



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

PAPEL DE LOS DEPÓSITOS DE CALCIO INTRACELULAR EN
LOS PROCESOS DE FACILITACIÓN DE LA TRANSMISIÓN
SINÁPTICA EN GANGLIO SIMPÁTICO DE RATA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS
P R E S E N T A :
RAFAEL ANTONIO VARGAS VARGAS

DIRECTOR DE TESIS:

DR. MIGUEL ANGEL MORALES MENDOZA



MEXICO D.F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio del Doctor Miguel Angel Morales
Mendoza, del Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de
Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Para el financiamiento del proyecto se contó con recursos del Programa de
Apoyos a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT),
No. IN217702 y No. IN212406.

Rafael Antonio Vargas Vargas fue becario de la División General de Estudios de
Postgrados, DGEP, UNAM.

DEDICATORIA

Esta tesis esta dedicada a mi papá, mi mamá, mis hermanas, mis hermanos, a mis familiares y a mis amigos de ahora y de siempre, lejanos y cercanos, quienes permanentemente han estado a mi lado en los tiempos malos y difíciles, me apoyaron en los fracasos y han celebrados mis logros. Ellos han sido mi inspiración y mi aliciente y son quienes en estos cuatro años, día a día, me han apoyado en forma constante y me han dado la fuerza necesaria para lograr sacar adelante mi trabajo, mis sueños y parte de mi proyecto de vida.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Miguel Angel Morales Mendoza director del proyecto, por la confianza depositada, así como por la colaboración, enseñanza y apoyos permanentes.

Al Dr. Fredy Cifuentes, Investigador asociado, por el apoyo y colaboración permanente e incondicional.

A los doctores Arturo Hernández Cruz y José de Jesús García Colunga, miembros de mi comité tutorial, por su acertada labor, sus comentarios y sugerencias oportunas que me permitieron avanzar y cumplir con las metas propuestas.

A los doctores Mauricio Díaz, Gabriel Gutiérrez, Juan Carlos Gómora y Rogelio Arellano, miembros del jurado, por su participación, comentarios y sugerencias.

A Maria Elena Zetina, técnica del laboratorio por su colaboración permanente y apoyo incondicional.

Al Sr. Pedro Medina, técnico del laboratorio por sus enseñanzas, colaboración y apoyo permanente e incondicional.

A Cynthia, Alejandro, Anabel, Carla, Blanca, Marta, y a todos los demás compañeros de laboratorio, por los aportes, recomendaciones y sugerencias permanentes.

Al personal del Instituto de Investigaciones Biomédicas, directivos y empleados, quienes con su trabajo diario hacen posible que todos nuestros proyectos salgan adelante.

A la DGEP por la beca otorgada.

A la UNAM por la amplia gama de oportunidades de formación curricular y extracurricular que me brindó durante el doctorado.

A México y su gente, por que ellos con sus aportes y su esfuerzo diario, hacen posible que existan espacios académicos en donde las fronteras se borran y se hacen reales los sueños e ideales de igualdad, confraternidad y unidad Latinoamericanas.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES	5
A. Transmisión sináptica	5
B. Regulación del calcio neuronal	10
• Calcio extracelular	11
• Calcio intracelular	11
C. Potenciación a largo plazo o LTP	16
D. LTP en ganglio cervical superior	16
• Relevancia funcional de la LTP ganglionar	20
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA: CALCIO Y LTP GANGLIONAR	22
4. HIPÓTESIS	25
5. OBJETIVOS	26
6. METODOLOGÍA	27
A. Modelo experimental	27
B. Ensayos farmacológicos	29
C. Análisis de datos	30
7. RESULTADOS	32
A. Dos LTPs inducidas de manera consecutiva no muestran diferencias significativas	32
B. Efecto del calcio extracelular en la transmisión sináptica de GCS	32
• Efecto del calcio extracelular en la transmisión basal de GCS	32
• Efecto del calcio extracelular en la LTP de GCS	33

C. Efecto del calcio de las pozas intracelulares en la transmisión sináptica de GCS	34
• CICR prácticamente no contribuye a la transmisión basal de GCS	35
• El vaciamiento del calcio del RE por cafeína disminuye la LTP	35
• El bloqueo de RyR por dantrolene reduce la LTP	37
• El bloqueo de los receptores IP3 con Xestospongina C inhibe la LTP	37
• El bloqueo de la bomba SERCA con tapsigargina reduce la LTP	40
D. Grado de contribución del calcio intracelular pre y postsináptico en la LTP del GCS	42
• El bloqueo simultáneo de los receptores de IP3 pre y postsinápticos por heparina reduce la LTP	43
• El bloqueo presináptico de los receptores de IP3 por heparina disminuye la LTP	44
• El bloqueo postsináptico de los receptores de IP3 por heparina inhibe la LTP	45
8. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	47
A. Calcio y transmisión basal ganglionar	47
B. Calcio y LTP ganglionar	49
C. Participación pre y postganglionar de calcio intracelular en LTP	52
D. Conclusiones generales	53
9. BIBLIOGRAFÍA	57
10. APENDICE I	65
A. Generalidades de sistema nervioso autónomo	65
B. Ganglio cervical superior	66
• Estructura	68
• Función	70
11. APENDICE II	72
A. Artículo publicado	72
B. Artículo en preparación	87

RESUMEN

En el ganglio cervical superior de rata se presenta un fenómeno de facilitación sináptica del tipo de la potenciación de largo plazo (LTP) descrita en hipocampo. Este fenómeno similar a la LTP se obtiene mediante la aplicación de estímulos breves de alta frecuencia aplicados en el nervio preganglionar. Si bien los mecanismos que participan en la generación y mantenimiento de la LTP en ganglio no se conocen en detalle, desde los primeros estudios realizados fue evidente que el calcio es fundamental ya que su ausencia del medio extracelular impide la transmisión sináptica y con ello la generación de la LTP ganglionar. Más recientemente se mostró la participación de los canales de calcio dependiente de voltaje en la transmisión basal y en la LTP, así como la importancia del calcio proveniente de reservas intracelulares en la liberación de cotransmisores.

En el presente trabajo evaluamos el papel de las fuentes de calcio extracelular e intracelular en el control de la transmisión basal (TB) y la LTP ganglionar. De igual forma, caracterizamos el grado de contribución del calcio intracelular presináptico y postsinápticos en la LTP mediante el bloqueo diferencial de los receptores IP3.

Los experimentos realizados con diferentes concentraciones de calcio extracelular mostraron dos aspectos interesantes a recalcar: En primer lugar observamos que la TB y la LTP requirieron de diferentes umbrales mínimos de calcio. Se requirió del 25% del calcio extracelular para obtener la TB y 50% del calcio extracelular normal para obtener la LTP. En segundo, lugar la TB mostró un comportamiento saturable a 5 mM, mientras que la LTP aumentó a esta concentración.

En cuanto a la liberación de calcio de los depósitos intracelulares se observó que esta no contribuye en forma significativa a la TB, pero si se requiere para producir la LTP ya que la interferencia en la liberación de calcio intracelular redujo la duración de la LTP.

Adicionalmente, los experimentos realizados para establecer la participación del calcio intracelular presináptico del postsináptico mostraron que la participación de los depósitos de calcio intracelular dependientes de IP3 de la terminal presináptica es equivalente a la participación de los depósitos de calcio intracelular dependientes de IP3 de la terminal postsináptica.

Estos resultados apoyan la propuesta de que la LTP de ganglio cervical superior de rata es un fenómeno transináptico en el que el aporte de calcio, extracelular e intracelular, es fundamental para su expresión y que se requiere tanto de la participación de la terminal presináptica como de la postsináptica.

ABSTRACT

In the rat superior cervical ganglion can be elicited a phenomenon of synaptic facilitation similar to the long term potentiation (LTP) described in hippocampus. This phenomenon of LTP is obtained by a brief train of high frequency stimulation applied in the preganglionic nerve. Although the mechanisms that participate in the generation and maintenance of the LTP are not know in detail; from the first studies it was evident that the extracellular calcium is fundamental since its absence of extracellular medium prevents the basal synaptic transmission and impaired ganglionic LTP. Recently it has been shown the participation of the voltage-dependent calcium channels in the basal transmission and the LTP, and the importance of intracellular calcium stores in the release of cotransmitters.

In the present work we evaluated the paper of two calcium sources: extracellular and intracellular, in the basal transmission and the expression of the LTP. Similarly, through differential blockade of IP₃ receptors we characterized the relevance of pre and postsynaptic intracellular calcium in the LTP.

Experiments made with different extracellular calcium concentrations show two interesting aspects to remark: First, we observed that the basal transmission and the LTP show different minimum calcium thresholds. It was required 25% of extracellular calcium to obtain basal transmission and 50% of extracellular normal calcium to express LTP. Second, the basal transmission showed a saturable behavior at 5 mM, whereas the LTP it increased with this extracellular calcium concentration

Calcium release from intracellular stores does not contribute significantly to basal transmission, but is required to produce the LTP since the interference in the intracellular calcium release reduced LTP duration. We made experiments to establish the participation of pre or postsynaptic intracellular calcium in LTP. We observed that IP₃-dependent intracellular calcium stores in the presynaptic terminal contribute to LTP equivalent to postsynaptic IP₃-dependent intracellular calcium stores.

Data give support to the proposal that the LTP of superior cervical ganglion of rat is a transynaptic phenomenon in which extracellular and intracellular calcium sources are fundamental for its expression and that the contribution of pre and postsynaptic intracellular calcium stores are equivalent.

1. INTRODUCCIÓN

La potenciación a largo plazo (LTP) es un fenómeno que refleja la capacidad del sistema nervioso para modificar la eficacia de la transmisión sináptica (Lomo, 2003). Este fenómeno ha sido descrito tanto en sistema nervioso central como periférico. Uno de las estructuras periféricas en la que se manifiesta dicho fenómeno es el ganglio cervical superior de rata en el cual se presenta un fenómeno de facilitación sináptica similar a la potenciación de largo plazo (LTP) descrita en hipocampo (Bennett, 2000). Esta LTP ganglionar se obtiene mediante la aplicación de estímulos breves de alta frecuencia aplicados en el nervio preganglionar. Aunque los mecanismos que participan en la generación y mantenimiento de la LTP no se conocen en detalle, se ha establecido que el calcio extracelular es fundamental para la expresión del fenómeno, ya que su ausencia impiden tanto la transmisión sináptica, como la LTP ganglionar (Briggs et al., 1985a). Mas recientemente se mostró la participación de los canales de calcio dependientes de voltaje (P/Q, N y L) en la transmisión basal y en la LTP ganglionar (Cifuentes et al., 2004). De igual forma se ha mostrado la importancia del calcio de reservas intracelulares en la liberación de cotransmisores en ganglio cervical superior de anfibio (Peng, 1996).

En esta tesis se explora la posibilidad de que el calcio de las reservas intracelulares participe en la LTP ganglionar. Adicionalmente también exploraremos la participación de las dos fuentes de calcio, la extracelular y la

intracelular, tanto en la transmisión basal como en la LTP. Finalmente, a través del bloqueo diferencial de los receptores IP3 presinápticos y postsinápticos caracterizaremos el grado de contribución del calcio intracelular, liberado a través de estos receptores, en la expresión de la LTP.

1. ANTECEDENTES

A. Transmisión sináptica.

El sistema nervioso es un tipo de tejido excitable, altamente especializado, cuya función es extraer información proveniente de una gran variedad de estímulos internos y externos y traducirla a señales eléctricas llamadas potenciales de acción. Clásicamente se considera a la neurona como la unidad estructural y funcional del sistema nervioso. Las neuronas se comunican entre sí a través de estructuras especializadas denominadas sinapsis, la cual hace posible que las neuronas puedan establecer una serie de circuitos que participan en el control de diversos procesos biológicos que incluyen desde múltiples respuestas reflejas y el control de la función de órganos, hasta procesos más elaborados como la percepción y el pensamiento (Nicholls et al., 2001).

Existen dos tipos de sinapsis, las sinapsis eléctricas y las sinapsis químicas. En la **sinapsis eléctrica**, las neuronas se acoplan eléctricamente entre sí a través de complejos proteicos denominados uniones gap, las cuales permiten el flujo bidireccional de iones (sodio, calcio, potasio) y compuestos de bajo peso molecular (glucosa, aminoácidos, segundos mensajeros). Las uniones gap son pequeños canales formados por el ensamble de dos hemicanales denominados conexones. Cada conexón está constituido por 6 subunidades de proteínas transmembranales denominadas conexinas que al unirse forman un hemicanal con un poro central. Dos conexones de células adyacentes se alinean y anclan entre si para formar un canal intercelular. Las sinapsis eléctricas son más rápidas que las sinapsis químicas, no presentan

retardo sináptico, pueden conducir la señal eléctrica en forma uni o bidireccional y en vertebrados son abundantes en la retina y en la corteza cerebral (Figura 1B; Adley, 1989; Hormuzdi et al., 2004). La **sinapsis química** es una estructura de alta complejidad, asimétrica tanto en estructura como en función. En el ganglio, estructuralmente la sinapsis química está constituida por unos procesos neuronales preganglionares, una neurona posganglionar y un espacio interneuronal de 20 nm de ancho, denominado hendidura sináptica. Allí las membranas de las dos células adyacentes están unidas estrechamente mediante proteínas de adhesión celular (Figura 1A; Nicholls et al., 2001).

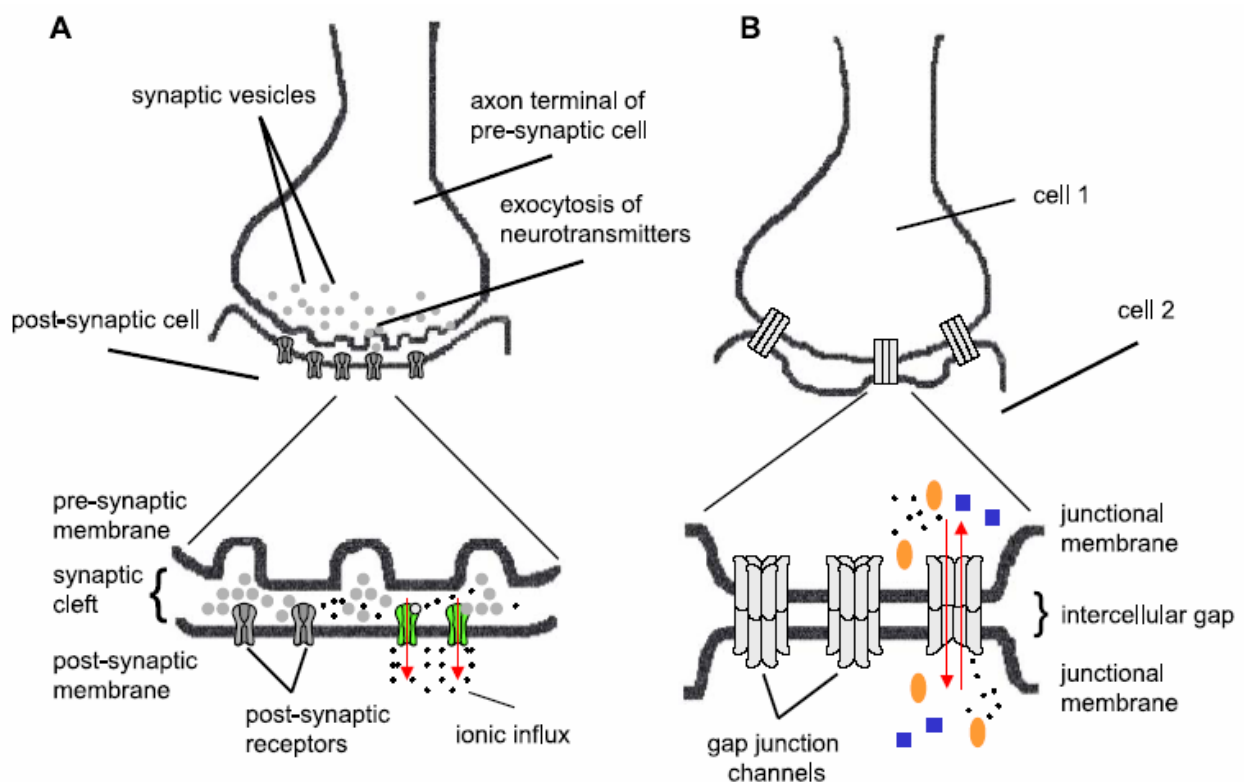


Figura 1. Tipos de sinapsis. **A:** Sinapsis química constituida por una terminal axónica presináptica y una terminal postsináptica separadas por la hendidura sináptica. El neurotransmisor contenido en vesículas es liberado en la hendidura sináptica, a través de la cual difunde y se une a receptores postsinápticos **B:** Sinapsis eléctrica constituida por canales (uniones gap) que permiten el paso de iones y compuestos de bajo peso molecular (Tomado de Hormuzdi et al., *Biochimica et Biophysica Acta*. 2004).

De la terminal axónica de la neurona preganglionar emergen proyecciones que forman botones presinápticos los cuales contienen vesículas que almacenan neurotransmisores, mismos que al ser liberados actúan como señal química. Los neurotransmisores se liberan en un sitio específico de la terminal presináptica, denominado zona activa; este sitio cuenta con la maquinaria necesaria para los procesos de adhesión y liberación de su contenido, el neurotransmisor (Becherer y Rettig, 2006; Schoch y Gundelfinger, 2006). Existen dos tipos de vesículas: las vesículas claras pequeñas, que contienen neurotransmisores clásicos y las vesículas grandes de núcleo denso (LDCV) que contienen neuropéptidos y neurotransmisores clásicos capaces de modular la transmisión sináptica (Torrealba y Carrasco, 2004; Merighi, 2002). Tanto el neurotransmisor clásico, como los moduladores difunden a través de la hendidura sináptica y se unen a receptores postsinápticos específicos. La zona postsináptica puede corresponder a una dendrita, o a una zona del cuerpo celular de la neurona postsináptica; al igual que en la terminación presináptica allí se encuentra un sitio especializado conocido como densidad postsináptica formado por un complejo de proteínas entrelazadas. Estas proteínas cumplen numerosas funciones como el anclaje y movimiento de receptores para neurotransmisores en la membrana plasmática, y el anclaje de varias proteínas reguladoras de la actividad de estos receptores y de mecanismos de señalización intracelular (Rosenmund et al., 2003; Ziff, 1997).

Desde el punto de vista funcional en la sinapsis la información se transmite en forma unidireccional, de la terminal presináptica hacia la terminal

postsináptica, a través de los neurotransmisores que se unen a los receptores transmembranales de la célula postsináptica. La transmisión sináptica se inicia con la llegada de un potencial de acción a la terminal nerviosa presináptica, en donde una población de vesículas liberables permanecen ancladas a la membrana sináptica (Becherer y Rettig, 2006). Cuando llega el potencial de acción se aumenta la probabilidad de apertura de canales de calcio dependientes de voltaje y la entrada de iones calcio. El incremento del calcio citoplasmático inicia una cascada de reacciones que producen la fusión de las membranas vesiculares con la membrana presináptica y la liberación del neurotransmisor a la hendidura sináptica (Oheim et al., 2006).

Los neurotransmisores liberados, que pueden ser excitatorios o inhibitorios, se unen a receptores postsinápticos ionotrópicos o metabotrópicos. Los receptores ionotrópicos, de respuesta rápida, funcionan como canales que permiten el flujo de iones hacia o desde el interior de la célula, lo cual cambia el potencial de membrana local y aumentan la probabilidad de apertura de los canales iónicos dependientes de voltaje cercanos generando flujos iónicos adicionales. El resultado es un cambio de voltaje postsináptico que se denomina potencial postsináptico excitatorio (PPE) en caso de flujos despolarizantes o potencial postsináptico inhibitorio (PPI) en caso de flujos hiperpolarizantes. La integración de los PPE en forma espacial y/o temporal pueden hacer que el potencial postsináptico alcance un potencial umbral y se dispare la propagación de la señal eléctrica a todo lo largo de la neurona postsináptica en forma de potencial de acción (Adley, 1989; Nicholls et al., 2001; Levitan y Kaczmarek, 2002).

