sense, a possible role of D-serine was not considered. Nevertheless, it cannot be excluded that astrocytes may use different mechanisms to modulate synaptic plasticity induced in physiological conditions by acetylcholine, or by nicotine during smoking. Accordingly, the nicotine quantities

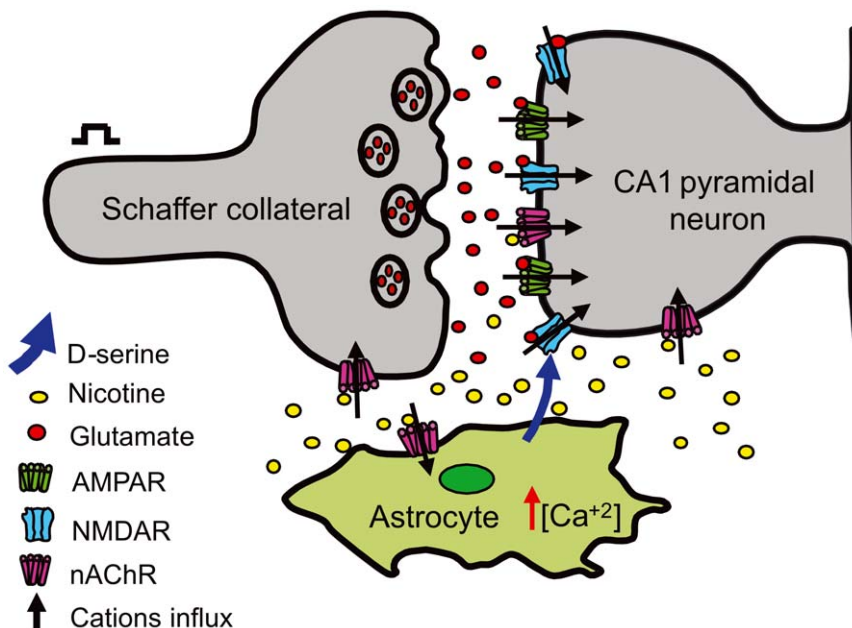


Figure 6. Scheme accounting for the long-term effect of nicotine. Due to the electrical stimuli and nicotine activation of nAChRs, the Schaffer collateral terminal releases glutamate that could interact with postsynaptic AMPA and NMDA receptors (AMPA and NMDAR) in the CA1 pyramidal neuron. At the same time, nicotine activates Ca^{2+} -permeable nAChRs [106] located in the postsynaptic neuron (helping of the removal of Mg^{2+} ions for the NMDA receptor [82] and in astrocytes [30,38] thereby promoting the Ca^{2+} -dependent release of D-serine. These brain cells and events would participate in concert to allow nicotine to enhance both NMDA receptor-dependent synaptic transmission and memory.
doi:10.1371/journal.pone.0049998.g006

used in the current work (1 μ M and 0.4 mg/kg) are very likely to be reached in humans after smoking one cigarette [37,95].

Perspectives for Pathological Conditions and Therapeutics

The drug addiction process shares many characteristics with normal learning and memory. In fact, it has been previously proposed that nicotine modifies the same cellular mechanisms used during learning and memory to induce addiction [22,96,97,98,99,100]. Because astrocytes mediate nicotine effects in long-term memory (present work), and there is an enhancement of NMDA receptor-mediated responses induced by chronic nicotine administration [27], we speculate that astrocytes (probably through the release of D-serine) could be involved in nicotine addiction. It will be interesting to determine whether the physical and chemical interactions between hippocampal astrocytes and neurons are modified by nicotine addiction, and if these interactions play a role in establishing the addiction.

Furthermore, cholinergic signaling due to nAChR activation is also implicated in Alzheimer's and Parkinson's diseases [101,102], schizophrenia [103], and depression [104], among other pathological conditions. The roles of astrocytes as mediators of nicotine effects in these pathologies need to be clarified, and some questions arise: Is the neuroprotective effect of nicotine against loss of nigrostriatal dopamine neurons [101] mediated by astrocytes? Do astrocytes mediate the long-term potentiation induced by nicotine in the mesolimbic dopaminergic system that accounts for reward and drug addictions [105]? Additional studies to answer these questions will further clarify the roles of glial cells and nicotine in the complex functioning of the brain and provide the opportunity for new strategies and the development of drugs that would help to improve patients' quality of life.

