



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR**

**PARTICIPACIÓN DE LA NEUROTROFINA-3 EN LA
MODULACIÓN DE LA COMUNICACIÓN Y LA
REORGANIZACIÓN SINÁPTICA
DE LAS FIBRAS MUSGOSAS HIPOCAMPALES:
EXPRESIONES DE PLASTICIDAD Y METAPLASTICIDAD**

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

PRESENTA:

LIC. LAURA ELISA RAMOS LANGUREN

TUTOR PRINCIPAL: DRA. MARTHA LILIA ESCOBAR RODRÍGUEZ
DIVISIÓN DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE POSGRADO,
FACULTAD DE PSICOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR:
DRA. SOFÍA YOLANDA DIAZ MIRANDA,
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM

DR. JAIME IVÁN VELASCO VELÁZQUEZ
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

MÉXICO, D.F. SEPTIEMBRE DE 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RESUMEN

Actualmente se considera que las modificaciones de la eficiencia sináptica de larga duración, tales como la potenciación de largo plazo (LTP) y la reorganización morfológica dependiente de la actividad, constituyen la base sináptica de los procesos de aprendizaje y memoria. Las investigaciones acerca de los mecanismos moleculares que subyacen a estos procesos han destacado la importante participación de las neurotrofinas en la plasticidad sináptica de largo plazo en el hipocampo y la neocorteza de cerebros adultos. En el hipocampo, una de las neurotrofinas que se expresa significativamente es la Neurotrofina-3 (NT-3), la cual se ha relacionado con la plasticidad sináptica tanto funcional como estructural. Un subsistema celular dentro del hipocampo, relevante para el estudio de fenómenos plásticos funcionales y estructurales es el de las fibras musgosas, en las que se ha encontrado una reorganización morfológica 7 días después de inducir LTP. De tal manera que en el presente proyecto se analizaron los efectos que ejerce la NT-3 sobre los cambios en la fortaleza de la transmisión sináptica así como en la reorganización de los botones musgosos en la vía de comunicación que va del giro dentado (GD) al área CA3 en el sistema nervioso adulto de roedores, *in vivo*. Para este fin el proyecto fue dividido en tres fases. La **primera fase** consistió en analizar los efectos que ejerce la NT-3 sobre la comunicación sináptica de la vía que va del GD al área CA3, así como sobre la reorganización morfológica de las fibras musgosas. Para ello, se utilizaron ratas adultas de la cepa Wistar (360-390 g), a las que 20 min después de iniciar el registro electrofisiológico se les microinfundió NT-3, con el fin de analizar la participación de los receptores de tirosina cinasa (Trk), se microinfundió NT-3 en combinación con el inhibidor de los receptores Trk o la sustancia vehículo (buffer de fosfatos, PBS). Para observar la difusión de NT-3 en el sitio de infusión, el hipocampo fue analizado con la técnica de inmunohistoquímica, la cual reveló una fuerte inmunoreactividad restringida al área CA3. Siete días después del procedimiento electrofisiológico, se evaluó la reorganización sináptica de las fibras musgosas hipocampales, utilizando la técnica histoquímica de Timm. Los resultados mostraron que la NT-3 induce incrementos prolongados de la eficiencia sináptica, los cuales están acompañados de reorganización morfológica, observada por la presencia principalmente ipsilateral al sitio de microinfusión, de botones musgosos en el estrato oriens del área CA3 y estos efectos son bloqueados por el inhibidor K252a. Se han reportado evidencias que muestran que la historia de actividad de una neurona o vía de conexión puede modificar la manera en que ésta presentará una subsecuente plasticidad sináptica. Por esta razón, en la **segunda fase** de este proyecto se evaluaron los efectos de la infusión hipocampal de NT-3 sobre las modificaciones de subsecuente plasticidad sináptica, tanto funcional como estructural, inducidas por la estimulación de alta frecuencia (HFS) capaz de generar LTP en la vía que va del GD al área CA3. Para abordar este segundo objetivo, durante el registro electrofisiológico, los animales recibieron estimulación de alta frecuencia (3 trenes de 100 Hz en 1 s) 20min después de la infusión de NT-3, NT-3+K252a o el vehículo. Para el análisis de la reorganización morfológica se utilizó la técnica histoquímica de Timm. Posteriormente, se llevaron a cabo análisis ultraestructurales por medio de microscopía electrónica de transmisión, con el fin de corroborar que la reorganización observada a través de la tinción de Timm coincidiera con la presencia de botones musgosos en el estrato oriens, así como analizar las características subcelulares de estos botones formados de novo. Los resultados de esta fase mostraron que la administración de NT-3 bloquea la inducción de la LTP inducida por HFS. Además, se encontró que la infusión de esta neurotrofina seguida de HFS modifica el patrón de reorganización observado tras la estimulación de alta frecuencia en ausencia de NT-3, produciendo un incremento bilateral en el estrato oriens del área CA3 hipocampal. Los análisis ultraestructurales mostraron que en los animales infundidos con NT-3 existen botones musgosos en el área infrapiramidal, correspondiente al estrato oriens del área CA3. En la **tercera fase** del proyecto el objetivo fue explorar parte de las vías de señalización relacionadas con las acciones de la NT-3 sobre la plasticidad sináptica funcional y estructural de las fibras musgosas, así como con la subsecuente aplicación de HFS, capaz de generar LTP en la vía que va del GD al área CA3. Para lo cual, se realizaron microinfusiones de NT-3 en combinación con inhibidores de la vía de los fosfoinosítidos (LY294002) y de la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs) (U0126). De manera similar a las fases anteriores se realizaron registros electrofisiológicos y análisis histológicos mediante la técnica de Timm. Los resultados mostraron que los inhibidores para estas vías bloquean tanto los incrementos de la eficiencia sináptica, como la reorganización morfológica de las fibras musgosas inducidos por NT-3. Asimismo, el efecto funcional y morfológico de la NT-3 sobre la subsecuente inducción de plasticidad sináptica fue bloqueado por los inhibidores de dichas vías de señalización. En conjunto, los resultados derivados de este proyecto indican que la NT-3 tiene un papel importante como modulador de los cambios plásticos de larga duración que subyacen a la consolidación sináptica en las fibras musgosas hipocampales. Finalmente los resultados indican que la NT-3 modifica la capacidad de las fibras musgosas para presentar subsecuente plasticidad sináptica, un mecanismo considerado esencial para mantener al sistema nervioso en un estado de homeostasis, que le permite seguir adquiriendo y almacenando información.