La regulación de la transmisión sináptica se realiza removiendo el neurotransmisor, el cual puede ser capturado por la terminal presináptica a través de transportadores (transportador de aminoácidos, transportador de monoaminas) para su reciclaje, inactivación o degradación por enzimas especializadas (colinesterasas, catecol-oxi-metil transferasa: COMT, neuropeptidasas). Esta captura o degradación evita la desensibilización de los receptores postsinápticos y aumenta la probabilidad de que los potenciales de acción subsiguientes generen un PPE de la misma intensidad. La necesidad de una recaptación y el fenómeno de la desensibilización en los receptores implican que la eficiencia de la sinapsis puede modificarse si un tren de potenciales de acción llega en una sucesión rápida, un fenómeno que hace que la eficacia de la transmisión sináptica dependa de la frecuencia del potencial de acción. Dependiendo de la frecuencia a la cual es estimulada la terminal presináptica y la duración del tren de potenciales de acción aplicados, es posible producir bien un incremento o una disminución progresiva en la liberación de neurotransmisor. Esta propiedad que permite regular la cantidad de neurotransmisor liberado de acuerdo a la actividad previa en la terminal se denomina plasticidad homosináptica, de la cual se describen tres grandes formas: facilitación, potenciación y depresión (Levitan y Kaczmarek, 2002). El tamaño, número y tasa de reposición de las vesículas también está sujeto a regulación en múltiples puntos, desde los procesos de formación hasta los de reciclaje de la vesícula (Nicholls et al., 2001; Sudhof, 2004).

B. Regulación del calcio neuronal.

El calcio es un mensajero intracelular fundamental que regula una gran variedad de respuestas inmediatas, mediatas y tardías. En las neuronas algunos procesos claves para la transmisión sináptica como el tráfico axonal, la movilización de vesículas, la liberación de neurotransmisores y la modulación de los potenciales de acción, dependen de procesos en los cuales el calcio es fundamental (Kennedy, 1989; Berridge, 1997; Berridge, 1998; Thomas et al., 1996; Spadford y Zamponi, 2003).

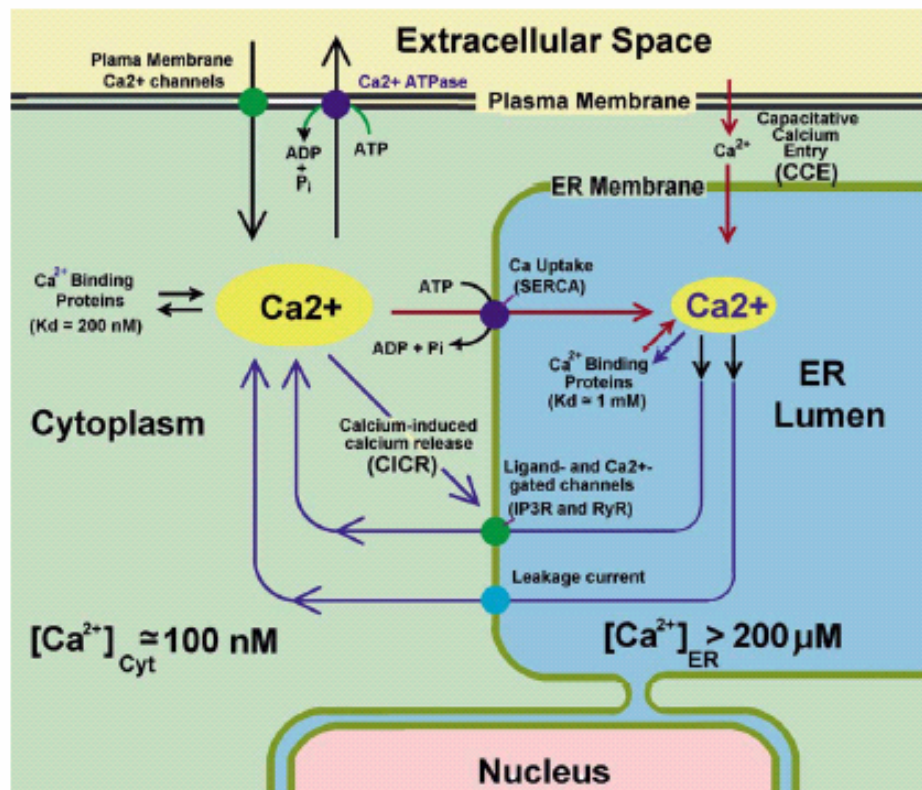


Figura 2. Mecanismos de señalización del calcio. Los niveles de calcio citoplasmático aumentan por entrada de calcio del medio extracelular o por liberación desde los depósitos intracelulares, este flujo se produce por la apertura de diversos tipos de canales. El incremento del calcio citoplasmático es limitado en tiempo y espacio por la presencia de sistemas buffer citoplasmáticos y por la activación de mecanismos de eliminación y/o recaptura (Tomado de Glazner y Ferryhough. Cell calcium. 2002).

La señal que activa estos procesos es el aumento de la concentración citoplasmática de calcio en forma temporal y local (la concentración de calcio citoplasmático basal es de 100 nM; ver figura 2). Este incremento se logra a expensas de dos fuentes de calcio: el medio extracelular y los depósitos intracelulares localizados en el retículo endoplásmico, la mitocondria, el aparato de Golgi y la envoltura nuclear entre otros (Berridge et al., 1998).

- **Calcio extracelular.**

El ingreso de calcio extracelular se realiza a través de canales iónicos los cuales pueden ser dependientes de voltaje (L, N, P/Q, y R) y/o los dependientes de ligando (AMPA, NMDA, kainato, 5HT₃ y nicotínicos tipo $\alpha 7$). El aumento generado por la entrada de calcio a través de estos canales es neutralizada por la expulsión del calcio citosólico a través de dos tipos de proteínas de membrana: las bombas de calcio dependientes de ATP y los intercambiadores iónicos, entre los cuales está el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$. En la reducción del calcio citosólico también participan proteínas de unión a calcio ($K_d \approx 200$ nM; calbindina, calmodulina) (figura 2; Berridge, 1998).

- **Calcio intracelular.**

Los depósitos intracelulares pueden liberar calcio al citoplasma a través de dos tipos de canales: los receptores de ryanodina (RYR) y los receptores de inositol trifosfato (IP₃R). Estos receptores pueden ser activados por un aumento en la concentración de calcio citoplasmático que produce una corriente de calcio hacia el citoplasma inducida por calcio y denominada CICR: calcium-induced

calcium release (Lee et al., 1994; Patterson et al., 2004; ver figura 2). Los niveles de calcio en los depósitos se mantienen debido a la captura del ión realizada por la bomba de calcio de ATP del retículo endoplásmico (SERCA).

El RyR es un homotetrámero constituido por monómeros de 500 kDa. Tiene sitios de unión a calcio y a moduladores como ATP y calmodulina. Posee una alta conductancia para iones monovalentes (600-750 pS) y divalentes (100-150 pS); el tiempo medio de apertura es de 20 ms. La probabilidad de apertura del canal depende del calcio citoplasmático, es alta con calcio 0.1-1 μM y se reduce con altos niveles ($>10 \mu\text{M}$). Se han identificado tres isoformas RyR1 a 3, la forma más abundante en sistema nervioso es el subtipo RyR2 (Berridge, 1993; Rossi y Sorrentino, 2002). Para caracterizar este receptor se han empleado fármacos que afectan su actividad como la cafeína y el dantroleno.

La cafeína fue el primer fármaco que permitió identificar la liberación de calcio de los depósitos intracelulares. El efecto de la cafeína sobre los receptores de ryanodina depende de su concentración. Estudios en canales RYR aislados han demostrado que la cafeína a concentraciones menores a 2 mM incrementa la probabilidad de apertura del canal en presencia de calcio citoplasmático del orden de micromolar. A concentraciones mayores de 5 mM abre el canal, aún frente a calcio citoplasmático bajo (picomoles) e incrementa el tiempo en el que permanece abierto el canal. La cafeína penetra rápidamente las membranas y la concentración intracelular se equilibra con la externa en 100-150 ms. (Rousseau et al., 1987; McPherson et al., 1991; Hua et al., 1994; Verkhratsky, 2005).

El dantroleno es un fármaco empleado originalmente como relajante muscular y posteriormente para el tratamiento de la hipertermia maligna. El mecanismo de acción es reducir la probabilidad de apertura de los canales RYR. Las concentraciones efectivas reportadas varían entre 10 y 90 μM (Ellis y Carpenter, 1972; Ohta et al., 1990; Verkhratsky, 2005).

El receptor para IP3 (IP3R) es también un homotetrámero, cada subunidad tiene cerca de 2700 aminoácidos y seis dominios transmembrana. Se han identificado cuatro isoformas IP3R1 a 4, los que se diferencian en su afinidad por IP3 ($K_d < 10 \text{ nM}$). La conductancia al calcio es de 50 pS y el tiempo de apertura de 4 ms. Al igual que RyR tienen una modulación bifásica por el calcio. La probabilidad de apertura del canal depende del calcio citoplasmático, es óptima con concentraciones de calcio de 300 nM, pero se inhibe con concentraciones de calcio más bajas o más altas. La presencia de IP3 aumenta la afinidad del calcio a los sitios de unión del canal (Berridge, 1993; Taylor y Laude, 2002). Para su caracterización también se han empleado fármacos que interfieren con su actividad como las xestosponginas, la heparina o los análogos del IP3.

Las Xestosponginas son un grupo de sustancias, aislada en 1997 de esponjas marinas, cuya acción es bloquear la liberación de calcio inducida por IP3. Se aislaron varios subtipos de Xestosponginas denominados A, C y D; de estas la Xestospongina C presentó un mayor bloqueo de la liberación de calcio. Esto se observó en vesículas aisladas de retículo endoplásmico de cerebelo (Gafni et al., 1997; De Smet et al., 1999; Castonguay y Robitaille, 2002). El

efecto final es reducir la probabilidad de apertura de los canales IP3R. Las concentraciones efectivas en cultivos celulares reportadas varían entre 5 y 20 μM . Si bien es cierto que inicialmente se describió a la Xestospongina C como un bloqueador selectivo de IP3R; trabajos recientes indican que también puede bloquear a la SERCA en forma similar a tapsigargina, induciendo el agotamiento del calcio intracelular (De Smet et al., 1999; Castonguay y Robitaille, 2002; Verkhratsky, 2005).

La heparina es una molécula compuesta por una cadena de polisacáridos de alto peso molecular (4 a 40 KDa), hidrosoluble, que no atraviesa membranas lipídicas. Se ha empleado como bloqueador de IP3R en modelos que incluyen bicapas lipídicas y miocitos permeabilizados. Actúa sobre estos receptores con concentraciones del orden de $\mu\text{g/ml}$; es menos útil a mayores concentraciones (mg/ml) ya que secuestra calcio libre (Kobayashi et al., 1989; Bultynck et al., 2003; Laporte et al., 2004). Se une con mayor afinidad a los receptores IP3R3 que al IP3R1 o al IP3R2 (De Smet et al., 1999; Nerou et al., 2001).

El nivel de calcio de los depósitos intracelulares se mantiene gracias a la recaptación que realiza la bomba de calcio del retículo endoplásmico SERCA y la participación de proteínas fijadoras de calcio tales como calsequestrina y calreticulina presentes en la luz de estos depósitos. La SERCA es una proteína que forma parte de la familia de ATPasas unidas a membranas capaces de transportar calcio empleando la energía química producida por la hidrólisis de ATP. El lado citoplasmático de la proteína tiene una alta afinidad por calcio

($K_a=10^{-6}$ a pH=7), mientras que del lado intracisterna la afinidad es baja ($K_a=10^{-3}$ a pH=7). Existen 3 isoformas SERCA 1, SERCA 2 (subtipos a y b) y SERCA 3 de las cuales SERCA 3 se expresa en sistema nervioso central (De Meis et al., 2005). Uno de los fármacos empleados en el estudio de la SERCA es la tapsigargina, cuyo efecto es bloquear la captura de calcio y provocar el vaciamiento de los depósitos de calcio intracelular (Shmigol et al., 1995; Laporte et al., 2004). La tapsigargina bloquea SERCA a concentraciones de 20 nM y causa una liberación lenta de calcio del RE. Inhibe canales de calcio tipo N y L a altas concentraciones: 0.2 – 2 μ M (Laporte et al., 2004).

La liberación de calcio de los depósitos de calcio a través de canales IP3R, paradójicamente, activa un mecanismo de entrada de calcio a través de la membrana plasmática llamado entrada capacitiva (Putney y McKay, 1999; Parekh, 2003). Una manifestación electrofisiológica de la entrada capacitiva de calcio es la denominada corriente de calcio activada por liberación de calcio (CRAC: Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} current). Existen evidencias que muestran como a la salida de calcio de los reservorios intracelulares, vía receptores IP3, se acopla una entrada de calcio al citoplasma, probablemente a través de los denominados receptores operados por depósitos (SOCs: Store operated calcium channels), presentes en la membrana plasmática. Un candidato a receptor tipo SOC es el receptor TRP3 (Van Rossum et al., 2000).

La activación o inactivación de todos estos elementos hacen que la concentración de calcio citoplasmático aumente o disminuya siguiendo un patrón característico que se describe en función del espacio como

microdominios de calcio y en función del tiempo como picos y ondas de calcio (Berridge, 1997; Thomas et al., 1996). Todos estos elementos mencionados son claves para garantizar la transmisión sináptica y para modificar su eficacia.

C. Potenciación a largo plazo o LTP.

La transmisión sináptica, evaluada con la amplitud del potencial de acción, puede aumentarse o, por el contrario, disminuirse e incluso inhibirse. Al aumento de la transmisión se le denomina facilitación y aquí se incluye el fenómeno denominado potenciación a largo plazo o LTP, término que se acuñó en los años setentas en estudios realizados en hipocampo de conejo (Bliss y Lomo, 1973; Bennett, 2000; Lomo, 2003). La LTP se define como un aumento en la eficacia de la transmisión sináptica, que permanece durante minutos, horas o incluso días y que se puede inducir por un tren de estímulos de alta frecuencia y corta duración. Se ha interpretado a la LTP como un reflejo de la capacidad del sistema nervioso para modificar de manera temporal o permanente los patrones de conexión sináptica y las rutas de interconexión entre las neuronas. Este fenómeno se ha estudiado en forma extensa en varias regiones del sistema nervioso central en donde se ha propuesto la participación del glutamato y los receptores AMPA y NMDA. Adicionalmente se identificaron zonas del sistema nervioso periférico, incluidos los ganglios simpáticos, que expresan la LTP (Dunant y Dolivo, 1968; Brown y McAfee, 1982; Briggs et al., 1985a; Briggs y McAfee, 1988; Cifuentes et al., 2004; Alkadhi et al., 2005).

D. LTP en ganglio cervical superior.

Si bien el término LTP se acuñó en los estudios realizados en hipocampo de conejo (Bliss y Lomo, 1973; Bennett, 2000; Lomo, 2003), un fenómeno similar

se había identificado en ganglio simpático (Dunant y Dolivo, 1968). Los estudios de LTP en ganglio se retomaron en la década de los 80 con el fin de aclarar los mecanismos que permiten la expresión de este fenómeno de facilitación (Brown y McAfee, 1982; McAfee et al., 1987).

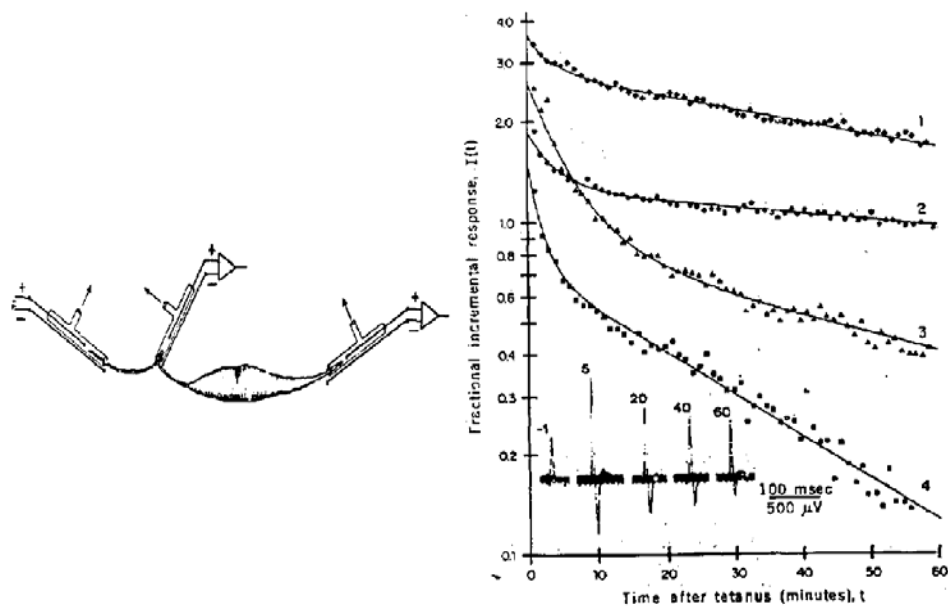


Figura 3. LTP en ganglio cervical de rata. Se observa el modelo de ganglio cervical superior *in vitro* con electrodos de succión en el nervio preganglionar y postganglionar; un asa del nervio preganglionar tiene un electrodo de succión para registrar potenciales de acción presinápticos. El gráfico muestra el curso temporal de 4 experimentos diferentes. El inserto muestra potenciales de acción antes de inducir la LTP y luego de inducirla a los 5, 20, 40 y 60 minutos, se observa que la amplitud de estos potenciales es mayor a la amplitud del potencial inicial (tomado de Brown y McAfee. Sciences. 1982).

La LTP ganglionar se puede inducir a través de estímulos eléctricos o químicos, tanto *in vivo* como *in vitro*. Para la inducción eléctrica se inicia con estímulos basales de baja frecuencia (0.2 Hz) en el tronco nervioso preganglionar y se registra la respuesta en forma de potenciales de acción compuesto (PAC, corresponden a los potenciales de campo del hipocampo) en

el tronco posganglionar. Luego de que los PAC se estabilizan se suspende temporalmente el estímulo basal y se cambia por un tren condicionante o inductor de la LTP de alta frecuencia (40 Hz) y corta duración (3 – 5 s). Luego se continúa con el estímulo basal (figura 3).

En las primeras investigaciones realizadas en ganglio aislado aplicando trenes de estímulos de corta duración, se describieron dos fases en la respuesta del ganglio posterior al estímulo: la primera fase se presenta en los primeros 3 a 5 minutos y se caracteriza por una disminución rápida de la amplitud de los PAC. La segunda fase presenta una reducción lenta y progresiva hasta llegar a la amplitud basal de los PAC, con una duración de 1 a 3 horas. La fase inicial se consideró como potenciación posttetánica (PTP) y la fase tardía como la expresión de la LTP (Figura 5; Brown y McAfee, 1982; McAfee et al., 1987).

Existe controversia acerca de si el fenómeno de LTP ganglionar depende de mecanismos presinápticos o postsinápticos (Dolphin, 1985; Bachoo et al., 1992a). Los primeros experimentos realizados en ganglio aislado de rata con trenes de estímulos de corta duración evidenciaron que la LTP en la transmisión sináptica se correlacionaba temporalmente con un incremento prolongado en la liberación de acetilcolina (Briggs et al., 1985b). No se observaron cambios en la sensibilidad de las células postsinápticas a agonistas nicotínicos (Briggs et al., 1985a; Brown y McAfee, 1982), lo que apoyaba la idea de considerar la LTP como un fenómeno presináptico. Estos resultados contrastan con trabajos que soportan la idea de la LTP como fenómeno postsináptico. En experimentos realizados en ganglio estelar de gato *in situ* (Bachoo et al., 1992b) se observó

expresión de la LTP, pero el incremento concomitante en la liberación de acetilcolina sólo se observó durante los primeros minutos. La LTP se logró inducir tanto con estímulos homosinápticos, como heterosinápticos. Se encontró además un aumento de la respuesta postsináptica a pulsos de acetilcolina. Con estos hallazgos se propuso que la LTP podía ser originada por cambios postsinápticos, más que presinápticos y que involucraría un aumento en la sensibilidad de los receptores nicotínicos. También se propuso que estos cambios postsinápticos podían ser disparados por la liberación desde las LDCV de un cotransmisor no colinérgico durante la estimulación de alta frecuencia (Bachoo et al., 1992b; Morales et al., 1993; Collier, 1996). Los neuropéptidos surgieron como candidatos a inductores de la LTP, ya que se almacenan en LDCV y su liberación se ve favorecida por estímulos eléctricos de alta frecuencia similar a la frecuencia inductora de LTP (20 a 40 Hz); además, la disminución de la reserva de LDCV por estimulación de alta frecuencia en forma prolongada disminuye el número de LDCV e impide la expresión de la LTP; misma que se restablece una vez que se recuperan las LDCV al cabo de siete días (Bachoo et al., 1992b).