Supporting Information

Figure S1 The increase in synaptic transmission by fluoroacetate is not mediated by NMDA receptors. The EFP slope as a function of time in the presence of AP5 (A, 50 μ M), or fluoroacetate (B, FAC, 5 mM) alone or in combination with AP5. Insets, sample records before (brown) and (A) 15 min after AP5 administration (orange), and (B) 70 min after FAC administration in the absence (left, green) and presence (right, green) of AP5. C, Summary of experiments in A and B, representing the mean \pm S.E.M. of the EFP slope (as percent of control) 20–30 min after AP5 alone (early, orange), and 60–70 min after FAC (late,

green) in the absence or presence of AP5 (* p <0.05, one-way repeated-measures ANOVA, *post hoc* Fisher test). (TIF)

Figure S2 Effect of Glial D-serine on synaptic transmission. The EFP slope as a function of time before, during, and after the application of the antagonist DCKA (A, 200 nM) and agonist D-serine (B, D-ser, 20 μ M) of NMDA receptors at the glycine-binding site. C, Summary of experiments in A and B of the EFP slope (as percent of control) after DCKA and D-serine administration (15 min; early, orange) (* p <0.05, one-way repeated-measures ANOVA, *post hoc* Fisher test). (TIF)

Figure S3 Long-term potentiation evoked by electrical stimulation depends on glial D-serine. A, Changes of EFP slope of P1 by high-frequency electrical stimulation (HFS, arrow) in control conditions, in the presence of FAC (5 mM), and FAC plus D-serine (D-ser, 20 μ M). Insets, sample traces before (brown) and 60 min after HFS (green) under these three conditions. B, Summary of the experiments in A, representing the mean \pm S.E.M. for the EFP slope of P1 (as a percentage of baseline) 50–60 min after HFS (late, green) alone, in the presence of fluoroacetate (FAC), or FAC plus D-serine (** p <0.01 one-way repeated-measures ANOVA, *post hoc* Fisher test). C, the paired-pulse ratio (P2/P1) from experiments in A, before (Control) and 60 min after HFS stimulation under the three conditions. Insets, representative traces of responses to the first (P1) and second (P2) stimuli, before (Control, brown) and 60 min after HFS (green). (TIF)

Acknowledgments

We are grateful to Martín García Servín and Ángel Méndez for technical assistance. We express our gratitude to Drs. Hugo Merchant, Fernando Peña, and Dorothy Pless for critically reviewing the manuscript. MLH received a scholarship from CONACyT (213708). This paper was part of the Ph.D. thesis of MLH in Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JGC MLH RAPA. Performed the experiments: MLH KSP RAM ACM. Analyzed the data: MLH KSP RAM ACM RAPA JGC. Contributed reagents/materials/analysis tools: RAPA JGC. Wrote the paper: MLH RAPA JGC. Supervised the project: RAPA JGC. Gave technical assistance: ACM.