ABSTRACT

It is widely accepted that learning and memory are dependent on changes in synaptic efficiency and morphology that permit the strengthening of synapses. Neurotrophins, a family of structurally and functionally related proteins, have recently emerged as major regulatory factors for synapse development and plasticity. Especially the expression of the Neurotrophin 3 (NT-3) gene in the adult brain is highly confined to the dentate gyrus (DG). The neuronal activity can modulate the expression of NT-3 and its receptor TrkC mRNA in the hippocampus, which suggests that this neurotrophin may play a role in synaptic plasticity in the adult central nervous system (CNS). Our previous studies show that the application of high-frequency stimulation (HFS) sufficient to elicit LTP at the dentate gyrus DG-CA3 pathway produces mossy fiber (MF) structural reorganization 7 days after tetanic stimulation. Here we used intrahippocampal microinfusion of NT-3 to analyze its effects on synaptic efficacy and morphological reorganization at the DG-CA3 pathway *in vivo*. Male Wistar rats, weighing 360–390 g were used in this study. To evaluate the effects of NT-3 in MF's synaptic efficacy and morphology, experiments were divided into three phases. For **phase 1**, the animals were divided into the following treatment groups: the NT-3 group, which underwent surgery, had electrodes implanted and received intrahippocampal microinfusion of NT-3 after 20 min of baseline recording; vehicle group which, under the same conditions as the NT-3 group, received intrahippocampal microinfusion of PBS and the NT-3+K252a group which, received intrahippocampal microinfusion of NT-3 in combination with K252a, an inhibitor of Trk receptor tyrosine kinases. MF reorganization was evaluated 7 days after the electrophysiological procedure using Timm's staining, a zinc-detecting histological marker previously used to infer synaptogenesis at the MF. The results show that intrahippocampal microinfusion of NT-3 induces a long-lasting potentiation of synaptic efficacy in the DG-CA3 projection of adult rats (*in vivo*). In addition, we observed that NT-3 functional-mediated modifications in synaptic efficacy were accompanied by a presynaptic structural reorganization at the hippocampal mossy fiber pathway. To clarify the degree to which exogenously applied NT-3 spread into the hippocampus around the recording electrode after the infusion, the hippocampus was stained immunohistochemically with an anti-NT-3 antibody in animals treated in a similar manner as the NT-3 and vehicle groups. Strong immunoreactivity was seen only around the NT-3 infusion site. It is considered that the capacity of synapses to express plastic changes is itself subject to variation depending on previous experience; taking into consideration the effects of NT-3 on MF synaptic communication and morphological reorganization. Thus, in the **phase 2** we used intrahippocampal microinfusion of NT-3 to analyze its effects on the long-term functional and morphological synaptic reorganization induced by a subsequent MF-HFS, sufficient to elicit LTP in adult rats, *in vivo*. The animals were divided into the following treatment groups: the HFS group, which underwent surgery, had electrodes implanted and received HFS capable of inducing LTP; NT-3+HFS which, under the same conditions as the HFS group, received HFS in the presence of NT-3; VEH+HFS group, which received HFS in the presence of PBS and NT-3+K252+HFS group which, under the same conditions as the HFS group, received intrahippocampal microinfusion of NT-3 in combination with K252a. Our results show that NT-3 blocks the ability of the MF pathway to undergo a subsequent LTP by HFS, and modifies the structural reorganization pattern. The modifications in synaptic efficacy and morphology elicited by NT-3 at the MF-CA3 pathway were blocked in the presence of a Trk receptor inhibitor (K252a). Electron microscopy revealed the presence of MF buttons in the stratum oriens of the CA3 area. In the **phase 3**, the aim was to explore the possible signaling pathways used by NT-3 to elicit synaptic plasticity. Thus, we used intrahippocampal microinfusion of NT-3 accompanied by inhibitors of mitogen-activated protein kinases (MAPK, inhibitor U0126) and phosphatidylinositol-3-kinase (PI-3K, inhibitor LY294002), to analyze the molecular mechanisms underlying NT-3 effects. Similarly to the previous phases, electrophysiological recordings and histological analyses were performed. The results show that these inhibitors block the modifications in synaptic efficacy, as well as the structural reorganization elicited by NT-3 at the MF-CA3 pathway. Furthermore, our results show that the modifications elicited by NT-3 on the ability of MF to present the subsequent functional and structural plasticity were also blocked by MAPK and PI3-K inhibitors. Taking together, these findings support the idea that NT-3 plays an important role as a synaptic modulator of activity-dependent synaptic plasticity in the MF-CA3 pathway. Furthermore, our results show that NT-3 microinfusion modifies the functional and morphological synaptic plasticity induced by HFS at the mossy fiber synapse *in vivo*. These results are in agreement with the idea that NT-3 actions modify the ability of mossy fibres to present subsequent plasticity, a homeostatic mechanism thought to be essential for the synaptic integration among prolonged temporal domains in the adult mammalian brain.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por formar y forjar mi educación, mi personalidad y mi conocimiento.