En los últimos años han surgido otras propuestas en donde se involucra la participación activa de las células SIF, liberando serotonina, en la LTP ganglionar. La serotonina actuaría sobre receptores serotoninérgicos tipo 5-HT₃ pre y post sinápticos, los cuales son receptores ionotrópicos permeables a calcio. La entrada de calcio induciría cambios en vías de señalización intracelular (CaMKII, AMPc, PKA, PKC) que favorecerían el aumento en la transmisión sináptica, sin embargo los mecanismos finales no son claros

(Alkadhi et al., 2005). En contra de esta propuesta se argumenta que el número de células SIF (< 5%) es bajo en comparación al número total de neuronas ganglionares.

- **Relevancia funcional de la LTP ganglionar.**

A pesar del concepto que se tiene de la LTP como un fenómeno propio del hipocampo, esta debe considerarse como un fenómeno mucho más general que se expresa a todos los niveles del sistema nervioso: corteza cerebral, retina, ganglios periféricos y placa neuromuscular (Bennett, 2000).

En el hipocampo, en donde el glutamato y sus receptores juegan un papel fundamental, el aumento de la eficacia sináptica se correlaciona, en condiciones normales, con procesos de memoria y aprendizaje (Bennett, 2000; Lomo, 2003). Por el contrario el incremento de la eficacia en la transmisión sináptica en forma anormal, exagerada se correlaciona con patologías como la epilepsia.

En el ganglio cervical superior, en donde el neurotransmisor principal es la acetilcolina, el aumento de la eficacia sináptica podría contribuir a mantener el tono visceral, de tal manera que con estímulos regulares, cortos, de alta frecuencia, el ganglio aumenta su eficacia de transmisión para que el mantenimiento del tono visceral requiera menor actividad nerviosa. Así mismo se ha sugerido que la LTP ganglionar puede ser una respuesta normal, adaptativa, reversible y temporal frente a señales de alarma internas (hipoxia, acidosis) o externas (situaciones de estrés). Un incremento anormal de la eficacia sináptica ganglionar en forma aguda eleva el tono visceral, lo que se refleja en el aumento de la presión arterial por ejemplo, como sucede en

situaciones de estrés; de igual forma, un incremento exagerado y sostenido en la eficacia sináptica, produce un tono vascular elevado que desencadena, en forma crónica, patologías como la hipertensión arterial inducida por el estrés (Alkadhi et al., 2001). En casos de reducción anormal de la eficacia sináptica, no hay LTP y el tono visceral se reduce. La ausencia o disminución de la eficacia en la transmisión sináptica ganglionar, concomitante con la no expresión de la LTP, explicaría algunos síntomas cardiovasculares (hipotensión arterial, bradicardia) característicos del envejecimiento y de algunas patologías como la diabetes mellitus y el hipotiroidismo (Alzoubi et al., 2004; Alkadhi et al., 2005).

A pesar de la intensa investigación realizada en las décadas anteriores para aclarar los mecanismos desencadenantes de la LTP en SNC, aún existe mucha controversia sobre los mecanismos involucrados en dicho fenómeno. Estudiar los mecanismos responsables de la expresión y mantenimiento de la LTP, además de responder a cuestiones fundamentales de las neurociencias sobre neurotransmisión y plasticidad planteadas desde hace varias décadas, abre la posibilidad de explorar los mecanismos regulatorios del organismo que participan en diversos fenómenos tales como la memoria y el aprendizaje, o como la regulación de las funciones vitales viscerales. Aclarar tales mecanismos permitiría desarrollar terapias que pueden contribuir a mejorar la calidad de vida de individuos con patologías relacionadas con alteración de la eficacia en la transmisión sináptica (hipertensión arterial, hipotiroidismo, epilepsia).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA: CALCIO Y LTP GANGLIONAR

Si bien los mecanismos que participan en el fenómeno LTP no se conocen en detalle, los primeros estudios evidenciaron que la ausencia de calcio del medio extracelular impide la transmisión sináptica y la generación de la LTP ganglionar (Briggs et al., 1985a). La presencia de canales de calcio tipo N, P/Q, L y R en terminales axónicas preganglionares estaría regulando estos procesos (Spadford y Zamponi, 2003; Cifuentes et al., 2004). Se ha observado que la estimulación eléctrica a bajas frecuencias provoca liberación de acetilcolina (McLahan, 1974; Briggs et al., 1985b), la cual se dispara debido a la entrada de calcio a través de canales de calcio tipo N y P/Q (Gonzalez-Burgos et al., 1995; Cifuentes et al., 2004). El calcio favorece los procesos de adhesión y fusión de las vesículas claras, que contienen acetilcolina, a la zona activa de la terminal preganglionar (Llinás et al., 1992). A diferencia de la estimulación de baja frecuencia un tren de estímulos de alta frecuencia (≥ 20 Hz) induce la entrada de calcio adicional vía canales de calcio tipo L por 2 a 3 minutos. Esto induce la liberación de acetilcolina almacenada en un grupo de vesículas claras de reserva, generando un primer componente rápido de la LTP (González Burgos et al., 1995).

Adicionalmente el incremento de calcio por su entrada a través de los canales L, induce la liberación desde las LDCV de un cotransmisor inductor de la LTP. Una vez liberado este inductor actuaría a través de receptores específicos en la postsinapsis, produciendo el aumento de la eficacia sináptica

que caracteriza a la LTP ganglionar.

En un estudio previo de laboratorio se exploró la participación de los canales dependientes de voltaje en el fenómeno de la LTP (Cifuentes et al., 2004). En este trabajo se encontró que el bloqueo de los canales tipo P/Q, N y L afectan la expresión de la LTP. Derivado de este trabajo se propuso entonces que la entrada de calcio a través de los canales tipo P/Q, N y L produce un aumento en la concentración citoplasmática de este ión que provocará la liberación del inductor de la LTP. La propuesta también sugiere que una vez liberado el inductor pudiera, a través de su acople a receptores específicos postsinápticos, inducir cambios en la concentración de calcio postsináptico como parte de los mecanismos involucrados en el aumento de la eficacia sináptica que sostiene la LTP (figura 4). Ahora bien, los resultados de ese estudio mostraron la contribución a la LTP de una de las fuentes de calcio, la extracelular, mediada por el paso a través de canales membranales dependientes de voltaje; sin embargo, aunque se propuso no se revisó la posible contribución de las otras fuentes de calcio: la proveniente de los reservorios intracelulares tipo retículo endoplásmico, aparato de Golgi y mitocondria.

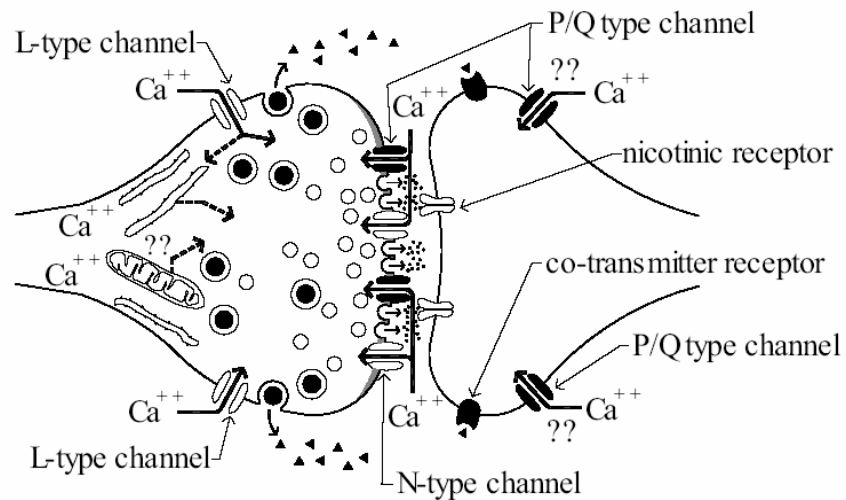


Figura 4. Modelo propuesto del papel del calcio en la LTP en ganglio cervical de rata. Se representa una sinapsis ganglionar luego de un tren condicionante con vesículas pequeñas claras, LDCV y tres tipos de canales de calcio: N, P/Q (en la zona activa) y L (próximos a la zona activa). En la membrana postsináptica se representan receptores nicotínicos y receptores para cotransmisores. Durante el tren condicionante el calcio ingresa a través de canales de calcio tipo N y P/Q (zona activa) ocasionando un aumento transitorio en la liberación de acetilcolina (puntos) desde vesículas pequeñas claras. Simultáneamente la entrada de calcio vía canales L puede inducir la liberación de calcio de depósitos intracelulares (flechas discontinuas) y con ello aumentar la probabilidad de liberación de cotransmisores (triángulos) desde LDCV, que actuarían en receptores postsinápticos para incrementar la eficacia sináptica. Adicionalmente la presencia de canales tipo P/Q en la membrana postsináptica contribuirían al incremento de la eficacia sináptica. Tomado de Cifuentes et al., Neuroscience. 2004.

En esta tesis se explora la posibilidad de que el calcio liberado de las pozas intracelulares a través del mecanismo de CICR contribuya también a la LTP. Para entender el papel del calcio no solo en la LTP sino también en la transmisión basal, exploramos la participación de las dos fuentes de calcio, la extracelular y la intracelular en estos procesos ganglionares. Finalmente, a través del bloqueo diferencial de los receptores IP3 presinápticos y postsinápticos caracterizamos el grado de contribución del CICR, mediado por estos receptores pre y postsinápticos en la expresión de la LTP.

4. HIPÓTESIS

- A. El calcio proveniente del medio extracelular y el liberado de pozas intracelulares tienen diferente grado de contribución a la transmisión basal y la LTP del ganglio simpático.
- B. En la expresión de la LTP participan los mecanismos de CICR tanto presinápticos como postsinápticos.

5. OBJETIVOS

- A. Determinar el grado de contribución del calcio proveniente del medio extracelular y el liberado de pozas intracelulares en la TB y en la LTP del ganglio simpático.
- B. Evaluar el grado de participación del calcio intracelular presináptico y postsináptico en la LTP ganglionar.

6. METODOLOGÍA

A. Modelo experimental.

Se emplea como modelo experimental el ganglio cervical superior aislado de rata, el cual se obtiene de ratas macho tipo Wistar de aproximadamente 250 gramos de peso. Todas las ratas usadas se sometieron a anestesia general con xilacina (10 mg/kg) y ketamina (90 mg/kg). Para la extracción del ganglio se practica una incisión cervical longitudinal antero-medial, se realiza una traqueostomía para mantener permeable la vía aérea, posteriormente se realiza disección por planos hasta llegar a la arteria carótida común. La arteria se toma como punto de referencia para ubicar al ganglio, el cual esta ubicado en posición posteromedial a la arteria. El ganglio se disecciona tomando como referencia los nervios pre y posganglionar y se extrae. Luego se transfiere a una cámara con solución de Krebs, para retirarle la cápsula de tejido conectivo que lo envuelve.

El ganglio aislado se coloca en una cámara de registro de 3 ml con solución fisiológica de Krebs. Esta solución contiene NaCl, 136 mM; KCl 4 mM; KH₂PO₄ 1 mM; MgCl₂ 1 mM; CaCl₂ 2 mM; NaHCO₃ 12 mM; glucosa 11 mM; pH 7.4, y atropina 2 μM. El ganglio se mantiene a temperatura ambiente (22 - 25°C), con oxigenación continua (95% O₂, 5% CO₂). El estímulo se aplica a través de un electrodo de succión colocado en el tronco simpático (extremo preganglionar) y la respuesta se registra mediante otro electrodo de succión instalado en el nervio carotideo interno (extremo postganglionar). Para la

estimulación se emplea un estimulador Grass S88 (Quincy, MA, USA); se inicia con estimulación basal continua aplicando pulsos cuadrados de 0.5 ms, con frecuencia de 0.2 Hertz y con amplitud supraumbral (10 - 15 voltios). La respuesta, obtenida como potenciales de acción compuestos (PAC), se registra empleando un preamplificador Grass P-15 AC durante 10 a 20 minutos hasta su estabilización. El preamplificador permite magnificar los PAC capturados desde el electrodo de registro (ganancia de 1000) y filtrar el ruido de la señal mediante un filtro pasabanda (0.3 Hz – 3 kHz). Los PACs son visualizados en un osciloscopio (Tektronix Beaverton, OR, USA), y digitalizados mediante una tarjeta de adquisición (LabMaster, Scientific Solution, Mentor, OH, USA) para ser archivados y posteriormente analizados. El programa para adquisición y análisis de datos empleado es Pclamp 6.0 (Axon Instruments, Foster City, CA, USA).

Luego de estabilizado el PAC se agrega hexametonio 100 μ M a la solución de baño para bloquear en forma parcial la transmisión sináptica nicotínica (20 a 30 % de la respuesta inicial); esto para evitar una saturación de la respuesta posterior al tren condicionante, por reclutamiento de todas las fibras postganglionares. La estimulación basal se cambia por un tren de estímulos de alta frecuencia (40 Hertz por 3 segundos) que se sabe induce la LTP. Al término del tren se restablece (a los 5 segundos) la estimulación basal de 0.2 Hz y sus respuestas se registran durante 90 a 100 minutos posterior al tren.

Una ventaja de la preparación de gcs es la posibilidad de inducir dos

LTPs en forma consecutiva. Así que luego de este primer ensayo se hace un recambio de la solución de Krebs con hexametonio y se espera entre 20 – 30 minutos hasta que el PAC se estabilice y sea similar al del primer ensayo. Luego de esto se induce una segunda LTP. La primera LTP se utiliza como control y la segunda LTP se emplea para evaluar el efecto de diferentes soluciones y fármacos.

B. Ensayos farmacológicos.

Se realizaron dos tipos de ensayos: en el primer grupo de ensayos se evalúa el efecto de diferentes concentraciones de calcio extracelular (0.1, 0.2, 0.5, 1 y 5 mM) en la transmisión basal y en la LTP ganglionar. En el segundo grupo de ensayos se evalúa, en forma separada, el efecto tanto en la transmisión basal como en la LTP ganglionar de fármacos que actúan sobre diferentes receptores o bombas de los depósitos intracelulares: cafeína (0.5, 1 y 10 mM) y dantrolene (10, 25 y 100 μ M) sobre receptores de ryanodina; Xestospongina C (10 y 100 nM) sobre receptores IP3 y tapsigargina (10 nM, 100 nM y 1 μ M) sobre SERCA. Este grupo de fármacos tiene como característica común la liposolubilidad, por lo que atraviesan fácilmente membranas biológicas. La libre difusión hace que afecten tanto la terminal presináptica, como la postsináptica, lo que hace imposible discriminar entre componentes pre y postsinápticos. Para discriminar el papel de los depósitos de calcio IP3 dependientes presinápticos de los postsinápticos en otro grupo de experimentos se empleo heparina, un fármaco hidrosoluble, no permeable que bloquea receptores IP3.

La solución con bajo calcio o el fármaco permeable se aplican en la

solución de baño del ganglio durante 20 a 40 minutos, previo al tren condicionante, con el fin de garantizar la estabilización del PAC. En el caso de la heparina se aplicó en el nervio preganglionar, en el nervio postganglionar o en ambos mediante electrodos de succión cargados con solución de heparina.

C. Análisis de datos.

Para evaluar el fenómeno de LTP se miden las amplitudes de los potenciales obtenidos antes del tren condicionante e inmediatamente posterior a este y durante una hora. Los datos de cada experimento se grafican como una curva temporal en la cual en el eje X está el tiempo y en el eje Y las amplitudes relativas post tren condicionante, calculadas como la razón entre la amplitud del PAC basal y las amplitudes de los PAC post-tren: $\Delta R/R_0 = R_i/R_0 - 1$ (R_i = PAC post-tren; R_0 = PAC pre-tren). La gráfica de cada experimento se ajusta a una función doble exponencial: $f(t) = f(0) + ae^{-t/\tau_1} + ce^{-t/\tau_2}$

Se obtienen cuatro parámetros: a , τ_1 , c y τ_2 , los cuales permiten comparar la primera y la segunda LTP. Los parámetros a y τ_1 , de la primera exponencial, se emplean para evaluar el componente rápido o potenciación post-tetánica (PTP). De la segunda exponencial se obtienen los parámetros c y τ_2 , que permiten calcular los parámetros para evaluar el componente lento o LTP: **Duración de la LTP**, es el tiempo de caída de la LTP hasta llegar al 20% ($f(t)=0.2$) por arriba del valor control. **Extensión de la LTP**, es el área bajo la curva obtenida por integración desde el tiempo cero ($t=0$) hasta el momento en que se llega al 20% ($f(t)=0.2$) de la potenciación (figura 5A). La constante de la función $f(0)$ se igualó a cero para mejorar ajuste de los datos experimentales.

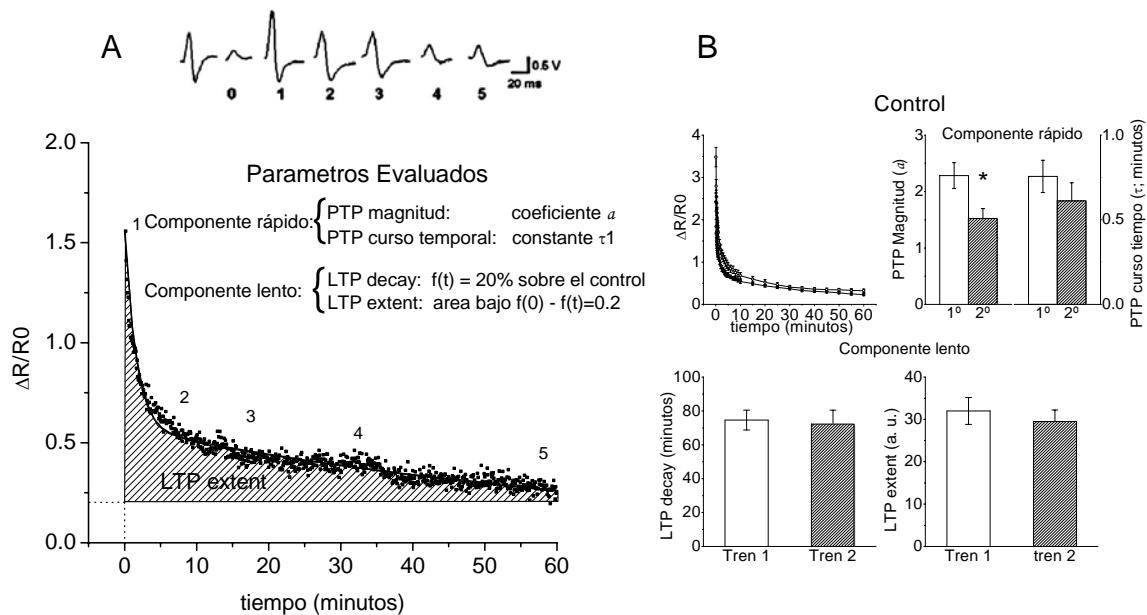


Figura 5. Curso temporal y parámetros evaluados en la LTP de GCS. **A:** Gráfica del curso temporal de la LTP y su ajuste a una función doble exponencial. Los parámetros evaluados para comparar la primera y la segunda LTP fueron: para el componente rápido (o PTP), coeficiente a y la constante de tiempo τ_1 . Para el componente lento (o LTP): **Duración de la LTP**, es el tiempo de caída de la LTP hasta llegar a 20% (t_{20}) por arriba del valor control. **Extensión de la LTP**, es el área bajo la curva obtenida por integración desde el tiempo cero ($f(0)$) hasta el momento en que se llega al 20% de la potenciación ($f(t)=0.2$). El inserto muestra los PACs registrados en la terminal posganglionar antes y después de hexametonio (0 – 1) y a los 0.5, 5, 20, 35 y 60 minutos posttren. Barras de calibración 0.5 mV y 20 ms. **B:** Curso temporal de dos LTP consecutivas empleadas como control y parámetros de los componentes rápido y lento de la LTP. Solo se observaron diferencias significativas en la magnitud del PTP (2.28 ± 0.23 vs. 1.52 ± 0.17 ; $p=0.01$). La constante de tiempo (τ_1) de la PTP no mostró diferencias significativas (0.76 ± 0.09 vs. 0.61 ± 0.1 min; $p=0.25$). El componente lento o LTP presentó una duración (74.59 ± 5.8 vs. 71.69 ± 8.7 min; $p=0.77$) y extensión (31.99 ± 3.17 vs. 29.38 ± 2.85 ; $p=0.14$), que tampoco mostraron diferencias significativas (Vargas et al. Dev Neurobiol, 2007).