References

- Ben Achour S, Pascual O (2010) Glia: the many ways to modulate synaptic plasticity. *Neurochem Int* 57: 440–445.
- Perea G, Araque A (2010) GLIA modulates synaptic transmission. *Brain Res Rev* 63: 93–102.
- Magistretti PJ (2006) Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. *J Exp Biol* 209: 2304–2311.
- Ventura R, Harris KM (1999) Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes. *J Neurosci* 19: 6897–6906.
- Bushong EA, Martone ME, Jones YZ, Ellisman MH (2002) Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J Neurosci* 22: 183–192.
- Mothet JP, Parent AT, Wolosker H, Brady RO, Jr., Linden DJ, et al. (2000) D-serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 4926–4931.
- Oliet SH, Mothet JP (2009) Regulation of N-methyl-D-aspartate receptors by astrocytic D-serine. *Neuroscience* 158: 275–283.
- Fossat P, Turpin FR, Sacchi S, Dulong J, Shi T, et al. (2011) Glial D-serine gates NMDA receptors at excitatory synapses in prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 22: 595–606.
- Henneberger C, Papouin T, Oliet SH, Rusakov DA (2010) Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes. *Nature* 463: 232–236.
- Takata N, Mishima T, Hisatsune C, Nagai T, Ebisui E, et al. (2011) Astrocyte calcium signaling transforms cholinergic modulation to cortical plasticity in vivo. *J Neurosci* 31: 18155–18165.
- Zhang Z, Gong N, Wang W, Xu L, Xu TL (2008) Bell-shaped D-serine actions on hippocampal long-term depression and spatial memory retrieval. *Cereb Cortex* 18: 2391–2401.
- Albuquerque EX, Pereira EF, Alkondon M, Rogers SW (2009) Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 89: 73–120.
- Rangani RJ, Upadhyaya MA, Nakhate KT, Kokare DM, Subhedar NK (2012) Nicotine evoked improvement in learning and memory is mediated through NPY Y1 receptors in rat model of Alzheimer's disease. *Peptides* 33: 317–328.
- Socci DJ, Sanberg PR, Arendash GW (1995) Nicotine enhances Morris water maze performance of young and aged rats. *Neurobiol Aging* 16: 857–860.
- Rezayof A, Shirazi-Zand Z, Zarrindast MR, Nayer-Nouri T (2010) Nicotine improves ethanol-induced memory impairment: the role of dorsal hippocampal NMDA receptors. *Life Sci* 86: 260–266.
- Sansone M, Castellano C, Battaglia M, Ammassari-Teule M (1991) Effects of oxiracetam-nicotine combinations on active and passive avoidance learning in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 39: 197–200.
- Jones GM, Sahakian BJ, Levy R, Warburton DM, Gray JA (1992) Effects of acute subcutaneous nicotine on attention, information processing and short-