Al Posgrado en Ciencias Biomédicas por permitirme cumplir mis objetivos académicos, científicos y por acrecentar mi búsqueda por el saber, aprender, conocer y comprender.

A las Instituciones que nos otorgaron el apoyo económico para la realización de la presente tesis: CONACYT (Proyecto 60851) y PAPIIT (Proyecto IN212013).

Gracias a mi tutora y gran ser humano Martha L. Escobar, por compartir tus conocimientos y adentrarme al maravilloso universo de las neurociencias. Gracias por la paciencia y el respeto que me diste a lo largo de estos años.

A mis Comité tutorial: Dra. Sofía Díaz Miranda y Dr. Iván Velasco, por su apoyo a lo largo de mis estudios de Doctorado y porque sus comentarios, preguntas y sugerencias siempre enriquecieron mi proyecto y mi formación.

A mi jurado de tesis: Dr. Federico Bermúdez, Dra. Angélica Zepeda, Dra. María Isabel Miranda y Dra. Alejandra Ruiz gracias por el tiempo dedicado a esta tesis y por los comentarios realizados.

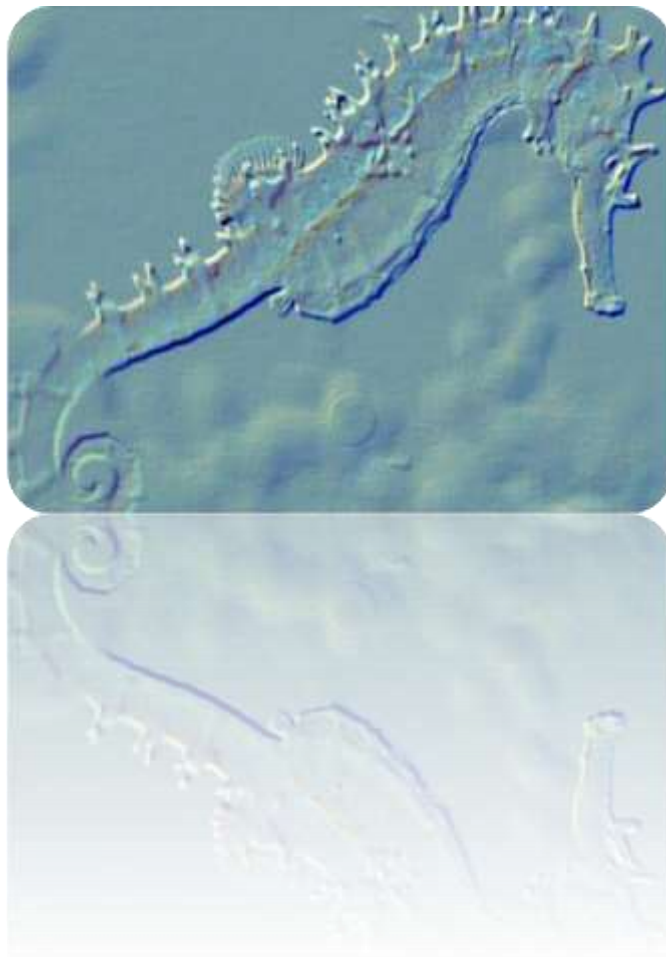
Al bioterio de la Facultad de Psicología, a cargo del M.V.Z. Gabriel Solano por la provisión y mantenimiento de los animales utilizados para realizar el presente proyecto. A la unidad de microscopía del IFC, en especial a Rodolfo Paredes por el apoyo otorgado durante los análisis de microscopía electrónica.