Para el análisis estadístico empleamos la prueba de t de Students de muestras independientes para experimentos con diferentes concentraciones de calcio y con heparina. En los experimentos con cafeína, dantrolene, Xestospongina C y taspigargina empleamos la prueba de t pareada. El nivel de significancia fue de $P < 0.05$.

7. RESULTADOS

A. Dos LTPs inducidas de manera consecutiva no muestran diferencias significativas.

Los parámetros del componente rápido después del primer tren condicionante fueron: magnitud de la PTP 2.28 ± 0.23 y constante de tiempo de 0.76 ± 0.09 minutos. En el segundo tren la magnitud se redujo significativamente en un 33 % (1.52 ± 0.17 , $p=0.01$), la constante de tiempo no presentó diferencias significativas (0.61 ± 0.1 , $p=0.25$). En cuanto a los parámetros de la primera y segunda LTP no se presentaron diferencias significativas (figura 5B): duración de la LTP (74.6 ± 5.8 vs. 71.7 ± 8.7 min; $p=0.77$); extensión de la LTP (32.0 ± 3.2 vs. 29.4 ± 2.9 ; $p=0.14$). Estos resultados son similares a datos obtenidos en el laboratorio en trabajos previos (Cifuentes et al., 2004).

B. Efecto del calcio extracelular en la transmisión sináptica de GCS.

Para estudiar el efecto del calcio extracelular tanto en la transmisión basal como en la LTP se registró el PAC ganglionar en solución de Krebs inicialmente y luego se cambió el Krebs por soluciones con cada una de las concentraciones de calcio a evaluar (0.1, 0.2, 0.5, 1 y 5 mM) en forma independiente. Luego de 30 minutos (ya estabilizada la transmisión basal) se registra el PAC en condiciones de calcio extracelular modificado y se induce la LTP.

- **Efecto del calcio extracelular en la transmisión basal de GCS.**

La disminución del calcio extracelular ocasionó una reducción del PAC (figura 6A), el efecto fue mayor con bajas concentraciones (0.1 y 0.2 mM) en donde

la amplitud del PAC se redujo en forma significativa $70\pm 10\%$ ($p=0.022$) y $39\pm 15\%$ ($p=0.016$), respectivamente. Concentraciones de calcio 0.5 y 1 mM no afectaron en forma significativa el PAC ($p=0.088$ y $p=0.063$). Con calcio 5 mM el cambio en el PAC tampoco fue estadísticamente significativa ($p=0.09$).

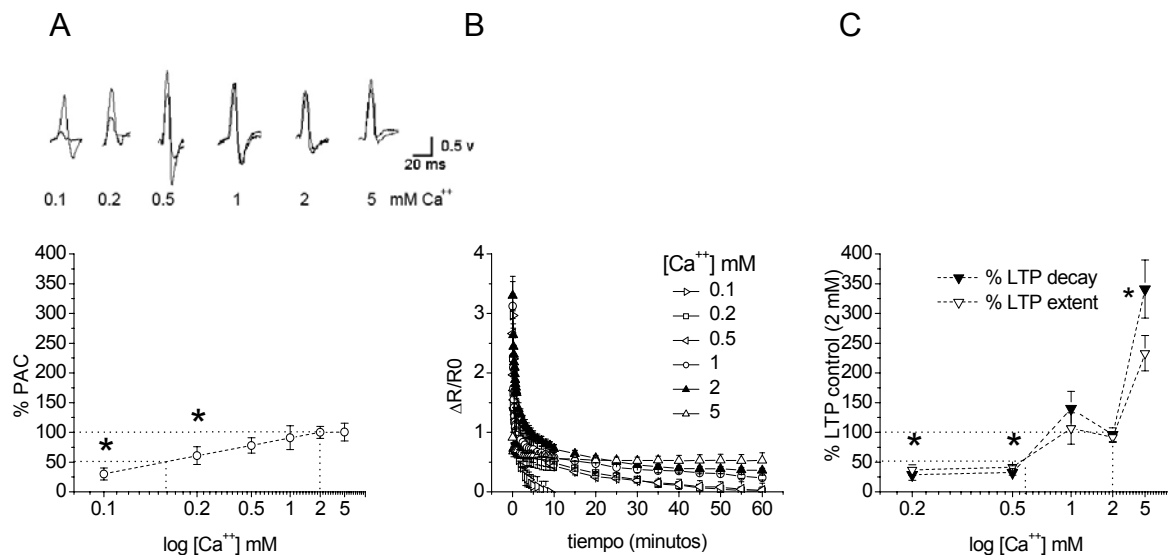


Figura 6. Distintos efectos de diferentes concentraciones de calcio extracelular en la transmisión basal y la LTP. **A:** Curva dosis-respuesta de concentración de calcio extracelular vs. porcentaje de amplitud del PAC, 100% corresponde a 2 mM de calcio. Se observa reducción del PAC con 0.1 ($70\pm 10\%$, $p=0.02$) y 0.2 mM ($39\pm 15\%$, $p=0.01$). No se observaron diferencias significativas con otras concentraciones. Inserto muestra PAC registrados antes y después de someter el gcs a concentraciones de calcio extracelular de 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 y 5 mM. Barras de calibración 0.5 v y 20 ms. **B:** Curso temporal de la LTP a las diferentes concentraciones de calcio evaluadas. **C:** Curva dosis-respuesta de concentración de calcio extracelular vs. porcentaje de duración (\blacktriangle) y extensión de LTP (\triangle) se observaron cambios en ambos parámetros con calcio 0.2 mM: $70.8\pm 1.0\%$, $p=0.003$; $63.3\pm 8.8\%$, $p=0.001$, respectivamente; y calcio 0.5 mM: $67.6\pm 4.5\%$, $p=0.00001$; $58.4\pm 2.3\%$, $p=0.0002$, respectivamente. No se presentó LTP con calcio 0.1 mM. Con calcio 5 mM LTP tanto la duración como la extensión se incrementaron: $341\pm 48.9\%$ ($p=0.01$) y $273\pm 23.3\%$ ($p=0.02$) respectivamente.

- **Efecto del calcio extracelular en la LTP de GCS.**

No se presentó LTP con concentraciones de calcio 0.1 mM, mientras que se presentó LTP con las otras concentraciones evaluadas. Los parámetros del componente rápido se afectaron en forma significativa con concentraciones de

calcio 0.2 mM y 0.5 mM. Específicamente se observaron diferencias significativas en la constante de tiempo con calcio 0.2 mM (control 0.76 ± 0.09 vs. 0.29 ± 0.07 , $p=0.004$) y calcio 0.5 mM (control 0.76 ± 0.09 vs. 0.37 ± 0.04 , $p=0.005$). Con concentraciones de calcio 1 y 5 mM no se observaron diferencias significativas ni en la magnitud, ni en la constante de tiempo.

Tabla 1. Efectos de diferentes concentraciones de calcio extracelular en los componentes rápido y lento de la LTP.

Experimental Type	n	PTP(a)	P value PTP(τ_1)	P value LTP decay	P value LTPextent	P value
Control	8	2.28 ± 0.23	0.75	0.76 ± 0.09	74.59 ± 5.8	0.001*
Calcio 0.2	3	2.12 ± 0.41		0.29 ± 0.07	21.77 ± 7.44	0.003*
Control	8	2.28 ± 0.23	0.29	0.76 ± 0.09	74.59 ± 5.8	0.00001*
Calcio 0.5	6	2.72 ± 0.32		0.37 ± 0.04	24.13 ± 3.38	0.0002*
Control	8	2.28 ± 0.23	0.56	0.76 ± 0.09	74.59 ± 5.8	0.9
Calcio 1	3	2.74 ± 0.66		0.39 ± 0.21	104.60 ± 21.62	0.29
Control	8	2.28 ± 0.23	0.87	0.76 ± 0.09	74.59 ± 5.8	0.02*
Calcio 5	4	2.20 ± 0.40		0.89 ± 0.23	254.46 ± 36.50	0.01*

El mantenimiento de la LTP también es dosis-dependiente: Se redujo la duración y la extensión de la LTP con respecto al control con concentraciones de calcio de 0.2 ($70.8 \pm 1.0\%$, $p=0.003$; $63.3 \pm 8.8\%$, $p=0.001$, respectivamente) y 0.5 mM ($67.6 \pm 4.5\%$, $p=0.00001$; $58.4 \pm 2.3\%$, $p=0.0002$). Los parámetros de la LTP con calcio 1 mM no fue diferente significativamente del control. Con concentraciones de calcio de 5 mM se observó un incremento significativo en la duración ($341 \pm 48.9\%$ $p=0.01$) y la extensión ($233 \pm 23.3\%$ $p=0.02$) de la LTP (tabla 1; figura 6B y 6C).

C. Efecto del calcio de las pozas intracelulares en la transmisión sináptica de GCS.

En el segundo grupo de ensayos se evaluó, en forma separada, el efecto

tanto en la transmisión basal como en la LTP ganglionar de fármacos que actúan sobre diferentes receptores o bombas de los depósitos intracelulares: cafeína y dantrolene que actúan sobre receptores de ryanodina; Xestospongina C que bloquea receptores IP3 y tapsigargina que bloquea la bomba SERCA. Este grupo de fármacos tiene como característica común la liposolubilidad, por lo que atraviesan fácilmente membranas biológicas. El efecto común de todos ellos es que interfieren con los mecanismos CICR, bien sea bloqueando la liberación de calcio (dantrolene, Xestospongina C) o agotando las reservas de calcio intracelular (cafeína, tapsigargina).

- **CICR prácticamente no contribuye a la transmisión basal de GCS.**

Se evaluaron los efectos sobre la transmisión basal de cafeína, dantrolene, xestospongina y tapsigargina a diferentes concentraciones. Observamos que cafeína solo a la dosis mayor de 10 mM redujo la amplitud del PAC un $74 \pm 15\%$ ($p=0.01$) mientras que dosis de 0.5 mM y 1 mM no alteraron el PAC (figura 7A). Los otros tres fármacos evaluados: dantrolene, Xestospongina C y tapsigargina tampoco afectaron significativamente el PAC (figura 7B-D).

- **El vaciamiento del calcio del RE por cafeína disminuye la LTP.**

Para las diferentes concentraciones evaluadas (0.5, 1 y 10 mM) el componente rápido, solo se afectó con cafeína 0.5 mM en donde la constante de tiempo se redujo significativamente un $60.8 \pm 9.4\%$ (0.74 ± 0.12 vs. 0.29 ± 0.07 , $p=0.04$, figura 8C; tabla 2).

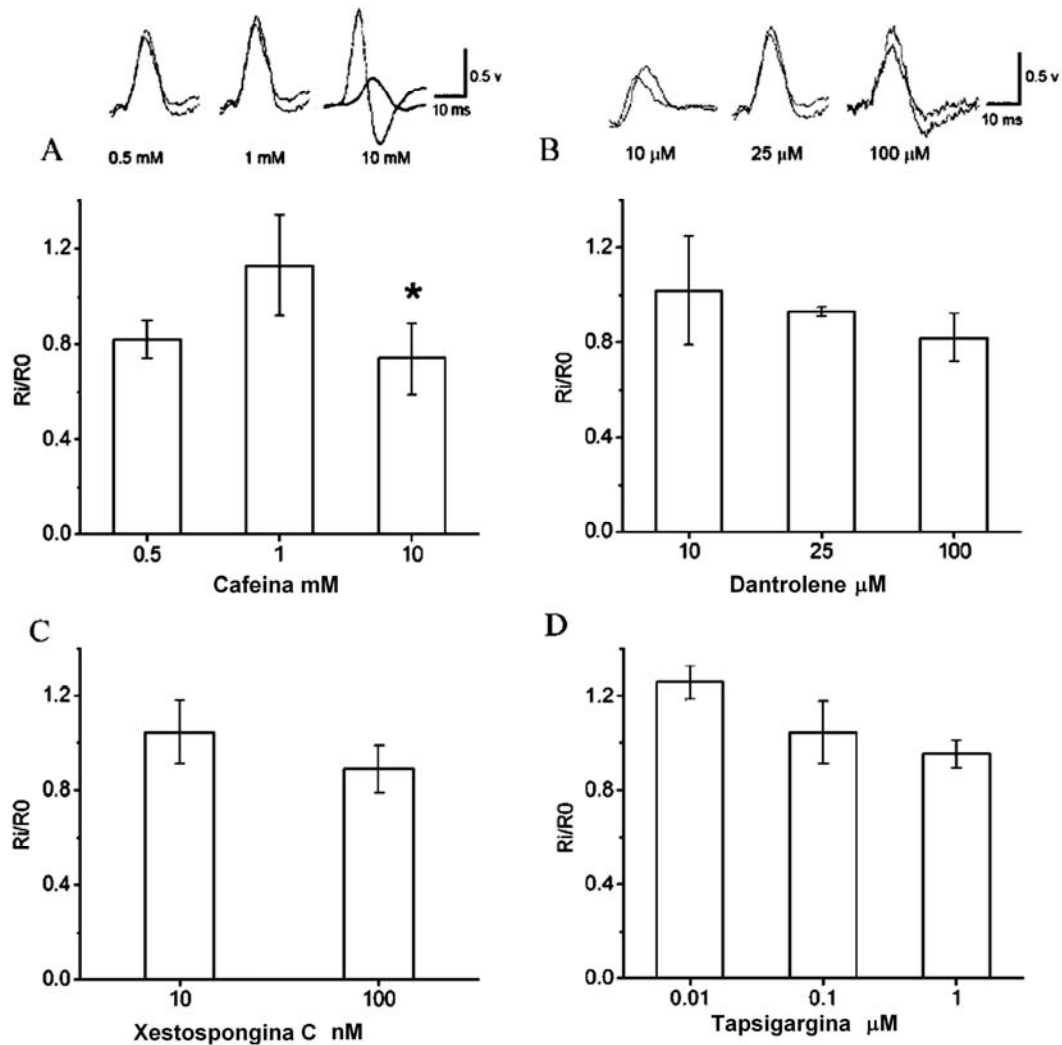


Figura 7. Efecto de diferentes fármacos en la transmisión basal de GCS. A: Cafeína 0.5 mM, 1 mM y 10 mM. B: Dantrolene 10 μ M, 25 μ M y 100 μ M. C: Xestospongina C 10 nM y 100 nM. D: Tapsigargina 10 nM, 100 nM y 1 μ M. Los insertos muestran los PAC registrados antes y después de la aplicación de cafeína (A) y dantrolene (B). Barras de calibración 0.5 V y 10 ms.

Se observó una reducción significativa en la duración de la LTP: $77.5 \pm 3.6\%$ ($p=0.005$) con respecto al control con 10 mM de cafeína; $74.4 \pm 5.4\%$ ($p=0.02$) de reducción con 1 mM y $68.1 \pm 6.4\%$ ($p=0.004$) con 0,5 mM. En la extensión de la LTP se presentaron cambios similares: del $77.8 \pm 4.1\%$ ($p=0.02$) con 10 mM de cafeína, del $73 \pm 6.7\%$ ($p=0.02$) con 1 mM y del $62.3 \pm 6.9\%$ ($p=0.01$) con 0.5 mM (figura 8A – D; tabla 2).

- **El bloqueo de RyR por dantroleno reduce la LTP.**

Para las diferentes concentraciones evaluadas de dantroleno (10, 25 y 100 μM) el componente rápido de la LTP no se afectó en forma significativa. La duración de la LTP se redujo en forma significativa en todos los casos: $81.8 \pm 2.8\%$ ($p=0.007$) de reducción con respecto al control con 100 μM de dantrolene, $65.2 \pm 6.7\%$ ($p=0.02$) con 25 μM y $58.7 \pm 3.9\%$ ($p=0.001$) con 10 μM . En la extensión de la LTP se presentaron cambios similares: reducción del $69.3 \pm 4.8\%$ ($p=0.01$) con 100 μM , del $49.0 \pm 11.5\%$ ($p=0.01$) con 25 μM y del $51.9 \pm 5.7\%$ ($p=0.001$) con 10 μM (figuras 9A – D; tabla 2).

- **El bloqueo de los receptores IP3 con Xestospongina C inhibe la LTP.**

Para las diferentes concentraciones de Xestospongina C evaluadas (100 y 10 nM) no se observaron diferencias significativas en los parámetros del componente rápido. Se observó una reducción significativa de la duración de la LTP: $74.6 \pm 7.2\%$ ($p=0.03$) con 10 nM y $80.4 \pm 4.7\%$ ($p=0.003$) con 100 nM. En la extensión de la LTP se presentaron cambios similares: reducción del $65.1 \pm 9.4\%$ ($p=0.03$) con 10 nM y del $75.3 \pm 7.5\%$ ($p=0.002$) con 100 nM (figura 10A – B; tabla 2).

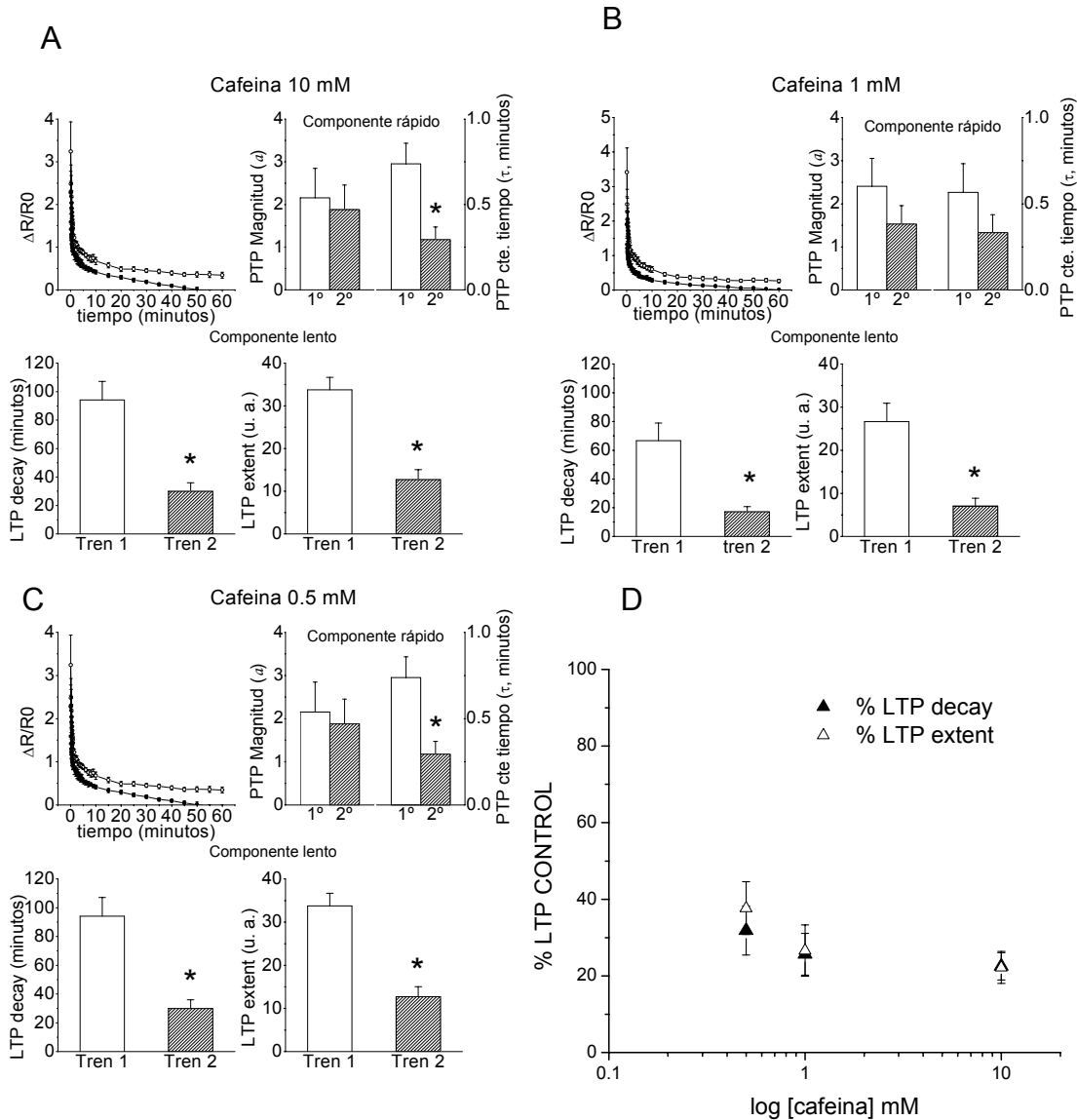


Figura 8. Efecto de la activación de RyR con cafeína en la LTP. **A**, **B** y **C** muestran el curso temporal y los parámetros de los componentes rápido y lento de la LTP control (○) y con cafeína (●) a concentraciones de 10 mM, 1 mM y 0.5 mM respectivamente. **D**: Curva dosis-respuesta de concentración cafeína vs porcentaje de duración (▲) y extensión de LTP (△). La constante de tiempo del componente rápido se afectó con cafeína 0.5 mM (**C**) en $60.8 \pm 9.4\%$ ($p=0.04$). Las tres dosis redujeron tanto la duración (▲) en $77.5 \pm 3.6\%$, $p=0.005$; $74.4 \pm 5.4\%$, $p=0.02$ y $68.1 \pm 6.4\%$, $p=0.004$, respectivamente; como la extensión de la LTP (△) en $77.8 \pm 4.1\%$, $p=0.02$; $73 \pm 6.7\%$, $p=0.02$ y $62.3 \pm 6.9\%$, $p=0.01$, respectivamente (u. a. unidades arbitrarias).