- term memory in Alzheimer's disease. *Psychopharmacology (Berl)* 108: 485–494.
18. Newhouse P, Tatro A, Naylor M, Quealey K, Delgado P (2002) Alzheimer disease, serotonin systems, and tryptophan depletion. *Am J Geriatr Psychiatry* 10: 483–484.
 19. Decker MW, Majchrzak MJ, Anderson DJ (1992) Effects of nicotine on spatial memory deficits in rats with septal lesions. *Brain Res* 572: 281–285.
 20. Kenney JW, Gould TJ (2008) Modulation of hippocampus-dependent learning and synaptic plasticity by nicotine. *Mol Neurobiol* 38: 101–121.
 21. Levin ED, Christopher NC, Briggs SJ, Rose JE (1993) Chronic nicotine reverses working memory deficits caused by lesions of the fimbria or medial basolateral projection. *Brain Res Cogn Brain Res* 1: 137–143.
 22. Placzek AN, Zhang TA, Dani JA (2009) Nicotinic mechanisms influencing synaptic plasticity in the hippocampus. *Acta Pharmacol Sin* 30: 752–760.
 23. Jia Y, Yamazaki Y, Nakauchi S, Sumikawa K (2009) $\alpha 2$ nicotinic receptors function as a molecular switch to continuously excite a subset of interneurons in rat hippocampal circuits. *Eur J Neurosci* 29: 1588–1603.
 24. Le Magueresse C, Cherubini E (2007) Presynaptic calcium stores contribute to nicotine-elicited potentiation of evoked synaptic transmission at CA3-CA1 connections in the neonatal rat hippocampus. *Hippocampus* 17: 316–325.
 25. Matsuyama S, Matsumoto A (2003) Epibatidine induces long-term potentiation (LTP) via activation of $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) in vivo in the intact mouse dentate gyrus: both $\alpha 7$ and $\alpha 4\beta 2$ nAChRs essential to nicotinic LTP. *J Pharmacol Sci* 93: 180–187.
 26. Nakauchi S, Brennan RJ, Boulter J, Sumikawa K (2007) Nicotine gates long-term potentiation in the hippocampal CA1 region via the activation of $\alpha 2^*$ nicotinic ACh receptors. *Eur J Neurosci* 25: 2666–2681.
 27. Yamazaki Y, Jia Y, Niu R, Sumikawa K (2006) Nicotine exposure in vivo induces long-lasting enhancement of NMDA receptor-mediated currents in the hippocampus. *Eur J Neurosci* 23: 1819–1828.
 28. Gahring LC, Persyanov K, Rogers SW (2004) Neuronal and astrocyte expression of nicotinic receptor subunit $\beta 4$ in the adult mouse brain. *J Comp Neurol* 468: 322–333.
 29. Hernandez-Morales M, Garcia-Colunga J (2009) Effects of nicotine on K^+ currents and nicotinic receptors in astrocytes of the hippocampal CA1 region. *Neuropharmacology* 56: 975–983.
 30. Sharma G, Vijayaraghavan S (2001) Nicotinic cholinergic signaling in hippocampal astrocytes involves calcium-induced calcium release from intracellular stores. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 4148–4153.
 31. Ben Menachem-Zidon O, Avital A, Ben-Menahem Y, Goshen I, Kreisel T, et al. (2011) Astrocytes support hippocampal-dependent memory and long-term potentiation via interleukin-1 signaling. *Brain Behav Immun* 25: 1008–1016.
 32. Newman LA, Korol DL, Gold PE (2011) Lactate produced by glycolysis in astrocytes regulates memory processing. *PLoS One* 6: e28427.
 33. Zucker RS, Regehr WG (2002) Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol* 64: 355–405.
 34. Zucker RS (1989) Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 12: 13–31.
 35. Paxinos G, Watson C (2005) *The rat brain in stereotaxic coordinates*; Press EA, editor.
 36. He J, Deng CY, Zhu XN, Yu JP, Chen RZ (2003) Different synaptic mechanisms of long-term potentiation induced by nicotine and tetanic stimulation in hippocampal CA1 region of rats. *Acta Pharmacol Sin* 24: 398–402.