A Sara Noguera, Zenaida Martínez y Angélica Téllez por la orientación brindada durante mis estudios de Doctorado y en el proceso de obtención de grado.

*Dedico esta tesis a mi familia,
en especial un maravilloso hombre,
ejemplo de fortaleza en mi vida,
Panciano Ramos Q.E.P.D.
y a mi sobrina Sharon.*

*"If you want to know your past - look into your present conditions.
If you want to know your future - look into your present actions."*

Buddhist Saying



"Memory... is the diary that we all carry about with us."

ÍNDICE

1. GLOSARIO DE ABREVIATURAS	8
2. INTRODUCCIÓN	11
3. ANTECEDENTES	11
3.1. La formación hipocampal	12
3.1.1. Las fibras musgosas	14
3.2. Potenciación a largo plazo	17
3.2.1. Incrementos en la eficiencia sináptica dependientes del aprendizaje	18
3.2.2. Mecanismos moleculares de la LTP	19
3.2.3. Mecanismos moleculares de la LTP en las fibras musgosas	21
3.3. Plasticidad sináptica estructural	23
3.4. Plasticidad homeostática	26
3.4.1. La metaplasticidad y el escalamiento sináptico	27
3.5. Las neurotrofinas	31
3.5.1. La Neurotrofina-3	33
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	37
5. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	38
6. OBJETIVOS	38
5.1. Objetivos particulares	39
7. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	39
7.1. Animales	39
7.2. Procedimiento electrofisiológico	40
7.3. Técnica histoquímica de Timm	42
7.4. Análisis histológicos	42
7.5. Inmunohistoquímica	43
7.6. Microscopía electrónica de transmisión	44
7.7. Análisis de resultados	45
8. DISEÑO EXPERIMENTAL	45
8.1. Primera fase	45
8.2. Segunda fase	47
8.3. Tercera fase	48
9. RESULTADOS	52
9.1. Primera fase: Efecto de la NT-3 en la comunicación sináptica y la reorganización morfológica de las fibras musgosas hipocampales	52
9.1.1. Resultados electrofisiológicos	52
9.1.2. Resultados histológicos: Inmunohistoquímica	54
9.1.3. Resultados histológicos: Técnica histoquímica de Timm	54
9.2. La NT-3 produce un efecto metaplástico que resulta en un bloqueo de la LTP inducida por HFS	56
9.2.1. Resultados electrofisiológicos	56
9.2.2. Resultados histológicos	56
9.2.3. Análisis ultraestructural	59
9.3. Tercera fase	59
9.3.1. Vías de señalización activadas por la NT-3 en la modulación de la comunicación sináptica: Resultados electrofisiológicos	59
9.3.2. Resultados histológicos	59
9.3.3. Vías de señalización activadas por la NT-3 en la modulación de inducción de subsecuente plasticidad sináptica: Resultados electrofisiológicos	62
9.3.4. Resultados histológicos	63
10. DISCUSIÓN	66
10.1. La NT-3 potencia la transmisión sináptica en la vía que va del GD al área CA3 hipocampal	67
10.2. La NT-3 induce reorganización sináptica en las fibras musgosas hipocampales	71
10.3. Acciones de la NT-3 en los procesos metaplásticos en la vía que va del GD al área CA3	74
10.4. La NT-3 modifica el patrón de reorganización sináptica inducido por estimulación de alta frecuencia en las fibras musgosas hipocampales	76
11. CONCLUSIONES	78
12. REFERENCIAS	79
13. ÍNDICE DE FIGURAS	89

1. GLOSARIO DE ABREVIATURAS

4E-BP	Proteína de unión a factores de elongación
θ m	Umbral de modificación
AC	Adenilato ciclasa
AMPC	Adenosín monofosfato cíclico
AMPA	Receptor a glutamato tipo ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico
AP	Anteroposterior
ARNm	Ácido ribonucléico mensajero
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
CaMKII	Proteína cinasa dependiente de calcio-calmodulina tipo II
CAS	Condicionamiento aversivo a los sabores
CON	Control
CPSEm	Corrientes postsinápticas excitadoras miniatura
CRE	Elemento responsivo a adenosin monofosfato cíclico
CREB	Proteína de unión al elemento responsivo de adenosin monofosfato cíclico
DAB	Diaminobenzidina
DAG	Diacilglicerol
DCG-IV	Agonista del receptor metabotrópico a glutamato tipo II, 2-(2,3-dicarboxi-ciclopropil) glicina
DV	Dorso-ventral
eIF2B	Factor 2B eucariótico de iniciación
eIF4E	Factor 4E eucariótico de iniciación
ERK	Proteína cinasa regulada por una señal extracelular
FM	Fibras musgosas
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GD	Giro dentado
GD-CA3	Vía de señalización del giro dentado al CA3 hipocampal
Gln	Glutamina
Grb-2	Proteína adaptora a los receptores de factores tróficos tipo 2
HDNF	Factor neurotrófico derivado del hipocampo, otro nombre que recibió la Neurotrofina-3 inicialmente
HFS	Estimulación de alta frecuencia
IP3	Inositol trifosfato
K252a	Inhibidor de los receptores de tirosina cinasa a neurotrofinas