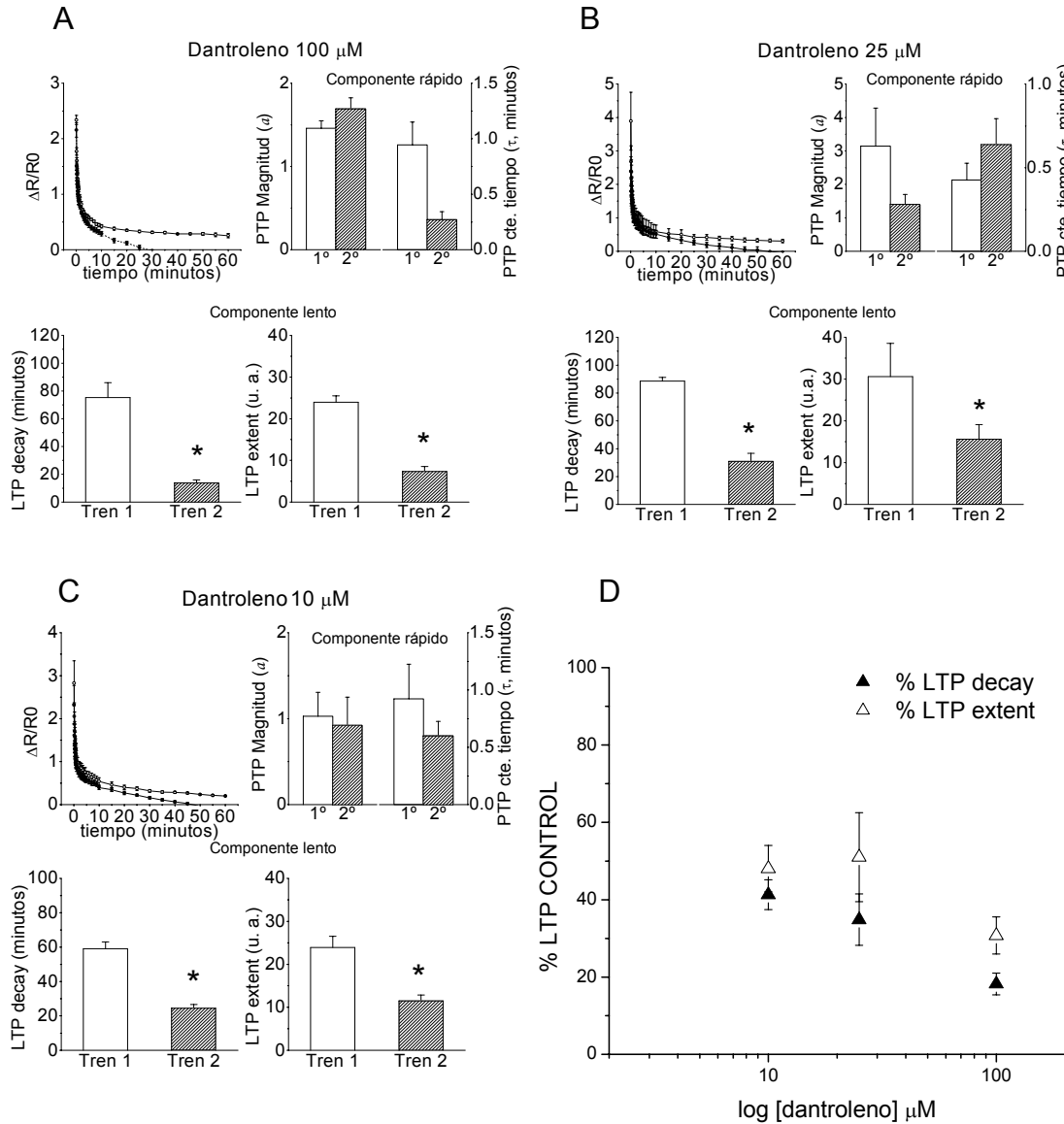


Figura 9. Efecto del bloqueo de RYR con dantroleno. A, B y C muestran el curso temporal y los parámetros de los componentes rápido y lento de la LTP control (\circ) y con dantroleno (\bullet) a concentraciones de 100 μM , 25 μM y 10 μM respectivamente. D: Curva dosis-respuesta de concentración dantroleno vs porcentaje de duración (\blacktriangle) y extensión de LTP (Δ). Las tres dosis redujeron tanto la duración (\blacktriangle): $81.8 \pm 2.8\%$, $p=0.007$; $65.2 \pm 6.7\%$, $p=0.02$ y $58.7 \pm 3.9\%$, $p=0.001$, respectivamente; como la extensión de la LTP (Δ): $69.3 \pm 4.8\%$, $p=0.01$; $49.0 \pm 11.5\%$, $p=0.01$ y $51.9 \pm 5.7\%$, $p=0.001$, respectivamente (u. a. unidades arbitrarias).

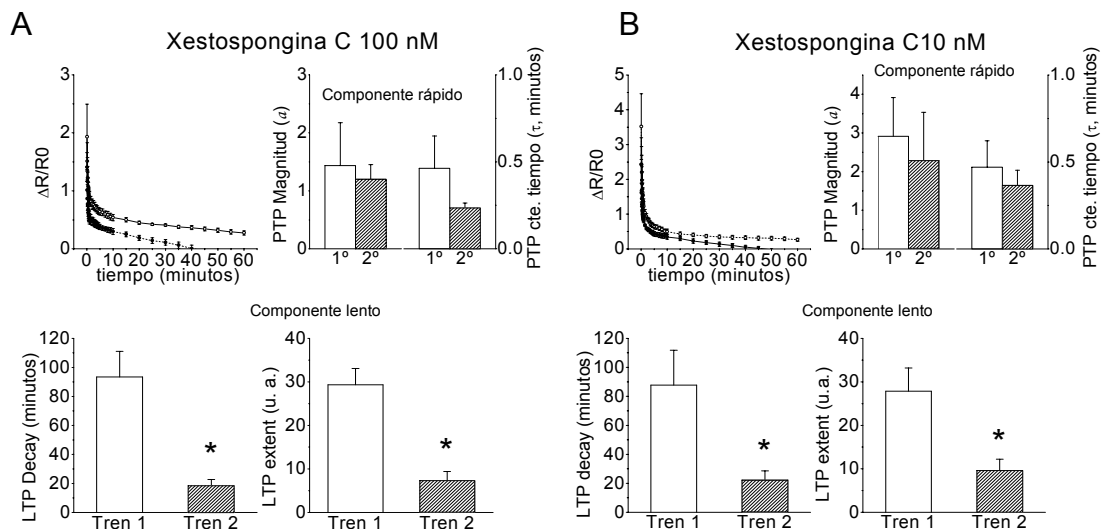


Figura 10. Efecto del bloqueo de IP3R con Xestospongina C en la LTP de GCS. A y B muestran el curso temporal de la LTP control (\circ) y experimental (\bullet); y los parámetros de los componentes rápido y lento de la LTP con concentraciones de 10 y 100 nM. El componente rápido no se afectó a las dosis evaluadas. Se observó reducción significativa en duración ($80.4 \pm 4.7\%$, $p=0.003$ y $74.6 \pm 7.2\%$, $p=0.03$) y extensión de la LTP ($75.3 \pm 7.5\%$, $p=0.002$ y $65.1 \pm 9.4\%$, $p=0.03$; u. a. unidades arbitrarias).

- **El bloqueo de la bomba SERCA con tapsigargina reduce la LTP.**

La constante de tiempo del componente rápido se redujo $54.2 \pm 13.2\%$; ($p=0.02$) con 10 nM de tapsigargina. No se observaron diferencias significativas en los parámetros del componente rápido con las otras concentraciones evaluadas. En cuanto al componente lento o LTP se observó una reducción significativa de la duración: $61.8 \pm 6.8\%$ ($p=0.005$) de reducción con 10 nM, del $67.1 \pm 7.7\%$ ($p=0.02$) con 100 nM y del $68.9 \pm 6.3\%$ ($p=0.006$) con 1 μ M (figura 11A - D). En la extensión de la LTP se presentaron cambios similares: reducción del $53.2 \pm 6.8\%$ ($p=0.01$) con tapsigargina 10 nM, del $59.0 \pm 12.5\%$ ($p=0.01$) con 100 nM y del $62.8 \pm 5.3\%$ ($p=0.002$) con 1 μ M de tapsigargina (figura 11A - D; tabla 2).

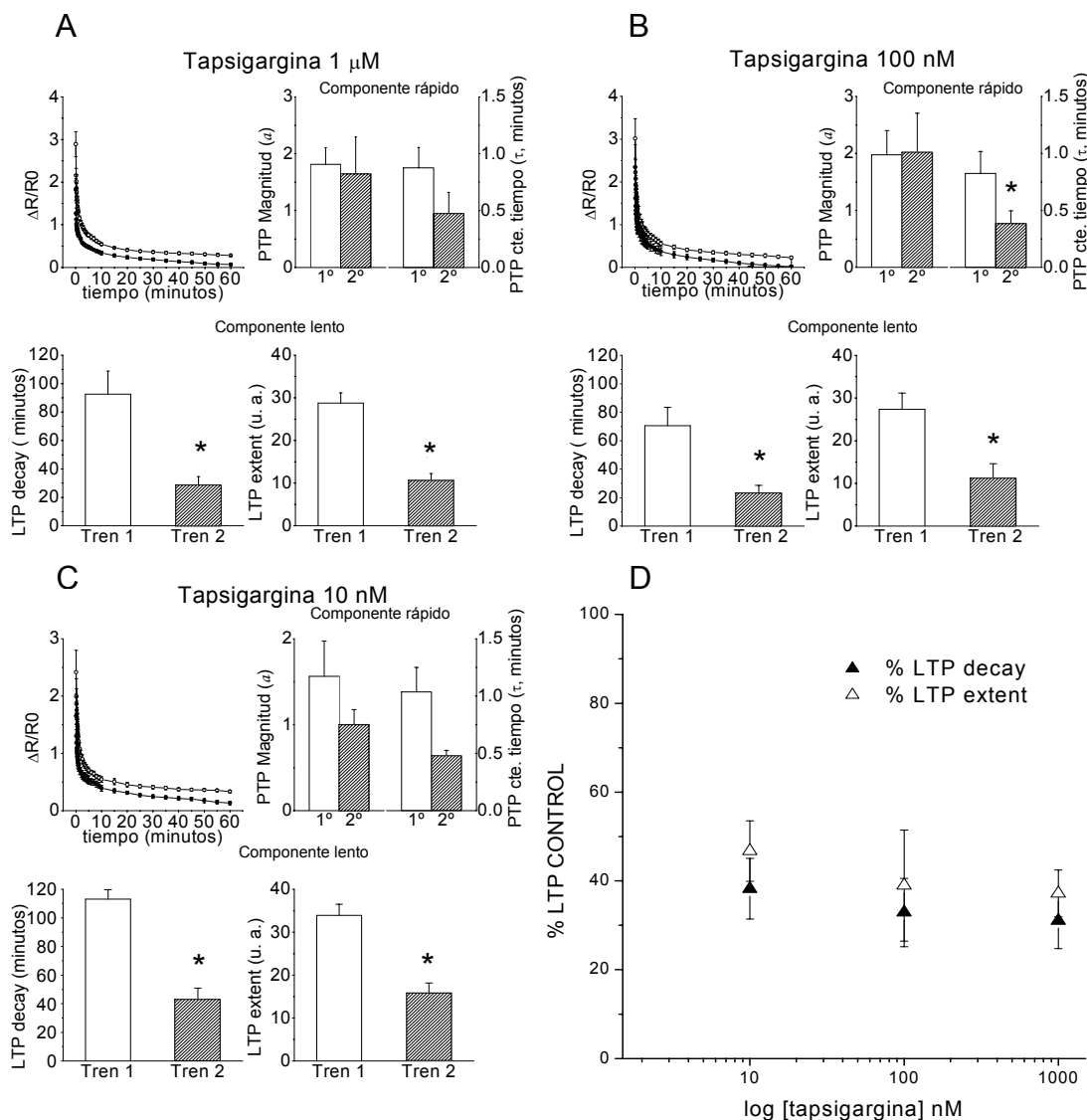


Figura 11. Efecto del bloqueo de SERCA con tapsigargina en la LTP de GCS. A, B y C muestran el curso temporal y los parámetros de los componentes rápido y lento de la LTP control (\circ) y con dantrolene (\bullet) a concentraciones de 1 μ M, 100 nM y 10 nM respectivamente. **D:** Curva dosis-respuesta de concentración tapsigargina vs porcentaje de duración (\blacktriangle) y extensión (\triangle) de LTP. Las tres dosis redujeron tanto la duración: $68.9 \pm 6.3\%$, $p=0.006$; 54.2 ± 13.2 , $p=0.02$ y $61.8 \pm 6.8\%$, $p=0.005$, respectivamente; como la extensión de la LTP: $62.8 \pm 5.3\%$, $p=0.002$; $59.0 \pm 12.5\%$, $p=0.01$ y $53.2 \pm 6.8\%$, $p=0.009$, respectivamente (u. a. unidades arbitrarias).

Tabla 2. Efectos de los fármacos evaluados en los componentes rápido y lento de la LTP.

Experimental type	n	PTP(a)	P value	PTP(τ_1)	P value	LTP decay	P value	LTP extent	P value
1st train 2nd train	8	2.28±0.23 1.52±0.17	0.01*	0.76±0.09 0.61±0.1	0.25	74.59±5.8 71.69±8.7	0.77	31.99±3.17 29.38±2.85	0.14
1st train Caff 10mM	4	2.88±1.32 5.36±1.81	0.22	0.59±0.17 0.16±0.11	0.05	80.21±8.06 18.04±2.88	0.005*	31.39±4.33 6.97±1.31	0.02*
1st train Caff 1mM	5	2.41±0.64 1.52±0.44	0.11	0.57±0.16 0.33±0.10	0.22	66.61±12.3 17.09±3.63	0.02*	26.61±4.27 7.08±1.78	0.02*
1st train caff 0.5mM	5	2.15±0.69 1.88±0.57	0.35	0.74±0.12 0.29±0.07	0.04*	94.09±13.07 29.95±6.02	0.004*	33.75±2.91 12.72±2.32	0.01*
1st train Dant 100 μ M	5	1.46±0.09 1.69±0.13	0.26	0.94±0.21 0.27±0.07	0.05	75.23±10.75 13.68±2.12	0.007*	23.96±1.52 7.36±1.15	0.01*
1st train Dant 25 μ M	3	3.14±1.14 1.39±0.30	0.17	0.43±0.09 0.64±0.16	0.42	88.54±2.63 30.84±5.90	0.02*	30.61±7.94 15.61±3.51	0.01*
1st train Dant 10 μ M	5	1.03±0.28 0.92±0.33	0.48	0.92±0.30 0.60±0.12	0.27	59.07±4.02 24.39±2.28	0.001*	23.92±2.53 11.50±1.37	0.001*
1st train XesC 100 nM	4	1.44±0.74 1.20±0.25	0.68	0.46±0.18 0.24±0.028	0.14	93.39±17.61 18.28±4.37	0.003*	29.34±3.74 7.24±2.19	0.002*
1st train XesC 10 nM	4	2.9±0.99 2.3±1.25	0.4	0.5±0.15 0.4±0.08	0.47	87.7±24.14 22.3±6.31	0.03*	27.84±5.37 9.60±2.63	0.03*
1st train Taps 1 μ M	6	1.81±0.29 1.65±0.65	0.73	0.88±0.18 0.47±0.18	0.16	92.56±16.23 28.75±5.86	0.006*	28.77±2.38 10.70±1.52	0.002*
1st train Taps100 nM	6	1.98±0.43 2.02±0.69	0.89	0.83±0.19 0.38±0.11	0.02*	70.61±12.81 23.22±5.44	0.02*	27.37±3.81 11.21±3.42	0.01*
1st train Taps 10 nM	5	1.56±0.41 1.00±0.17	0.21	1.04±0.21 0.48±0.05	0.06	113.03±6.52 43.21±7.72	0.005*	33.9±2.59 15.84±2.31	0.009*

D. Grado de contribución del calcio intracelular pre y postsináptico en la LTP del GCS.

Para determinar el grado de contribución pre y postsináptica de la liberación de calcio intracelular dependiente de IP3R, usamos la heparina por su propiedad de bloquear estos receptores y de no atravesar membranas celulares. Las

concentraciones de heparina sódica empleada fueron 100 y 200 $\mu\text{g/ml}$. La heparina fue aplicada en el nervio preganglionar, el nervio posganglionar o en ambos.

- **El bloqueo simultáneo de los receptores de IP3 pre y postsinápticos por heparina reduce la LTP.**

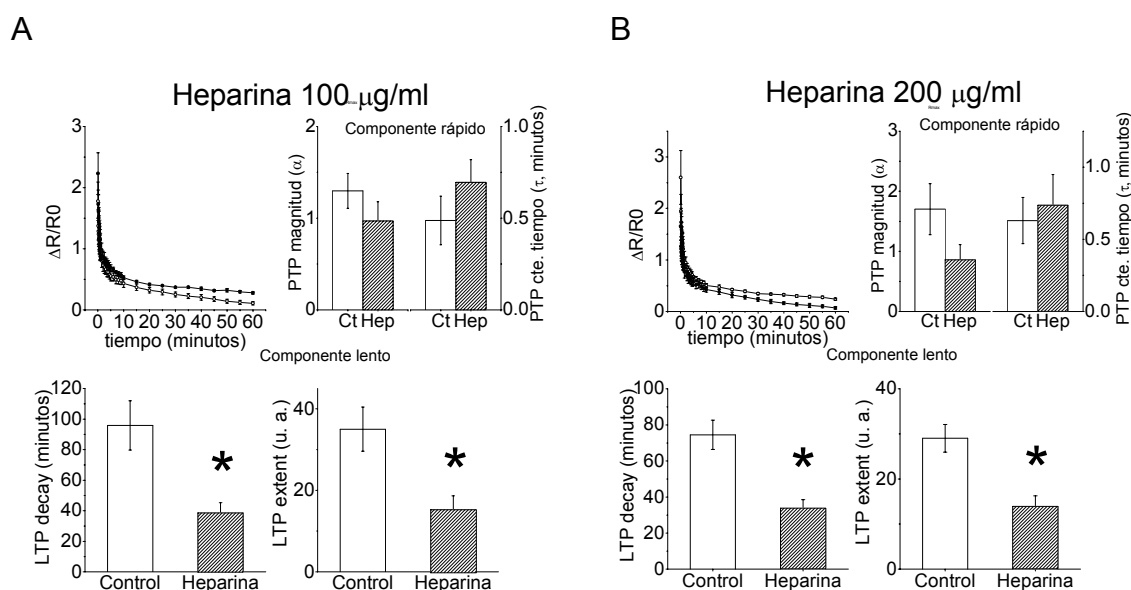


Figura 12. Efecto de bloqueo de IP3R pre y postganglionar con heparina en la LTP de GCS. En cada una se muestra el curso temporal y los parámetros de los componentes rápido y lento de la LTP control (\circ) y con heparina (\bullet) a concentraciones de 100 $\mu\text{g/ml}$ (A) y 200 $\mu\text{g/ml}$ (B) respectivamente. Las dos dosis redujeron tanto la duración: 68.9 \pm 6.3%, $p=0.006$; 54.2 \pm 13.2, $p=0.02$ y 61.8 \pm 6.8%, $p=0.005$, respectivamente; como la extensión de la LTP: 62.8 \pm 5.3% %, $p=0.002$; 59.0 \pm 12.5%, $p=0.01$ y 53.2 \pm 6.8%, $p=0.009$, respectivamente (u. a. unidades arbitrarias).