 37. Rose JE, Mukhin AG, Lokitz SJ, Turkington TG, Herskovic J, et al. (2010) Kinetics of brain nicotine accumulation in dependent and nondependent smokers assessed with PET and cigarettes containing ^{11}C -nicotine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 5190–5195.
 38. Shen JX, Yakel JL (2012) Functional $\alpha 7$ Nicotinic ACh Receptors on Astrocytes in Rat Hippocampal CA1 Slices. *J Mol Neurosci* 48: 14–21.
 39. Fonnum F, Johnsen A, Hassel B (1997) Use of fluorocitrate and fluoroacetate in the study of brain metabolism. *Glia* 21: 106–113.
 40. Waniewski RA, Martin DL (1998) Preferential utilization of acetate by astrocytes is attributable to transport. *J Neurosci* 18: 5225–5233.
 41. O'Mara SM, Rowan MJ, Anwyl R (1995) Metabotropic glutamate receptor-induced homosynaptic long-term depression and depotentiation in the dentate gyrus of the rat hippocampus in vitro. *Neuropharmacology* 34: 983–989.
 42. Lynch MA (2004) Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev* 84: 87–136.
 43. Whitlock JR, Heynen AJ, Shuler MG, Bear MF (2006) Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science* 313: 1093–1097.
 44. Yang Y, Ge W, Chen Y, Zhang Z, Shen W, et al. (2003) Contribution of astrocytes to hippocampal long-term potentiation through release of D-serine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 15194–15199.
 45. Le Houezec J, Halliday R, Benowitz NL, Callaway E, Naylor H, et al. (1994) A low dose of subcutaneous nicotine improves information processing in non-smokers. *Psychopharmacology (Berl)* 114: 628–634.
 46. Levin ED, McClernon FJ, Rezvani AH (2006) Nicotinic effects on cognitive function: behavioral characterization, pharmacological specification, and anatomic localization. *Psychopharmacology (Berl)* 184: 523–539.
 47. Levin ED, Simon BB (1998) Nicotinic acetylcholine involvement in cognitive function in animals. *Psychopharmacology (Berl)* 138: 217–230.
 48. Ciamei A, Aversano M, Cestari V, Castellano C (2001) Effects of MK-801 and nicotine combinations on memory consolidation in CD1 mice. *Psychopharmacology (Berl)* 154: 126–130.
 49. Matsuyama S, Matsumoto A, Enomoto T, Nishizaki T (2000) Activation of nicotinic acetylcholine receptors induces long-term potentiation in vivo in the intact mouse dentate gyrus. *Eur J Neurosci* 12: 3741–3747.
 50. Tang J, Dani JA (2009) Dopamine enables in vivo synaptic plasticity associated with the addictive drug nicotine. *Neuron* 63: 673–682.
 51. Wang J, Chen YB, Zhu XN, Chen RZ (2001) Activation of p42/44 mitogen-activated protein kinase pathway in long-term potentiation induced by nicotine in hippocampal CA1 region in rats. *Acta Pharmacol Sin* 22: 685–690.
 52. Mothet JP, Rouaud E, Sinet PM, Potier B, Jouveuceau A, et al. (2006) A critical role for the glial-derived neuromodulator D-serine in the age-related deficits of cortical mechanisms of learning and memory. *Aging Cell* 5: 267–274.
 53. Kanematsu S, Ishii S, Umino A, Fujihira T, Kashiwa A, et al. (2006) Evidence for involvement of glial cell activity in the control of extracellular D-serine contents in the rat brain. *J Neural Transm* 113: 1717–1721.
 54. Miya K, Inoue R, Takata Y, Abe M, Natsume R, et al. (2008) Serine racemase is predominantly localized in neurons in mouse brain. *J Comp Neurol* 510: 641–654.
 55. Rosenberg D, Kartvelishvily E, Shleper M, Klinker CM, Bowser MT, et al. (2010) Neuronal release of D-serine: a physiological pathway controlling extracellular D-serine concentration. *FASEB J* 24: 2951–2961.
 56. Williams SM, Diaz CM, Macnab LT, Sullivan RK, Pow DV (2006) Immunocytochemical analysis of D-serine distribution in the mammalian brain reveals novel anatomical compartmentalizations in glia and neurons. *Glia* 53: 401–411.