Leu	Leucina
LTD	Depresión de largo plazo
LTP	Potenciación de largo plazo
LY294002	Inhibidor de la proteín-fosfatidil inositol 3 cinasa
MAPKs	Proteínas cinasas activadas por mitógenos
MEK	Proteína cinasa regulada por mitógenos y por señales extracelulares
mGluR	Receptores metabotrópicos a glutamato
ML	Medial-lateral
mTOR	Proteína blanco de rapamicina en mamíferos
NGF	Factor de crecimiento neuronal
NGF-2	Factor de crecimiento neuronal-2, otro nombre que recibió la Neurotrofina-3 inicialmente
NMDA	Receptor a glutamato N-metil-D-aspartato
NR2A	Subunidad del receptor NMDA 2A
NR2B	Subunidad del receptor NMDA 2B
NT-3	Neurotrofina 3
NT-4/5	Neurotrofina 4/5
NT-6	Neurotrofina 6
NT-7	Neurotrofina 7
PBS	Amortiguador de fosfatos
PI3-K	Fosfatidil inositol 3 cinasa
PKA	Proteína cinasa dependiente de adenosin monofosfato cíclico
PKB	Proteína cinasa B, denominada también Akt
PKC	Proteína cinasa dependiente de calcio
PKM ζ	Proteína cinasa M ζ (zeta), isoforma de la proteína cinasa dependiente de calcio
PLC γ	Fosfolipasa C γ
PPSE	Potenciales postsinápticos excitatorios
Rab3A	Proteína rabfilina 3A
SH	Proteína homóloga a la oncoproteína Src
SL	Estrato lúcido
SN	Sistema nervioso
SNC	Sistema nervioso central
SO	Estrato oriens
SOS	Proteína liberadora de nucleótidos de guanina “son of the seventhless”
SOSP	Estrato oriens y estrato piramidal
SP	Estrato piramidal
Src	Proteína celular homóloga a la proteína del virus Rous sarcoma

STDP	Plasticidad dependiente de la sincronización de las espigas (Spike timing-dependent plasticity)
Thr	Treonina
Trk	Receptor de tropomiosina cinasa
TrkA	Receptor de tropomiosina cinasa tipo A
TrkB	Receptor de tropomiosina cinasa tipo B
TrkC	Receptor de tropomiosina cinasa tipo C
Tyr	Tirosina
U0126	Inhibidor de las proteína cinasa regulada por mitógenos y por señales extracelulares 1/2
VEH	Vehículo
ZAs	Zonas activas

2. INTRODUCCIÓN

El tratar de dilucidar los mecanismos mediante los cuales el sistema nervioso central (SNC) almacena información por periodos prolongados, ha representado un reto para las neurociencias en los últimos años. Las modificaciones de la eficiencia sináptica de larga duración y las modificaciones estructurales dependientes de la actividad, tienen especial relevancia para el estudio de los fenómenos de aprendizaje y memoria, además de otros comportamientos adaptativos, debido a que representan expresiones de plasticidad sináptica de larga duración (Malenka y Bear, 2004).

Entre los hallazgos más importantes en este sentido, se encuentran las investigaciones recientes que involucran al grupo de proteínas denominadas neurotrofinas, en la plasticidad sináptica de larga duración en el sistema nervioso adulto (Messaoudi et al., 2002; Je et al., 2005; Lu et al., 2005). En el SNC las neurotrofinas se expresan predominantemente en la neocorteza y el hipocampo. Actualmente se sabe que sus niveles de secreción son regulados por la actividad sináptica y que ejercen sus acciones en la eficiencia de la comunicación de las sinapsis tanto en las células presinápticas como en las postsinápticas (Lu et al., 2005; Kolarow et al., 2007). La investigación realizada durante las dos décadas pasadas ha revelado que las neurotrofinas regulan casi todo los aspectos del desarrollo de circuitos neuronales y su funcionamiento, incluyendo proliferación y diferenciación, crecimiento axonal y dendrítico, así como la plasticidad sináptica (Park y Poo, 2013).

3. ANTECEDENTES

El aprendizaje se refiere a la adquisición de información obtenida del medio; mientras que la memoria, se define como el almacenamiento de dicha información. El aprendizaje y la memoria son dos procesos cognitivos que requieren de la adaptación de los circuitos neuronales, para que los individuos puedan dar una respuesta a su ambiente.

Diversos grupos de investigación en el campo de las neurociencias se han interesado en esclarecer los sustratos neuronales y mecanismos biológicos subyacentes al aprendizaje y la memoria. De modo que las investigaciones en este campo han tratado de responder dónde se

almacena la información en el sistema nervioso (SN) y cuáles son los mecanismos utilizados para almacenar dicha información. Entre las estructuras relacionadas con el aprendizaje y la memoria han destacado los lóbulos temporales, el cerebelo, la neocorteza y la formación hipocampal (Milner et al., 1998).