No se observaron diferencias significativas en los parámetros del componente rápido con las dos concentraciones evaluadas, mientras que el componente lento si se afectó. Con 100 $\mu\text{g/ml}$ de heparina se observó una reducción significativa en la duración de la LTP: 61 \pm 7% ($p=0.02$) y en la extensión de la LTP: 56 \pm 10% ($p=0.02$). También se observaron cambios significativos con

heparina 200 $\mu\text{g/ml}$: La duración de la LTP se redujo $55\pm 7\%$ ($p=0.003$); la extensión de la LTP se redujo $52\pm 8\%$ ($p=0.005$) (figura 12A – B; tabla 3).

Tabla 3. Efecto de la heparina en los componentes rápido y lento de la LTP.

Experimental type	n	PTP(a)	P value	PTP(τ 1)	P value	LTP decay	P value	LTP extent	P value
Control	4	1.30 \pm 0.19	0.29	0.49 \pm 0.13	0.30	95.83 \pm 16.11	0.02*	35.03 \pm 5.42	0.02*
Hep pre-post100	4	0.97 \pm 0.21		0.70 \pm 0.12		38.51 \pm 6.71		15.29 \pm 3.38	
Control	5	1.70 \pm 0.42	0.13	0.63 \pm 0.16	0.71	74.48 \pm 8.09	0.003*	29.03 \pm 3.07	0.005*
Hep pre-post200	5	0.86 \pm 0.25		0.73 \pm 0.21		33.69 \pm 4.86		13.87 \pm 2.39	
Control	5	1.38 \pm 0.16	0.31	0.63 \pm 0.11	0.28	88.43 \pm 15.14	0.02*	29.74 \pm 6.02	0.03*
Hep pre100	5	1.06 \pm 0.24		0.41 \pm 0.16		38.92 \pm 6.73		12.62 \pm 1.84	
Control	5	1.65 \pm 0.09	0.49	0.59 \pm 0.08	0.20	92.68 \pm 10.62	0.001*	29.85 \pm 4.22	0.003*
Hep pre200	5	1.52 \pm 0.15		0.40 \pm 0.10		28.20 \pm 4.34		11.49 \pm 1.49	
Control	5	1.23 \pm 0.41	0.55	0.56 \pm 0.11	0.78	81.46 \pm 8.27	0.001*	28.56 \pm 3.62	0.005*
Hep post100	5	0.94 \pm 0.20		0.50 \pm 0.16		32.74 \pm 5.75		12.21 \pm 2.22	
Control	3	1.43 \pm 0.23	0.11	0.63 \pm 0.06	0.97	104.57 \pm 3.09	0.0003*	41.64 \pm 2.81	0.001*
Hep post200	3	0.91 \pm 0.12		0.62 \pm 0.15		26.66 \pm 5.72		11.17 \pm 2.58	
Control	5	1.62 \pm 0.31	0.10	0.62 \pm 0.17	0.22	103.18 \pm 9.96	0.34	37.49 \pm 3.28	0.21
Hep ext200	5	1.25 \pm 0.21		0.50 \pm 0.11		92.55 \pm 15.47		30.35 \pm 6.49	

- **El bloqueo presináptico de los receptores de IP3 por heparina disminuye la LTP.**

Cuando se aplicó heparina en el nervio preganglionar no se observaron cambios en los parámetros del componente rápido de la LTP. El bloqueo de IP3R preganglionar con heparina redujo los parámetros del componente lento de la LTP. Con heparina 100 $\mu\text{g/ml}$ se observó una reducción significativa en la duración de la LTP: $56\pm 8\%$ ($p=0.02$) y en la extensión de la LTP: $58\pm 8\%$ ($p=0.03$). También se observaron cambios significativos con heparina 200 $\mu\text{g/ml}$: La duración de la LTP se redujo $70\pm 5\%$ ($p=0.001$); la extensión de la LTP

se redujo $62\pm 5\%$ ($p=0.003$) (figura 13 A – B; tabla 3).

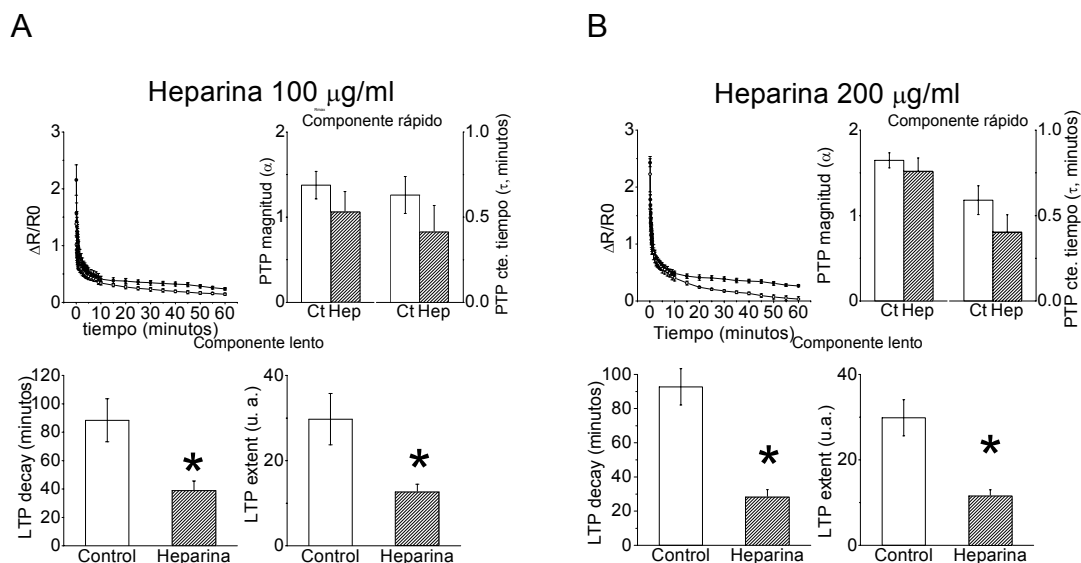


Figura 13. Efecto de bloqueo de IP3R preganglionar con heparina en la LTP de GCS. En cada una se muestra el curso temporal y los parámetros de los componentes rápido y lento de la LTP control (○) y con heparina (●) a concentraciones de 100µg/ml (A) y 200µg/ml (B) respectivamente. Las dos dosis redujeron tanto la duración: $68.9\pm 6.3\%$, $p=0.006$; 54.2 ± 13.2 , $p=0.02$ y $61.8\pm 6.8\%$, $p=0.005$, respectivamente; como la extensión de la LTP: $62.8\pm 5.3\%$, $p=0.002$; $59.0\pm 12.5\%$, $p=0.01$ y $53.2\pm 6.8\%$, $p=0.009$, respectivamente (u. a. unidades arbitrarias).

- **El bloqueo postsináptico de los receptores de IP3 por heparina inhibe la LTP.**

Con las dosis de heparina evaluados no se observaron cambios significativos en los parámetros del componente rápido de la LTP ganglionar. El bloqueo de IP3R postganglionar con heparina redujo los parámetros del componente lento de la LTP. Con heparina 100 µg/ml se observó una reducción significativa en la duración de la LTP: $60\pm 7\%$ ($p=0.001$) y en la extensión de la LTP: $57\pm 8\%$ ($p=0.005$). También se observaron cambios significativos con heparina 200 µg/ml: La duración de la LTP se redujo $75\pm 5\%$ ($p=0.0003$); la extensión de la LTP se redujo $73\pm 6\%$ ($p=0.001$) (figura 14 A – B; tabla 3).

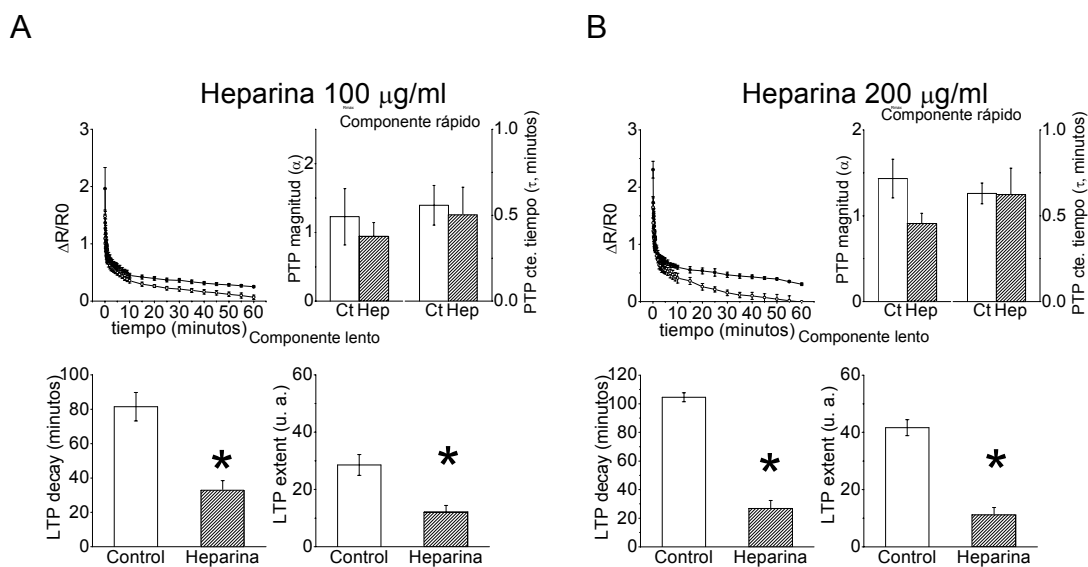


Figura 14. Efecto de bloqueo de IP3R postganglionar con heparina en la LTP de GCS. En cada una se muestra el curso temporal y los parámetros de los componentes rápido y lento de la LTP control (○) y con heparina (●) a concentraciones de 100µg/ml (A) y 200µg/ml (B) respectivamente. Las dos dosis redujeron tanto la duración: 68.9±6.3%, $p=0.006$; 54.2±13.2, $p=0.02$ y 61.8±6.8%, $p=0.005$, respectivamente; como la extensión de la LTP: 62.8±5.3% %, $p=0.002$; 59.0±12.5%, $p=0.01$ y 53.2±6.8%, $p=0.009$, respectivamente (u. a. unidades arbitrarias).

8. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los resultados muestran que la transmisión basal y la LTP tienen requerimientos mínimos (umbrales) de calcio extracelular distintos; mientras que la transmisión basal se sostiene en un 75% con la cuarta parte de la concentración fisiológica extracelular de calcio, la LTP requiere al menos de 1 mM (50% del control) para expresarse. La dosis efectiva media fue de 0.16 mM para la transmisión basal y de 0.57 mM para la LTP. De manera interesante encontramos diferente saturación de la TB y la LTP frente a elevaciones de calcio por arriba de la concentración normal; mientras que 5 mM no tuvo un efecto significativo sobre la transmisión basal con respecto a la TB control (la señal se saturó), si se presentó un aumento significativo de la LTP con respecto a la LTP control (la respuesta no se satura).

Por otra parte encontramos que el calcio liberado de los reservorios intracelulares es esencial para la LTP, mientras que prácticamente no participa en la transmisión basal.

Finalmente, nuestros resultados muestran que la liberación de calcio intracelular inducida por calcio (CICR) medida a través del bloqueo de los receptores de IP3 con heparina, participa tanto pre, como postsinápticamente en la LTP, lo que apoya la propuesta de que este fenómeno de plasticidad de la transmisión sináptica ganglionar es un proceso transináptico.

A. Calcio y transmisión basal ganglionar.

En la sinapsis ganglionar al igual que en otras sinapsis la entrada de calcio, vía canales de calcio activados por voltaje, induce la liberación del neurotransmisor

clásico acetilcolina, almacenado en vesículas claras adosadas a la zona activa (Heidelberg et al., 1994). Una disminución del calcio extracelular reduce el gradiente de calcio entre el medio extracelular e intracelular y con ello la entrada de calcio. Esta condición conduce a una disminución en la liberación de neurotransmisor (Alkadhi y Hogan, 1989), situación que también ocurre al bloquear canales de calcio dependiente de voltaje (Cifuentes et al., 2004). En nuestro trabajo se observó transmisión sináptica con 0.1 mM de calcio, mientras que a esa misma concentración no hay LTP ganglionar y se obtuvo 80% de TB con el 25% del calcio extracelular normal. La concentración de calcio teórica para alcanzar el 50% de la TB es de 0.16 mM. El bajo umbral de calcio requerido para la transmisión basal implica que en condiciones normales (calcio extracelular = 2 mM) esta ocurre con niveles de calcio extracelular muy por arriba de los requerimientos mínimos de calcio extracelular. Por otro lado se observó que la transmisión basal ganglionar es un fenómeno saturable ya que incrementos de calcio extracelular por arriba de la concentración normal no aumentan el PAC, lo cual coincide con lo reportado en la literatura (Muller et al., 1987). Para explicar el fenómeno de saturación en la TB se plantea la posibilidad de que la presencia de proteínas citoplasmáticas amortiguan el exceso de calcio libre y con ello la posible sobreactivación de procesos dependientes de calcio (Nohmi et al., 1992). Otra posible explicación es que la activación de canales de potasio dependientes de calcio disminuirían la excitabilidad neuronal, esto puede disminuir la liberación de acetilcolina en la terminal presináptica o disminuir la respuesta al neurotransmisor en la terminal postsináptica (Kuba et al., 1983; Akita y Kuba, 2000). Dado que la transmisión

basal depende principalmente de la entrada de calcio extracelular (Peng, 1996; Cong et al., 2004), la CICR y la liberación de calcio mitocondrial solamente contribuirían, en este fenómeno, a modular y a determinar la morfología del potencial de acción (Locknar et al., 2004).

B. Calcio y LTP ganglionar.

La LTP fue planteada en los trabajos iniciales de Briggs y McAfee (1988) como un fenómeno dependiente de calcio. Allí se demostró que la ausencia de calcio extracelular impide la expresión de la LTP. Más recientemente se ha mostrado que el bloqueo de canales de calcio dependientes de voltaje afectan tanto la duración como la extensión de la LTP (Cifuentes et al., 2004). Se ha propuesto que el mantenimiento de la LTP depende no solo del neurotransmisor principal, sino además de cotransmisores, como los neuropéptidos, almacenados en vesículas grandes de núcleo denso (LDCV), los cuales al ser liberados por estimulación de alta frecuencia inducirían cambios en la respuesta de la neurona postsináptica (activación de segundos mensajeros, síntesis de proteínas, expresión de genes) . Para la liberación del cotransmisor, los depósitos de calcio intracelular serían fundamentales al garantizar niveles de calcio citoplasmáticos suficientes (200 - 400 nM) para mantener los procesos de movilización, adhesión y fusión de LDCV (Bachoo et al., 1992b; Peng, 1996; Cifuentes et al., 2004). Esto implica que la LTP depende predominantemente de los fenómenos de CICR, que a su vez depende de un gradiente de calcio extra-intracelular adecuado que garantice mantener los depósitos de calcio (Lipscombe et al., 1988; Tang y Zucker, 1997; Peng, 1996; Cong et al., 2004). La entrada masiva de calcio durante un tren condicionante satura los sistemas

de eliminación y/o recaptura, lo que provoca que el calcio citoplasmático se mantenga por arriba de su nivel basal (teoría del calcio residual), lo que dispara los mecanismos CICR y con ello aumenta la probabilidad de liberación del inductor de la LTP. La relación CICR y liberación de cotransmisor fue demostrada en anfibios por Peng (1996), en este trabajo se mostró la importancia de los depósitos de calcio dependientes de RyR, la frecuencia de estimulación (> 20 Hz) y el umbral mínimo de calcio intracelular necesario para la liberación del péptido LHRH (hormona liberadora de hormona luteinizante).

En la liberación del calcio de los depósitos intracelulares van a participar los receptores de RYR e IP3R. La actividad de estos está determinada por la concentración de calcio citoplasmático ya que determinados niveles de calcio aumentan la probabilidad de apertura (Bezprozvanny et al., 1991, Finch et al., 1991). Esto implica que la disminución de la concentración de calcio extracelular y la disminución de su gradiente, que afectaría la entrada de calcio, disminuiría la concentración de calcio en los microdominios y con ello reduciría la probabilidad de liberación de calcio de los depósitos intracelulares a través de mecanismos CICR (Sobie et al., 2006).

Los experimentos realizados con fármacos permeables que actúan sobre RYR, IP3R y SERCA muestran que tanto la activación de RYR, como el bloqueo de RYR, IP3R y SERCA afectan en forma negativa y dosis dependiente el mantenimiento de la LTP. Esto concuerda con el efecto de estos fármacos a nivel celular: vaciamiento de los depósitos de calcio con cafeína y tapsigargina, o bloqueo de la liberación de calcio hacia el citoplasma con dantrolene y Xestospongina C. Para lograr tales efectos se seleccionaron concentraciones

de fármacos que garantizarán su acción sobre el receptor, evitando los posibles efectos en otras moléculas blanco que algunos de estos fármacos presentan.

Cafeína, por ejemplo, tiene efectos adicionales como inhibición de la fosfodiesterasa (PDE) y antagonismo de receptores de adenosina. Estos efectos se descartan en el presente trabajo, ya que se ha demostrado que la inhibición de PDE provoca un aumento en los niveles de AMPc lo cual incrementa la transmisión sináptica. Esto se ha confirmado con la aplicación de análogos de AMPc o inhibidores de PDE (Hogan et al., 1998b). De igual forma la activación de receptores de adenosina inhibe la transmisión sináptica y deprime la LTP y el bloqueo de estos receptores con antagonistas, como las metilxantinas, facilita la LTP (Briggs y McAfee, 1988; Hogan et al., 1998a). El efecto observado con cafeína es totalmente opuesto al esperado si se actuará sobre PDE o sobre receptores de adenosina. En el caso de Xestospongina C se ha cuestionado su selectividad por IP3R y se argumenta que también actúa sobre SERCA sin embargo este efecto se logra con dosis en el rango de μM (De Smet et al., 1999; Castonguay y Robitaille, 2002). De tapsigargina se ha descrito que bloquea canales de calcio tipo L y N en neuronas del ganglio de la raíz dorsal y disminuye corrientes en canales de calcio tipo T y L en células adrenales, sin embargo esto se observa a concentraciones de 0.2 – 2 μM (Laporte et al., 2004).

En el presente trabajo se observa que la LTP es más sensible a los cambios de calcio extracelular que la transmisión basal ya que mientras con el 25% de calcio extracelular normal se obtuvo el 80% de TB, con la misma

concentración apenas se alcanzó un 32% de la LTP inducida con calcio normal. La concentración de calcio teórica para alcanzar el 50% de la LTP es de 0.75 mM de calcio extracelular. Esto concuerda con trabajos previos que muestran que la facilitación es un fenómeno que requiere elevación de calcio citoplasmático, de mayor magnitud que la necesaria para inducir la transmisión basal, y la presencia de calcio residual (Peng, 1996; Lin et al., 1998; Burnashev y Rozo, 2005). Los experimentos realizados modificando el calcio extracelular permiten inferir que concentraciones de calcio por debajo de la concentración normal, probablemente reducen los depósitos de calcio intracelular, con lo que se reduce la probabilidad de activar los mecanismos CICR. De la misma manera, la elevación del calcio extracelular genera un mayor flujo de calcio durante el tren condicionante lo que incrementa el calcio residual, al cual se suma el calcio liberado de los depósitos y con ello aumenta la probabilidad de liberar el inductor.