 57. Wolosker H (2011) Serine racemase and the serine shuttle between neurons and astrocytes. *Biochim Biophys Acta* 1814: 1558–1566.
 58. Shleper M, Kartvelishvily E, Wolosker H (2005) D-serine is the dominant endogenous coagonist for NMDA receptor neurotoxicity in organotypic hippocampal slices. *J Neurosci* 25: 9413–9417.
 59. Turpin F, Dallerac G, Mothet JP (2012) Electrophysiological analysis of the modulation of NMDA-receptors function by D-serine and glycine in the central nervous system. *Methods Mol Biol* 794: 299–312.
 60. Ikeda H, Murase K (2004) Glial nitric oxide-mediated long-term presynaptic facilitation revealed by optical imaging in rat spinal dorsal horn. *J Neurosci* 24: 9888–9896.
 61. Muir D, Berl S, Clarke DD (1986) Acetate and fluoroacetate as possible markers for glial metabolism in vivo. *Brain Res* 380: 336–340.
 62. Keyser DO, Pellmar TC (1994) Synaptic transmission in the hippocampus: critical role for glial cells. *Glia* 10: 237–243.
 63. Heinrich A, Ando R, Turi G, Rozsa B, Sperlagh B (2012) K^+ depolarization evokes ATP, adenosine and glutamate release from glia in rat hippocampus: a microelectrode biosensor study. *Br J Pharmacol* 167: 1003–1020.
 64. Uwechue NM, Marx MC, Chevy Q, Billups B (2012) Activation of glutamate transport evokes rapid glutamine release from perisynaptic astrocytes. *J Physiol* 590: 2317–2331.
 65. Berg-Johnsen J, Paulsen RE, Fonnum F, Langmoen IA (1993) Changes in evoked potentials and amino acid content during fluorocitrate action studied in rat hippocampal cortex. *Exp Brain Res* 96: 241–246.
 66. Bonansco C, Couve A, Perea G, Ferradas CA, Roncagliolo M, et al. (2011) Glutamate released spontaneously from astrocytes sets the threshold for synaptic plasticity. *Eur J Neurosci* 33: 1483–1492.
 67. Canals S, Larrosa B, Pintor J, Mena MA, Herreras O (2008) Metabolic challenge to glia activates an adenosine-mediated safety mechanism that promotes neuronal survival by delaying the onset of spreading depression waves. *J Cereb Blood Flow Metab* 28: 1835–1844.
 68. Larrosa B, Pastor J, Lopez-Aguado L, Herreras O (2006) A role for glutamate and glia in the fast network oscillations preceding spreading depression. *Neuroscience* 141: 1057–1068.
 69. Bacci A, Sancini G, Verderio C, Armano S, Pravettoni E, et al. (2002) Block of glutamate-glutamine cycle between astrocytes and neurons inhibits epileptiform activity in hippocampus. *J Neurophysiol* 88: 2302–2310.
 70. Swanson RA, Graham SH (1994) Fluorocitrate and fluoroacetate effects on astrocyte metabolism in vitro. *Brain Res* 664: 94–100.
 71. Kang J, Jiang L, Goldman SA, Nedergaard M (1998) Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nat Neurosci* 1: 683–692.
 72. Delbro D, Westerlund A, Bjorklund U, Hansson E (2009) Inflammatory reactive astrocytes co-cultured with brain endothelial cells nicotine-evoked Ca^{2+} transients are attenuated due to interleukin-1 β release and rearrangement of actin filaments. *Neuroscience* 159: 770–779.
 73. Oikawa H, Nakamichi N, Kambe Y, Ogura M, Yoneda Y (2005) An increase in intracellular free calcium ions by nicotinic acetylcholine receptors in a single cultured rat cortical astrocyte. *J Neurosci Res* 79: 535–544.
 74. Velez-Fort M, Audinat E, Angulo MC (2009) Functional $\alpha 7$ -containing nicotinic receptors of NG2-expressing cells in the hippocampus. *Glia* 57: 1104–1114.
 75. Mothet JP, Pollegioni L, Ouanounou G, Martineau M, Fossier P, et al. (2005) Glutamate receptor activation triggers a calcium-dependent and SNARE protein-dependent release of the gliotransmitter D-serine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 5606–5611.