3.1. La formación hipocampal

La formación hipocampal incluye al giro dentado (GD), los campos de Ammon (CA), el subiculum, el presubiculum, el parasubiculum y la corteza entorrinal (figura 1). Los resultados de numerosas investigaciones han mostrado que la formación hipocampal juega un papel crucial en la memoria de tipo declarativo, especialmente de los tipos espacial, de trabajo y relacional (Eichenbaum, 2004).

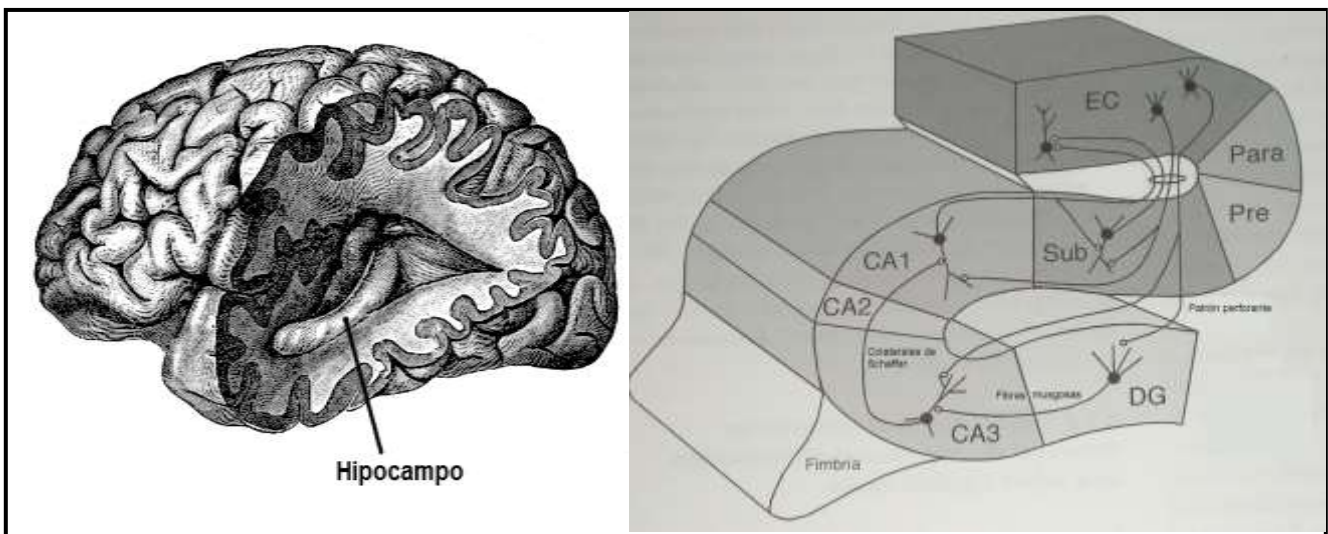


Figura 1. La formación hipocampal. A la izquierda, se muestra el hipocampo debajo de la corteza temporal. A la derecha, se observa un esquema de la formación hipocampal, en el cual las neuronas de la capa II de la corteza entorrinal envían sus proyecciones hacia el GD y el área CA3 a través del patrón perforante. Las neuronas de la capa III proyectan al área CA1 y al subiculum mediante el patrón perforante y las vías alveares. Las células granulares del GD envían sus proyecciones al área CA3, las cuales proyectan al área CA1 mediante las colaterales de Schaffer. Las células piramidales del área CA1 envían sus proyecciones hacia el subiculum y tanto las células del subiculum como las del área CA1 envían proyecciones de regreso hacia la corteza entorrinal (Modificado de Andersen et al., 2007).

El hipocampo propiamente dicho contiene tres subdivisiones: CA3, CA2 y CA1, asimismo incluye al GD (Andersen et al., 2007). El hipocampo, es una corteza filogenéticamente antigua que se encuentra localizada en los hemisferios cerebrales bajo la neocorteza (figura 1) (Fernández-Espejo, 1996). Tanto los campos de Ammon como el giro dentado constituyen un tejido neural que consta de tres estratos laminares, conocidos como arquicorteza. Estas

láminas son la polimórfica (estrato oriens), piramidal (estrato piramidal) y molecular (estrato radiado y estrato lagunoso molecular) (Amaral y Dent, 1981) (figura 2 a).

El hipocampo recibe información sensorial multimodal altamente procesada de una gran variedad de áreas neocorticales. La organización de las conexiones nerviosas de esta estructura se considera unimodal en comparación con otras áreas corticales, que consta de un circuito básico llamado circuito trisináptico (aunque se han descrito otras vías de conexión que hacen más complejo este modelo del hipocampo). La mayor parte de la información de la neocorteza que se envía al hipocampo llega por medio de axones que se proyectan de las capas más superficiales de la corteza entorrinal y llegan principalmente al giro dentado estableciendo la *primera sinapsis*.