C. Participación pre y postganglionar de calcio intracelular en LTP.

Trabajos recientes muestran la participación de los depósitos intracelulares de calcio en mecanismos presinápticos y postsinápticos (Lipscombe et al., 1988; McPherson et al., 1991; Nohmi et al., 1992; Cong et al., 2004; Patterson et al., 2004; Verkhratsky, 2004). Algunos han explorado la contribución diferencial de los depósitos intracelulares de calcio pre y postsinápticos en la función neuronal del SNC (Ross et al., 2005; Kelly et al., 2005; Furutani et al., 2006); o del SNA (Cong et al., 2004). A nivel presináptico se ha mostrado como la actividad de los receptores metabotrópicos (autoreceptores para bradikinina, glutamato, acetilcolina) pueden modular positiva (Nash et al., 2004) o negativamente

(Edelbauer et al., 2005) la liberación del neurotransmisor. Por el contrario, la presencia de receptores ionotrópicos a este nivel, por lo general permeables a calcio (receptores P2X, nicotínicos) pueden activar mecanismos CICR y facilitar la liberación del neurotransmisor (Brain et al., 2001; Rodrigues et al., 2006). A nivel postsináptico se ha mostrado como la liberación de calcio de los depósitos intracelulares se desencadena por la activación de IP3R, en este mecanismo se han implicado receptores glutamatérgicos (Furutani et al., 2006), purinérgicos y gabaérgico (Saitow et al., 2005). Adicionalmente, se han reportado trabajos que muestran el mantenimiento de la estructura sináptica entre fibras paralelas y células de Purkinje en cerebelo dado por la acción conjunta de glutamato y factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF; Furutani et al., 2006) o el efecto de receptores purinérgicos tipo P2Y pre y postsinápticos que modulan la transmisión GABAérgica entre interneuronas y células de Purkinje en cerebelo (Saitow et al., 2005).

En nuestros experimentos para determinar el grado de contribución pre y postsináptico del CICR mediado por IP3, empleamos heparina con el fin de garantizar el bloqueo de IP3R en forma compartamental. Lo observado permite afirmar que los depósitos de calcio intracelular IP3-dependientes presináptico y postsináptico participan en forma equivalente en la LTP ganglionar y que su efecto no es aditivo.

D. Conclusiones generales.

En conclusión y basados en los resultados experimentales globales obtenidos y lo reportado en la literatura, podemos concluir que los depósitos de calcio intracelular contribuyen a la generación de la LTP en ganglio cervical superior

de rata, a través de mecanismos CICR (figura 15). El efecto de este calcio intracelular podría discriminarse a dos niveles: pre y post sináptico. A nivel presináptico puede estar determinando además de la movilización de vesículas claras de la zona de reserva a la zona activa, el incremento en la probabilidad de liberación de neuropéptidos contenidos en LDCV. A nivel postsináptico la liberación de calcio de los depósitos intracelulares puede estar regulando la respuesta nicotínica, bien a través de procesos de vesiculación y externalización de receptores nicotínicos, o bien por mecanismos de sensibilización a través de la fosforilación de receptores, mecanismos que son regulados por procesos dependientes de calcio. Los niveles adecuados en la reserva de calcio de los depósitos intracelulares están determinados a su vez por la concentración de calcio extracelular, ya que la liberación de calcio vía CICR se acopla a una corriente de entrada de calcio (CRAC). La modificación en la concentración del calcio extracelular puede alterar la corriente de entrada y con ello el nivel de los depósitos: reducción o vaciamiento al disminuir el calcio extracelular o saturación al incrementarse el calcio extracelular por encima de los valores normales. Todo esto lleva a plantear que la LTP debe ser considerada como un fenómeno transináptico en donde la participación de la terminal presináptica es tan importante como la participación postsináptica.

En perspectiva, la LTP debe ser considerada como un fenómeno susceptible de expresarse a todos los niveles del sistema nervioso; su común denominador es un incremento en la eficacia sináptica, con lo que el sistema nervioso garantiza mantener una respuesta adecuada en el tiempo. Aunque los mecanismos desencadenantes no son los mismos en todas las regiones, el

calcio, tanto intracelular como extracelular, si constituye el lenguaje común que garantiza la expresión y el mantenimiento de este fenómeno plástico.

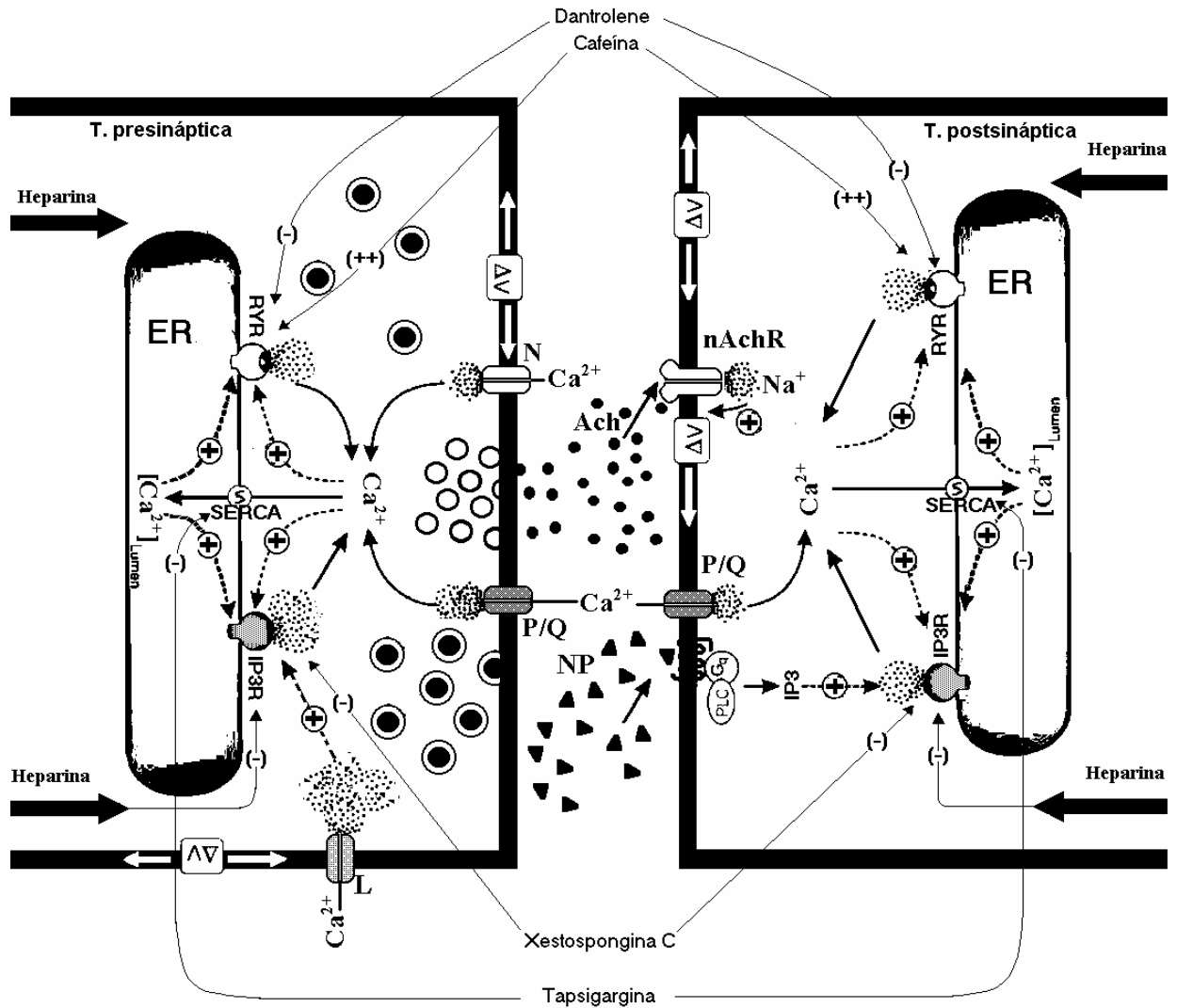


Figura 15. Contribución del calcio extra e intracelular en la LTP ganglionar. A nivel presináptico la entrada de calcio vía canales de calcio tipo N y P/Q favorece la liberación de acetilcolina (ACh) contenida en vesículas claras en la zona activa. La entrada de calcio a través de canales L, sumado al que entra por los tipo N y P/Q, aumenta el calcio intracelular que sensibiliza RyR e IP3R, los cuales contribuyen a mantener los niveles de calcio citoplasmáticos elevados e incrementar la probabilidad de liberación de neuropéptidos (NP) contenidos en LDCV. A nivel postsináptico la despolarización de la membrana por activación de receptores nicotínicos (nAChR) aumenta la probabilidad de apertura de canales de calcio dependientes de voltaje e incrementa los niveles de calcio citoplasmático lo que sensibiliza RyR e IP3R y favorece la liberación de calcio de los depósitos intracelulares a lo que se suma la acción del cotransmisor que al activar la vía del IP3 incrementa la liberación de calcio vía IP3R. Con esto se mantienen concentraciones de calcio elevado que puede estar regulando la respuesta nicotínica (expresada en la LTP), bien a través de procesos de vesiculación y externalización de

receptores nicotínicos, o bien por mecanismos de sensibilización a través de la fosforilación de receptores. La interferencia de la liberación de calcio intracelular con fármacos libremente permeables: dantrolene, Xestospongina C, la activación de RYR con cafeína, o el vaciamiento de las pozas intracelulares: cafeína y tapsigargina, alteran la expresión de la LTP. Para evaluar el efecto de los depósitos de calcio dependientes de IP3R empleamos heparina aplicada bien en la terminal pre, postsináptica o en ambas. El efecto en todos los casos fue reducción en la duración de la LTP. Este esquema fue realizado con elementos de la figura No. 1 del trabajo de Berridge (2006).

9. BIBLIOGRAFÍA

Adley, D. The physiology of excitable cells. Third ed. Cambridge University Press, Philadelphia, 1989. pp 159-217.

Akita T, Kuba K. 2000. Functional triads consisting of ryanodine receptors, Ca²⁺ channels, and Ca²⁺ activated K⁺ channels in bullfrog sympathetic neurons. Plastic modulation of action potential. *J Gen Physiol* 116:697–720.

Alkadhi KA, Alzoubi KH, Aleisa AM. 2005. Plasticity of synaptic transmission in autonomic ganglia. *Progress in neurobiology*. 75: 83 - 108.

Alkadhi KA, Hogan YH. 1989. Effect of calcium on synaptic facilitation by potassium channel blockers in superior cervical ganglion of rat. *Neuropharmacology* 28:75–81.

Alkadhi K, Ootom S, Tanner F, Sockwell D, Hogan Y. 2001. Inhibition of Ganglionic Long-Term Potentiation decreases blood pressure in spontaneously Hypertensive Rats. *Exp Biol Med*. 226(11):1024–1030.

Alzoubi K, Bedawi A, Aleisa A, Alkadhi K. 2004. Hypothyroidism Impairs Long-Term Potentiation in sympathetic ganglia: electrophysiologic and molecular studies. *J Neurosc Reserch*. 78:393–402.

Bachoo M, Polosa C. 1991. Long-term potentiation of nicotinic transmission by a heterosynaptic mechanism in the stellate ganglion of the cat. *J Neurophysiol*. 65(3):639-647.

Bachoo M, Heppner T, Fiekers J, Polosa, C. 1992a. A role for protein kinase C in long term potentiation of nicotinic transmission in the superior cervical ganglion. *Brain Research*, 585: 299 - 302.

Bachoo M, Morales M. A, Polosa C. 1992b. Use-dependent fade and slow recovery of long-term potentiation in superior cervical ganglion of the cat. *J Neurophysiol*. 67: 470 - 476.

Banks P. 1970. The Effect of Preganglionic Stimulation on the Incorporation of L-[U- ¹⁴C]Valine into the Protein of the Superior Cervical Ganglion of the Guinea Pig. *Biochem. J*. 118:813-818.

Becherer U, Rettig J. 2006. Vesicle pools, docking, priming, and release. *Cell Tissue Res*. 326(2):393-407.

Bennett MR. 1994. Nitric oxide release and long term potentiation at synapses in autonomic ganglia. *Gen Pharmacol*. 25(8):1541-51.

Bennett MR. 2000. The concept of long term potentiation of transmission at synapses. *Prog Neurobiol*. 60(2):109-37.

Berridge, M. 1993. Inositol triphosphate and calcium signalling. *Nature*. 361:315-

325.

Berridge, M. 1997. Elementary and global aspects of calcium signalling. *J. Physiology*. 499: 291-306.

Berridge, M. Neuronal calcium signalling. 1998. *Neuron*. 21: 13-26.

Berridge, M., Bootman, M. and Lipp, P. 1998. Calcium a life and death signal. *Nature*. 395: 645-648.

Berridge, M. 2006. Calcium microdomains: organization and function. *Cell calcium*. 40: 405-412.

Bezprozvanny I., Watras, J. and Ehrlich, B. 1991. Bell-shaped calcium-response curves of Ins(1,4,5)P₃- and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum. *Nature*. 351:751-754.

Bliss, TV and Lomo T. 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following Stimulation of the perforant path. *J. Physiol*. 232:331-356.

Brain K, Trout S, Jackson V, Dass N, Cunnane T. 2001. Nicotine induces calcium spikes in single nerve terminal varicosities: a role for intracellular calcium stores. *Neuroscience*. 106(2): 395-403.

Briggs, C. A., Brown, T. H. and McAfee D. A. 1985a. Neurophysiology and pharmacology of Long-Term potentiation in the rat sympathetic ganglion. *J. Physiol*. 359: 503-521.

Briggs, C. A., McAfee D. A. and McCaman R. 1985b. Long-term potentiation of synaptic acetylcholine release in the superior cervical ganglion of the rat. *J. Physiol*. 363: 181-190.

Briggs C. A., McAfee D. A. 1988. Long-term potentiation at nicotinic synapses in the rat superior cervical ganglion. *J. Physiol*. 404:129-44.

Brown, T. H., McAfee, D. A. 1982. Long-Term Potentiation in the superior cervical ganglion. *Science*. 215: 1411-1413.

Bultynck G, Sienaert I, Parys JB, Callewaert G, De Smedt H, Boens N, Dehaen W, Missiaen L. 2003. Pharmacology of inositol trisphosphate receptors. *Eur J Physiol* 445:629-642.

Burnashev N, Rozov A. 2005. Presynaptic Ca²⁺ dynamics, Ca²⁺ buffers and synaptic efficacy. *Cell Calcium* 37:489-495.

Case CP, Matthews MR. 1986. Outgoing synapses of small granule-containing cells in the rat superior cervical ganglion after post-ganglionic axotomy. *J. Physiol*. 374:1-32.

Castonguay A, Robitaille R. 2002. Xestospongine C is a potent inhibitor of SERCA at a vertebrate synapse. *Cell Calcium* 32:39-47.

- Cifuentes, F., Licona, I., De León, L., Medina, P., De-Miguel, F. and Morales, M. 2004. Contribution of different calcium channels to Long -Term potentiation in superior cervical ganglion of the rat. *Neuroscience*. 129: 647-653.
- Collier B. 1996. Activity-related modulation of cholinergic transmission. *Prog Brain Res* 109:243–249.
- Cong YL, Takeuchi S, Tokuno H, Kuba K. 2004. Long term potentiation of transmitter exocytosis expressed by Ca²⁺-induced Ca²⁺ release from thapsigargin-sensitive Ca²⁺ stores in preganglionic nerve terminals. *Eur J Neurosci* 20:419–426.
- De Meis L, Arruda AP, Carvalho DP. 2005. Role of sarco/endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase in thermogenesis. *Biosci Rep*. 25(3-4):181-190.
- Del Signore A, Gotti C, Rizzo A, Moretti M, Paggi P. 2004. Nicotinic acetylcholine receptors subtypes in the rat sympathetic ganglion: pharmacological characterization, subcellular distribution and effect of pre- and postganglionic nerve crush. *Journal of neuropathology and experimental Neurology*. 63(2):138-150.
- De Smet P, Parys JB, Vanlingen S, Bultynck G, Callewaert G, Galione A, De Smedt H, Missiaen L. 1999. The relative order of IP₃ sensitivity of types 1 and 3 IP₃ receptors is pH dependent. *Pflugers Arch* 438:154-158.
- Dolphin AC. 1985. Long-term potentiation at peripheral synapses. *TINS*. September. 376-378.
- Dunant Y, Dolivo M. 1968. Plasticity of synaptic functions in the exised sympathetic ganglion of the rat. *Brain Res* 10:271-273.
- Edelbauer H, Lechner SG, Mayer M, Scholze T, Boehm S. 2005. Presynaptic inhibition of transmitter release from rat sympathetic neurons by bradykinin. *J Neurochem*. 93(5):1110-1121.
- Ellis K, Carpenter J. 1974. Mechanism of control of skeletal-muscle contraction by dantrolene sodium. *Arch Phys Med Rehabil* 55:362-369.
- Feng G, Steinbach J, Sanes J. 1998. Rapsyn Clusters Neuronal Acetylcholine Receptors But Is Inessential for Formation of an Interneuronal Cholinergic Synapse. *J Neurosci*. 18(11):4166-4176.
- Finch E, Turner T, Goldin S. 1991. Calcium as coagonist of Inositol 1,4,5-Triphosphate-induced calcium release. *Science*. 252:443-446.
- Furutani K, Okubo Y, Kakizawa S, Iino M. 2006. Postsynaptic inositol 1,4,5-trisphosphate signaling maintains presynaptic function of parallel fiber-Purkinje cell synapses via BDNF. *PNAS*. 30;103(22):8528-8533.
- Gafni J, Munsch JA, Lam TH, Catlin MC, Costa LG, Molinski TF, Pessah IN. 1997. Xestospongins: potent membrane permeable blockers of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Neuron* 19:723–733.

Glazner G, Ferryhough P. 2002. Neuronal survival in the balance: are endoplasmic reticulum membrane proteins the fulcrum? *Cell Calcium*. 32(5-6):421-33.

Gonzalez-Burgos GR, Biali FI, Cherksey BD, Sugimori M, Llinas RR, Uchitel OD. 1995. Different calcium channels mediate transmitter release evoked by transient or sustained depolarization at mammalian sympathetic ganglia. *Neuroscience* 64:117-123.

Guyton A, Hall J. 2005. *Textbook of Medical Physiology*, 11th Edition. W.B. Saunders. 1104 p.

Heidelberger R, Heinemann C, Neher E, Matthews G. 1994. Calcium dependence of the rate of exocytosis in a synaptic terminal. *Nature* 371:513-515.

Hormuzdi S, Filippov M, Mitropoulou G, Monyer H, Bruzzone R. 2004. Electrical synapses: a dynamic signaling system that shapes the activity of neuronal networks. *Biochimica et Biophysica Acta* 1662:113-137.

Hogan Y, Hawkins R, Alkadhi K. 1998a. Adenosine A1 receptor activation inhibits LTP in sympathetic ganglia. *Brain Res* 807:19-28.

Hogan Y, Florent G, Hussain T, Alkadhi K. 1998b. Cyclic AMP antagonizes adenosine-induced inhibition of ganglionic transmission. *Brain Res* 787:242-247.

Kelly PT, Mackinnon RL 2nd, Dietz RV, Maher BJ, Wang J. 2005. Postsynaptic IP3 receptor-mediated Ca²⁺ release modulates synaptic transmission in hippocampal neurons. *Brain Res Mol Brain Res*. 27;135(1-2):232-248.

Kennedy, M. 1989. Regulation of neuronal function by calcium. *TINS*. 12: 417 - 419.

Kobayashi S, Kitazawa T, Somlyo A, Somlyo A. 1989. Cytosolic Heparin Inhibits Muscarinic and α -Adrenergic Ca²⁺ Release in Smooth Muscle. Physiological role of inositol 1,4,5-trisphosphate in pharmacomechanical coupling. *J Biol Chem*. 264:17997-18004.

Kuba K, Morita K, Nohmi M. 1983. Origin of calcium ions involved in the generation of a slow afterhyperpolarization in bullfrog sympathetic neurons. *Pflugers Arch* 399:194-202.

Laporte R, Hui A, Laher I. 2004. Pharmacological modulation of sarcoplasmic reticulum function in smooth muscle. *Pharmacol Rev* 56:439-513.

Lee HB, Xu L, Meissner G. 1994. Reconstitution of the skeletal muscle ryanodine receptor-Ca²⁺ release channel protein complex into proteoliposomes. *J Biol Chem* 269:13305-13312.

Levitan I, Kaczmarek L. 2002. *The neuron. Cell and molecular biology*. Third edition. Oxford University press. New York, USA. 603 p.