76. Gibbs ME, Shleper M, Mustafa T, Burnstock G, Bowser DN (2012) ATP derived from astrocytes modulates memory in the chick. *Neuron Glia Biol*: 1–10.
77. Greenwood SM, Bushell TJ (2010) Astrocytic activation and an inhibition of MAP kinases are required for proteinase-activated receptor-2-mediated protection from neurotoxicity. *J Neurochem* 113: 1471–1480.
78. Yamazaki Y, Hamaue N, Sumikawa K (2002) Nicotine compensates for the loss of cholinergic function to enhance long-term potentiation induction. *Brain Res* 946: 148–152.
79. Citri A, Malenka RC (2008) Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 33: 18–41.
80. Malenka RC, Nicoll RA (1993) NMDA-receptor-dependent synaptic plasticity: multiple forms and mechanisms. *Trends Neurosci* 16: 521–527.
81. Malenka RC, Bear MF (2004) LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 44: 5–21.
82. Mayer ML, Westbrook GL, Guthrie PB (1984) Voltage-dependent block by Mg^{2+} of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature* 309: 261–263.
83. Perea G, Araque A (2007) Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science* 317: 1083–1086.
84. Rosato-Siri M, Cattaneo A, Cherubini E (2006) Nicotine-induced enhancement of synaptic plasticity at CA3-CA1 synapses requires GABAergic interneurons in adult anti-NGF mice. *J Physiol* 576: 361–377.
85. Szabo SI, Zelles T, Vizi ES, Lendvai B (2008) The effect of nicotine on spiking activity and Ca^{2+} dynamics of dendritic spines in rat CA1 pyramidal neurons. *Hippocampus* 18: 376–385.
86. Fellin T, Pascual O, Haydon PG (2006) Astrocytes coordinate synaptic networks: balanced excitation and inhibition. *Physiology (Bethesda)* 21: 208–215.
87. Bliss TV, Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361: 31–39.
88. Marti Barros D, Ramirez MR, Dos Reis EA, Izquierdo I (2004) Participation of hippocampal nicotinic receptors in acquisition, consolidation and retrieval of memory for one trial inhibitory avoidance in rats. *Neuroscience* 126: 651–656.
89. Fernandez de Sevilla D, Buño W (2010) The muscarinic long-term enhancement of NMDA and AMPA receptor-mediated transmission at Schaffer collateral synapses develop through different intracellular mechanisms. *J Neurosci* 30: 11032–11042.
90. Hasselmo ME (2006) The role of acetylcholine in learning and memory. *Curr Opin Neurobiol* 16: 710–715.
91. Araque A, Martin ED, Perea G, Arellano JI, Buño W (2002) Synaptically released acetylcholine evokes Ca^{2+} elevations in astrocytes in hippocampal slices. *J Neurosci* 22: 2443–2450.
92. Guizzetti M, Moore NH, Giordano G, Costa LG (2008) Modulation of neurogenesis by astrocyte muscarinic receptors. *J Biol Chem* 283: 31884–31897.
93. Perea G, Araque A (2005) Properties of synaptically evoked astrocyte calcium signal reveal synaptic information processing by astrocytes. *J Neurosci* 25: 2192–2203.
94. Navarrete M, Perea G, Fernandez de Sevilla D, Gomez-Gonzalo M, Nuñez A, et al. (2012) Astrocytes mediate in vivo cholinergic-induced synaptic plasticity. *PLoS Biol* 10: e1001259.
95. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N (2008) Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J* 22: 659–661.
96. Dani JA, Ji D, Zhou FM (2001) Synaptic plasticity and nicotine addiction. *Neuron* 31: 349–352.
97. Kelley AE (2004) Memory and addiction: shared neural circuitry and molecular mechanisms. *Neuron* 44: 161–179.
98. Nestler EJ (2002) Common molecular and cellular substrates of addiction and memory. *Neurobiol Learn Mem* 78: 637–647.
99. Robbins TW, Everitt BJ (2002) Limbic-striatal memory systems and drug addiction. *Neurobiol Learn Mem* 78: 625–636.
100. Zhang TA, Tang J, Pidoplichko VI, Dani JA (2010) Addictive nicotine alters local circuit inhibition during the induction of in vivo hippocampal synaptic potentiation. *J Neurosci* 30: 6443–6453.
101. Quik M, O'Neill M, Perez XA (2007) Nicotine neuroprotection against nigrostriatal damage: importance of the animal model. *Trends Pharmacol Sci* 28: 229–235.
102. Srivareerat M, Tran TT, Salim S, Aleisa AM, Alkadhhi KA (2011) Chronic nicotine restores normal A β levels and prevents short-term memory and E-LTP impairment in A β rat model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 32: 834–844.
103. Brunzell DH, McIntosh JM (2012) $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors modulate motivation to self-administer nicotine: implications for smoking and schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 37: 1134–1143.
104. Mineur YS, Picciotto MR (2010) Nicotine receptors and depression: revisiting and revising the cholinergic hypothesis. *Trends Pharmacol Sci* 31: 580–586.
105. Mansvelder HD, McGehee DS (2000) Long-term potentiation of excitatory inputs to brain reward areas by nicotine. *Neuron* 27: 349–357.
106. Fucile S (2004) Ca^{2+} permeability of nicotinic acetylcholine receptors. *Cell Calcium* 35: 1–8.