La *segunda sinapsis* la establecen los axones de las células granulares del GD (fibras musgosas) con las dendritas apicales de las células piramidales del área CA3. La *tercera sinapsis* la forman los axones de las neuronas piramidales en el área CA3 que envían proyecciones denominadas colaterales de Schaffer hacia el área CA1 (figura 2 b) (Represa et al., 1993; Amaral y Dent, 1981; Fernández-Espejo, 1996; Cavazos et al., 2003; Andersen et al., 2007).

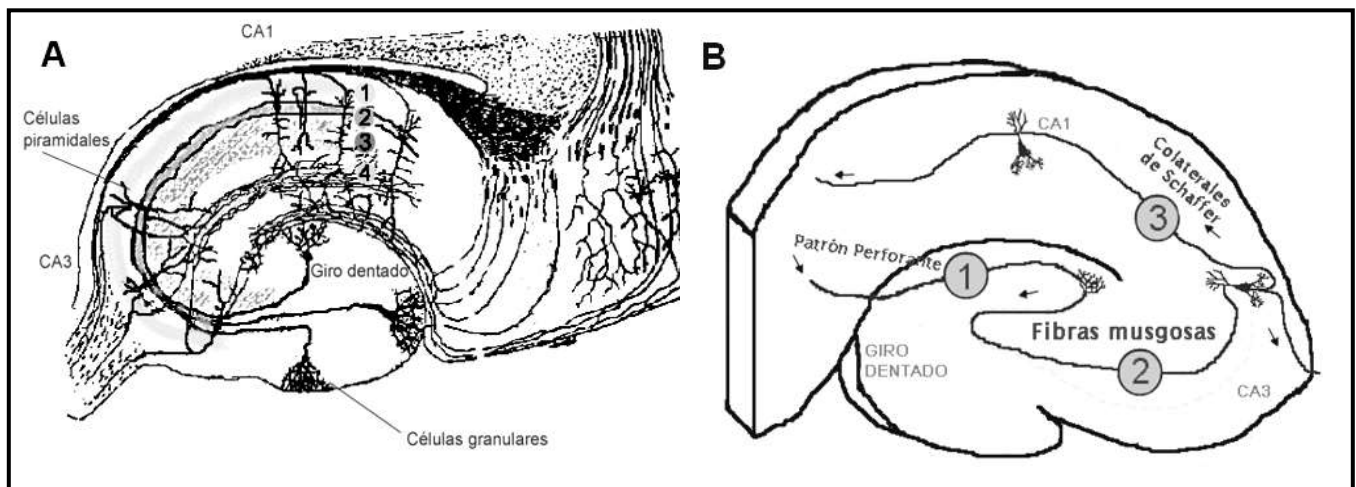


Figura 2. Diferentes estratos del hipocampo y circuito trisináptico. A. Diagrama que muestra los estratos hipocámpales: 1. Estrato oriens; 2. Estrato piramidal; 3. Estrato radiado. 4. Estrato lagunoso-molecular (Modificado de Ramón y Cajal, 1911). B. Diagrama del circuito trisináptico de la formación hipocámpal. 1: Primera sinapsis (patrón perforante-células granulares del giro dentado); 2: Segunda sinapsis (fibras musgosas-dendritas piramidales del CA3); 3: Tercera sinapsis (colaterales de Shaffer-dendritas piramidales del CA1). (Modificado de Fernández-Espejo, 1996).

3.1.1 Las fibras musgosas

La participación diferencial de subsistemas celulares dentro del hipocampo en los procesos biológicos del aprendizaje y la memoria, ha servido para adentrarse en la elucidación de los mecanismos a nivel celular de dichos procesos. Uno de los subsistemas del hipocampo que ha sido explorado ampliamente en este sentido es el de las fibras musgosas. Este subsistema es bastante accesible al estudio histológico, electrofisiológico y bioquímico, debido principalmente, al gran tamaño relativo de sus componentes y a su estructura laminar (Amaral y Dent, 1981). Las fibras musgosas, constituyen un importante escaparate para el estudio de fenómenos plásticos, debido a su alta susceptibilidad de experimentar modificaciones de tipo funcional y anatómico (Ben-Ari y Represa, 1990).

Las fibras musgosas están conformadas por los axones no mielinizados de las células granulares del giro dentado que hacen sinapsis tanto con las células hilares como con las células piramidales del área CA3. Estas fibras viajan a través del área CA3 formando una banda gruesa llamada estrato lúcido haciendo sinapsis *en passant* con la parte proximal de las dendritas apicales de las células piramidales del área CA3 (Henze et al., 2000). A su vez, las células granulares del giro dentado reciben aferencias masivas desde la corteza entorrinal, la cual llega a los dos tercios externos de sus dendritas y en su tercio interno reciben proyecciones del hilus ipsi y contralateral.