- Libet B, Owman C. 1974. Concomitant changes in formaldehyde-induced fluorescence of dopamine interneurons and in slow inhibitory post-synaptic potentials of the rabbit superior cervical ganglion, induced by stimulation of the preganglionic nerve or by a muscarinic agent. *J Physiol.* 237(3):635-62.
- Lichtman J, Purves D, Yip J. 1979. On the purpose of selective innervation of guinea-pig superior cervical ganglion cells. *J. Physiol.* 292:69-54.
- Lin YQ, Brain KL, and Bennett MR. 1998. Calcium in sympathetic boutons of rat superior cervical ganglion during facilitation, augmentation and potentiation. *J. Auton. Nerv. Sys.* 73: 26–37.
- Llinas R, Steinberg IZ, Walton K. 1981. Presynaptic calcium currents in squid giant synapse. *Biophys J* 33:289-321.
- Lipscombe D, Madison DV, Poenie M, Reuter H, Tsien RY, Tsien RW. 1988. Spatial distribution of calcium channels and cytosolic calcium transients in growth cones and cell bodies of sympathetic neurons. *PNAS.* 85:2398–2402.
- Locknar S, Barstow K, Tomkins J, Merriam L, Parsons R. 2004. Calcium-induced calcium release regulates action potential generation in guinea-pig sympathetic neurones, *J Physiol.* 555.3:627-635.
- Lomo T. 2003. The discovery of long-term potentiation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 358(1432):617-20.
- McAfee D, Briggs CA, McCaman R, McKenna D. Synaptic Mechanism for Long-Term potentiation in sympathetic ganglion. In Dun N. J. Perlman R. L. (Eds.) *Neurobiology of acetylcholine.* 1987. pp. 211 - 214. Plenum press. N. York, London.
- MacDermott A, Role L, Siegelbaum S. 1999. Presynaptic ionotropic receptors and the control of transmitter release. *Ann rev neurosc.* 22:443-485.
- Malenka RC, Madison DV, Nicoll RA. 1986. Potentiation of synaptic transmission in the hippocampus by phorbol esters. *Nature* 321(6066):175-177.
- McLachlan E. 1974. An analysis of the release of acetylcholine from preganglionic nerve terminals. *J. Physiol.* 245:447-466.
- McPherson PS, Kim YK, Valdivia H, Knudson CM, Takekura H, Franzini-Armstrong C, Coronado R, Campbell KP. 1991. The brain ryanodine receptor: a caffeine-sensitive calcium release channel. *Neuron* 7:17-25.
- Merighi A. 2002. Costorage and coexistence of neuropeptides in the mammalian CNS. *Prog Neurobiol.* 66(3):161-190.
- Morales MA, Bachoo M, Beaudet A, Collier B, Polosa C. 1993. Ultrastructural localization of neurotensin immunoreactivity in the stellate ganglion of the cat. *J Neurocytol.* 22:1017–1021.
- Muller D, Loctin F, Dunant Y. 1987. Inhibition of evoked acetylcholine release: Two different mechanisms in the Torpedo electric organ. *Eur J Pharmacol.*

133:225–234.

Nash MS, Willets JM, Billups B, John Challiss RA, Nahorski SR. 2004. Synaptic activity augments muscarinic acetylcholine receptor-stimulated inositol 1,4,5-trisphosphate production to facilitate Ca²⁺ release in hippocampal neurons. *J Biol Chem.* 279(47):49036-49044.

Nerou EP, Riley AM, Potter BV, Taylor CW. 2001. Selective recognition of inositol phosphates by subtypes of the inositol trisphosphate receptor. *Biochem J.* 355:59-69.

Nicholls J, Martin R, Wallace B, Fuchs P. 2001. *From Neuron to Brain: A Cellular and Molecular Approach to the Function of the Nervous System*, Fourth Edition. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts. USA. 580 p.

Nohmi M, Hua SY, Kuba K. 1992. Intracellular calcium dynamics in response to action potentials in bullfrog sympathetic ganglion cells. *J Physiol.* 458:171–190.

Oheim M, Kirchhoff F, Stuhmer W. 2006. Calcium microdomains in regulated exocytosis. *Cell Calcium.* 40:423-439.

Ohta T, Ito S, Ohga A. 1990. Inhibitory action of dantrolene on Ca-induced Ca²⁺ release from sarcoplasmic reticulum in guinea pig skeletal muscle. *Eur J Pharmacol.* 178:11-19.

Parekh AB. 2003. Store-operated Ca²⁺ entry: dynamic interplay between endoplasmic reticulum, mitochondria and plasma membrane. *J Physiol.* 547(2):333-348.

Parker M, Zhao S, Brecht D, Sanes J, Feng G. 2004. PSD93 Regulates Synaptic Stability at Neuronal Cholinergic Synapses. *J Neuroscience.* 24(2):378-388.

Paxinos G, Mai J. 2004. *The Human nervous system* / edited by George Paxinos, Jürgen K. Mai 2nd ed. Amsterdam : Elsevier Academic. 1366 p.

Patterson RL, Boehning D, Snyder SH. 2004. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors as signal integrators. *Annu Rev Biochem.* 73:437-465.

Peng Y. 1996. Ryanodine-sensitive component of calcium transients evoked by nerve firing at presynaptic nerve terminals. *J Neurosci.* 16:6703–6712.

Putney J, McKay R. 1999. Capacitative calcium entry channels. *Bioessays.* 21(1):38-46.

Rodrigues RJ, Almeida T, de Mendonça A, Cunha RA. 2006. Interaction between P2X and nicotinic acetylcholine receptors in glutamate nerve terminals of the rat hippocampus. *J Mol Neurosci.* 30(1-2):173-6.

Rosenmund C, Rettig J, Brose N. 2003. Molecular mechanisms of active zone function. *Curr op neur.* 13: 509-519.

Ross WN, Nakamura T, Watanabe S, Larkum M, Lasser-Ross N. 2005. Synaptically activated Ca²⁺ release from internal stores in CNS neurons. *Cell*

Mol Neurobiol. 25(2):283-295.

Rossi D, Sorrentino V. 2002. Molecular genetics of ryanodine receptors Ca²⁺-release channels. *Cell Calcium*. 32(5-6):307-319.

Rousseau E, Smith JS, Meissner G. 1987. Ryanodine modifies conductance and gating behavior of single Ca²⁺ release channel. *Am J Physiol*. 253:C364-C368.

Saitow F, Murakoshi T, Suzuki H, Konishi S. 2005 Metabotropic P2Y purinoceptor-mediated presynaptic and postsynaptic enhancement of cerebellar GABAergic transmission. *J Neurosci*. 25(8):2108-16.

Schoch S, Gundelfinger E. 2006. Molecular organization of the presynaptic active zone. *Cell Tissue Res*. 326(2):379-91.

Shmigol A, Kostyuk P, Verkhratsky A. 1995. Dual action of thapsigargin on calcium in sensory neurons: inhibition of Ca²⁺ uptake by caffeine-sensitive pools and blockade of plasmalemmal Ca²⁺ channels. *Neuroscience* 65:1109-1118.

Sobie EA, Guatimosim S, Gomez-Viquez L, Song LS, Hartmann H, Saleet Jafri M, Lederer WJ. 2006. The Ca²⁺ leak paradox and rogue ryanodine receptors: SR Ca²⁺ efflux theory and practice. *Prog Biophys Mol Biol*. 90:172-85.

Spafford JD, Zamponi GW. 2003. Functional interactions between presynaptic calcium channels and the neurotransmitter release machinery. *Current Opinion in Neurobiology*. 13:308-314.

Sudhof T. 2004. The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci*. 27:509-547.

Tang Y, Zucker RS. 1997. Mitochondrial involvement in post-tetanic potentiation of synaptic transmission. *Neuron*. 18: 483-491.

Taylor CW, Laude AJ. 2002. IP₃ receptors and their regulation by calmodulin and cytosolic Ca²⁺. *Cell Calcium*. 32(5-6):321-34.

Thayer S, Hirning L, Miller R. 1988. The Role of Caffeine-Sensitive Calcium Stores in the Regulation of the Intracellular Free Calcium Concentration in Rat Sympathetic Neurons In Vitro. *Molecular pharmacology*. 34:664-673.

Thomas A, Bird G, Hojnoczky G, Robb-Gaspers L, Putney J. 1996. Spatial and temporal aspects of cellular calcium signalling. *FASEB J*. 10: 1505-1517.

Torrealba F, Carrasco MA. 2004. A review on electron microscopy and neurotransmitter systems. *Brain Res Rev*. 47(1-3):5-17.

Van Rossum DB, Patterson RL, Ma HT, Gill DL. 2000. Ca²⁺ entry mediated by store depletion, S-nitrosylation, and TRP3 channels. Comparison of coupling and function. *J Biol Chem*. 275(37):28562-28568.

Verkhratsky A. 2005. Physiology and pathophysiology of the calcium store in the endoplasmic reticulum of neurons. *Physiological reviews*. 85:201-279.

Wanaverbecq N, Marsh SJ, Al-Qatari M, Brown DA. 2003. The plasma membrane calcium-ATPase as a major mechanism for intracellular calcium regulation in neurones from the rat superior cervical ganglion. *J Physiol.* 550:83-101.

Weldon P, Bachoo M, Morales MA, Collier B, Polosa C. 1993. Dynamics of large dense-cored vesicles in synaptic boutons of the cat superior cervical ganglion. *Neuroscience.* 55:1045-54.

Wu R, McKenna DG, McAfee DA. 1991. Age - related changes in the synaptic plasticity of rat superior cervical ganglia. *Brain Research.* 542:324-329.

Ziff E. 1997. Enlightening the postsynaptic density. *Neuron.* 19(6):1163-1174.

10. APENDICE I

A. Generalidades de sistema nervioso autónomo.

El sistema nervioso autónomo (SNA; también conocido como sistema nervioso vegetativo), es fundamental para garantizar la supervivencia del individuo. Su papel es el de regular funciones vitales como la digestión, la circulación sanguínea, la respiración y el metabolismo. Sus acciones incluyen: el control de la fuerza de contracción y la frecuencia cardíaca, la contracción y dilatación de vasos sanguíneos, la contracción y relajación del músculo liso en varios órganos, acomodación visual, tamaño pupilar y secreción de glándulas exocrinas y endocrinas. Tiene dos vías un componente de entrada o aferente sensitiva y un componente de salida o eferente motor. La vía aferente del SNA se encarga de transmitir la sensación visceral desde sensores periféricos (ejemplo: barorreceptores y quimiorreceptores del seno carotídeo y arco aórtico) y regula reflejos vasomotores (ritmo cardíaco, presión sanguínea) y respiratorios, entre otros. Las fibras aferentes llegan al sistema nervioso central vía nervios autonómicos principales como el nervio vago o neumogástrico, nervios espláncnicos o nervios pélvicos (Guyton y Hall, 2005). La vía eferente transmite impulsos desde centros de control del sistema nervioso central, situados en el tallo cerebral, el hipotálamo, algunas porciones de la corteza cerebral, como la corteza límbica, y la médula espinal hacia órganos periféricos. A lo largo de la vía se identifican dos neuronas en serie, una central con su soma ubicado en el tallo cerebral o médula espinal, que hace sinapsis con la otra neurona en los ganglios autonómicos periféricos, la que a su vez inerva los órganos blancos. El SNA se divide funcionalmente en tres subsistemas con

funciones complementarias y/o antagónicas:

1. Sistema parasimpático o cráneo-sacro: la primera neurona eferente se encuentra en tallo cerebral o médula espinal sacra. El neurotransmisor en la sinapsis ganglionar y en el órgano blanco es la acetilcolina. Es llamado también sistema colinérgico.

2. Sistema simpático: se constituye por una primera neurona eferente ubicada en la medula espinal toraco-lumbar que envía sus axones hacia la segunda neurona ubicada en una cadena de ganglios paravertebrales. El neurotransmisor en la sinapsis ganglionar es la acetilcolina y en el órgano blanco la noradrenalina. También es llamado sistema adrenérgico o noradrenérgico (Guyton y Hall, 2005).

3. Sistema entérico: forman un circuito independiente encargado de regular la actividad del sistema gastro-intestinal y glándulas anexas (hígado y páncreas). Consta de agrupaciones de neuronas que se interconectan para formar un plexo mientérico y uno submucoso que regulan tanto motilidad (músculo liso), como actividad secretoria glandular (Guyton y Hall, 2005).

B. Ganglio cervical superior.

El ganglio cervical superior (gcs) es un órgano par que forma parte del sistema nervioso autónomo simpático. Está ubicado en la región cervical adosado a la cara posterior de la bifurcación de la arteria carótida común; tiene forma ovoide y un peso aproximado de 3 – 3,5 gms (figura A1; Banks, 1970; Case y Matthews, 1986). Actúa básicamente como una estación de relevo a donde llegan señales eléctricas de control provenientes de la médula espinal, vía nervio preganglionar (tronco simpático cervical) y de allí se transmite hacia

órganos efectores a través de dos nervios principales los nervios carotideo interno y externo.

Estudios realizados en las últimas décadas en ganglios simpáticos de diferentes especies, han mostrado que el ganglio es una estructura altamente dinámica y compleja capaz de modular la transmisión sináptica autonómica. En esta modulación participan diferentes factores que incluyen hormonales, inmunológicos, nutricionales e incluso la edad del individuo (Wu et al., 1991; Alkadhi et al., 2005).

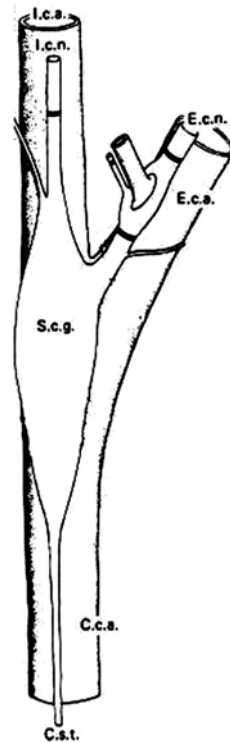


Figura A1. Ganglio cervical superior (S.c.g.). Se encuentra adosado a la bifurcación de la arteria carótida común (C.c.a.). Presenta un nervio preganglionar (C.s.t.) y dos nervios postganglionares (E.c.n.; I.c.n.) adosados a las arterias carótida externa (E.c.a.) y carótida interna (I.c.n.). Tomado de Case y Matthews. *J physiol.* 1986.

- **Estructura.**

El gcs está constituido por axones de neuronas preganglionares, neuronas ganglionares, interneuronas y glia (Paxinos y Mai, 2004). Los axones preganglionares pertenecen a neuronas cuyo soma está ubicado en la columna intermedio lateral (T1 –T4 principalmente; Lichtman et al., 1979) de la médula espinal.

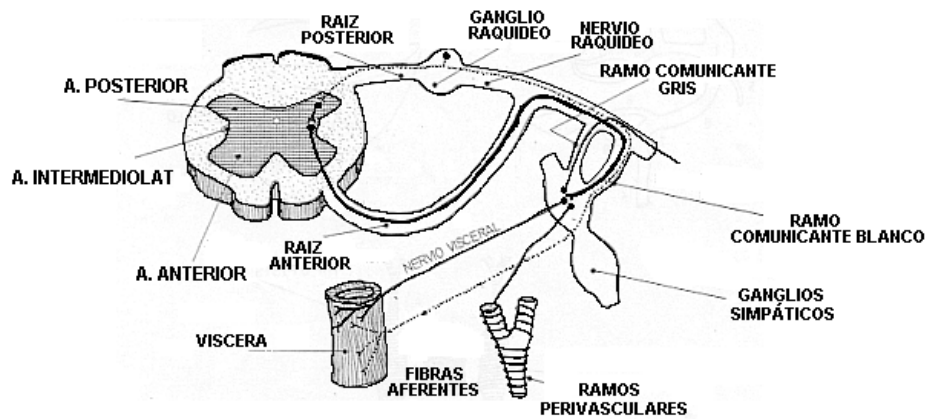


Figura A2. Relaciones estructurales del ganglio simpático cervical de ratona. Se observa la neurona preganglionar en la médula espinal, que envía su axón por la raíz espinal anterior (motora). De allí sale a uno de los ganglios simpáticos a través del ramo comunicante blanco. En el ganglio hace sinapsis con la neurona ganglionar cuyos axones llegarán a órganos blancos bien uniéndose al nervio motor vía ramo comunicante gris, o bien formando nervios viscerales que se adosan a la pared de vasos sanguíneos. El circuito se cierra con una neurona aferente sensorial autonómica, cuyo soma puede estar en el ganglio raquídeo o cerca al órgano blanco, que hace sinapsis en medula espinal con una interneurona.

El axón de las neuronas sale hacia la zona anterolateral de la médula espinal para formar la raíz nerviosa anterior junto con axones de neuronas motoras de músculo esquelético. De este tronco nervioso se separan ramas vegetativas que forman el ramo comunicante blanco anterior, el cual ingresa al

ganglio como rama preganglionar; allí se establecen sinapsis con las dendritas o somas de neuronas ganglionares. De los somas de las neuronas postsinápticas se desprenden axones que formarán los nervios posganglionares los cuales inervan órganos blancos viscerales ubicados en parte superior del tórax, cabeza y cuello: corazón, pulmón, vasos sanguíneos de cuello y cráneo, iris y glándulas salivales (figura A2).

Las neuronas ganglionares son neuronas multipolares y su tamaño es cercano a 50 μM . Algunos estudios han reportado un número de neuronas ganglionares que oscila entre 15000 y 45000, este amplio rango probablemente depende de variabilidad entre especies (McLachlan, 1974). Además de las neuronas principales el ganglio contiene interneuronas y células gliales. Las interneuronas están representadas por las células SIF (small intensely fluorescent cell), su tamaño es cercano a 15 μM y su número es de alrededor de 1000 (Libet y Owman 1974); su citoplasma contiene un gran número de vesículas de núcleo denso que probablemente contienen dopamina, serotonina, sustancia P, histamina y opiáceos endógenos. Su función no es clara pero se postula que podría cumplir un papel modulador de la transmisión sináptica (Alkadhi et al., 2005). En cuanto a las células gliales encontramos células de Schwann en el nervio preganglionar y células satélite, que cubren las células ganglionares (Paxinos y Mai, 2004).

Desde el punto de vista celular en el ganglio se han identificado en forma directa o indirecta algunos de los elementos fundamentales en la señalización del calcio. Receptores ionotrópicos como el receptor nicotínico están presentes

en membranas pre y postganglionares (Feng et al., 1998; Del Signore et al., 2004) canales de calcio voltaje dependiente han sido identificado indirectamente y se ha desglosado su papel en la transmisión ganglionar y la LTP (Gonzalez-Burgos et al., 1995; Cifuentes et al., 2004). Receptores de ryanodina también han sido identificados, así como intercambiadores sodio - calcio y la bomba de calcio (Wanaverbecq et al., 2006).

- **Función.**

La función del gcs es regular el paso de información desde el SNC hacia órganos efectores, contribuyendo a regular la actividad cardiaca, respiratoria, la dilatación pupilar la secreción salival y lagrimal entre otras. La sinapsis ganglionar es de tipo químico, el neurotransmisor principal es la acetilcolina, la cual se almacena en vesículas pequeñas claras (scv) y actúa sobre dos tipos de receptores: los nicotínicos y los muscarínicos. Los receptores nicotínicos son receptores ionotrópicos, que actúan como canales catiónicos permeables principalmente al sodio y generan una transmisión sináptica rápida. Estos receptores son estructuras proteicas pentaméricas constituidas por subunidades α , β y γ de las cuales la subunidad α es la fundamental pues es la que interactúa directamente con el neurotransmisor; de esta se han identificado 11 isotipos (MacDermott et al., 1999). El receptor esta constituido por subunidades $\alpha3/\beta2$ y su estabilidad depende de proteínas de la densidad postsináptica (Del Signore et al., 2004; Parker et al., 2004). Los receptores muscarínicos son de tipo metabotrópico, de respuesta lenta y se acoplan a segundos mensajeros entre ellos el inositol trifosfato (IP3); de estos receptores

se han detectado a nivel ganglionar los subtipos M1 y M2. Adicionalmente, se han identificado un grupo grande de neuromoduladores peptídicos y no peptídicos; entre los neuropéptidos identificados están la neurotensina, la encefalina, la somatostatina y el péptido Y, los cuales se almacenan en vesículas grandes de núcleo denso (LDCV). Entre los neuromoduladores no peptídicos están el óxido nítrico y el monóxido de carbono; todos ellos aparentemente contribuyen a modular la transmisión sináptica (Bennett, 1994; Alkadhi y col., 2005).

11. APENDICE II

A. Artículo publicado.

Como resultado de los experimentos realizados para determinar el grado de contribución del calcio proveniente del medio extracelular y del liberado de las pozas intracelulares en la TB y en la LTP se publicó el siguiente artículo:

Vargas R, Cifuentes F. and Morales MA. Differential contribution of extra- and intracellular calcium sources to basal synaptic transmission and long-term potentiation in sympathetic ganglion of the rat. *Developmental Neurobiology* 67: 589-602.