Las terminales axónicas de las fibras musgosas están conformadas por botones sinápticos gigantes ($4\text{-}10\mu\text{m}$ de diámetro y con un volumen aproximado de $50\mu\text{m}^3$) con múltiples dobleces y varicosidades. Estos botones se encuentran invaginados por excrescencias y espinas de las células piramidales, a los que típicamente envuelven completamente, formando grandes complejos sinápticos (Henze et al., 2000) (figura 3). Los botones individuales tienen un promedio de 25 zonas activas (ZAs), el promedio de tamaño de éstas es de $0.13\mu\text{m}^2$ ($0.07\text{-}0.17\mu\text{m}^2$) y la distancia media entre las ZAs es de $0.45\mu\text{m}$. Un botón puede contener alrededor de 20 400 vesículas sinápticas, alrededor de 900 se localizan muy cerca de las ZAs (a 60nm), alrededor de 4400 se localizan a una distancia de entre 60 y 200nm y el resto se encuentra más allá de los 200nm (Rollenhagen et al., 2007).

Las fibras musgosas constituyen una proyección fundamentalmente excitadora, que utiliza principalmente glutamato en la neurotransmisión. Estas fibras son características por su

alto contenido en péptidos opioides (principalmente dinorfinas y encefalinas) que funcionan como importantes moduladores en esta área (Derrick et al., 1991; Escobar et al., 1997). Otra característica particular de estas fibras, es el alto contenido de zinc en sus botones, el cual se co-libera con el glutamato (Quinta-Ferreira y Matias, 2004; Frederickson et al., 2005). Esta característica facilita la tinción de estos botones con la técnica histoquímica de Timm, la cual revela la presencia de metales pesados (Danscher, 1981). El zinc puede modular la plasticidad sináptica de esta vía; por ejemplo tanto quelantes de zinc, como la ingesta de una dieta crónica deficiente de este metal pueden inhibir la inducción de la potenciación a largo plazo (LTP) de esta vía (Lu et al., 2000; Li et al., 2001). La entrada de zinc del espacio extracelular hacia la neurona postsináptica puede darse a través de los receptores AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico) o kainato permeables a calcio y por los canales de calcio dependientes de voltaje, los cuales tienen un papel importante en la LTP de estas fibras (Li et al., 2001; Jia et al., 2002), el blanco postsináptico para el zinc aún no se conoce, pero en un estudio reportado por Huang y colaboradores se describió que el zinc puede activar a los receptores de tirosina cinasa TrkB incrementando la actividad de la familia de cinasas Src por un mecanismo independiente al de las neurotrofinas (Huang et al., 2008).

La proyección de las fibras musgosas posee características especiales en su comportamiento ante algunos tipos de estimulación eléctrica, como la estimulación de alta frecuencia (HFS) que produce LTP. Se ha observado que el incremento de la eficiencia sináptica por la HFS en esta proyección, no es dependiente de los receptores a glutamato de tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) (Malenka y Bear, 2004), atribuyéndose la potenciación en esta área a incrementos en las concentraciones de calcio intracelular, producidos principalmente por medio de la activación de los receptores a glutamato de tipo AMPA y kainato, así como de la activación de canales de calcio dependientes de voltaje. Se ha descrito que la transmisión de esta vía puede ser deprimida a través de la activación de varios tipos de receptores presinápticos, como los receptores metabotrópicos de glutamato del grupo 2, y algunas especies del grupo 3, los receptores GABA_A y algunos receptores a kainato, aunque para estos últimos existe discrepancia (Nicoll y Schmitz, 2005).

Numerosos experimentos han demostrado que la presencia o ausencia de estimulación, así como la frecuencia de los patrones de estimulación de las neuronas, tienen efectos determinantes sobre la organización de las sinapsis involucradas (Shatz, 1992; Bailey y

Kandel, 1993; Lamprecht y Le Doux, 2004). Ejemplo de lo anterior, son los estudios realizados en la proyección de las fibras musgosas, que hace sinapsis de manera primordial en la zona proximal de las dendritas apicales de las células piramidales del área CA3 en el estrato lúcido, estas sinapsis se denominan suprapiramidales. Sin embargo se ha observado que tras diferentes tipos de tratamiento, conductual (Döbrössy y Dunnett, 2001; Ramirez-Amaya et al., 2001), electrofisiológico (Adams et al., 1997; Escobar et al., 1997; Morimoto et al., 2004) y bioquímico (Ben Ari y Represa, 1990; Adams et al., 1997; Schjetnan y Escobar, 2012), las fibras musgosas se reorganizan estableciendo nuevas sinapsis en las zonas proximales de las dendritas basales de las células piramidales del área CA3 en el estrato oriens; a estas nuevas conexiones se les denomina infrapiramidales. Este tipo de sinapsis, ha sido detectada generalmente utilizando la técnica histoquímica de Timm, pero estos hallazgos han sido también corroborados utilizando otras técnicas como Golgi (Ben Ari y Represa, 1990), trazadores de vías neurales (Franck et al., 1995) o microscopía electrónica (Amaral y Dent, 1981; Franck et al., 1995; Ramírez-Amaya et al., 1999).

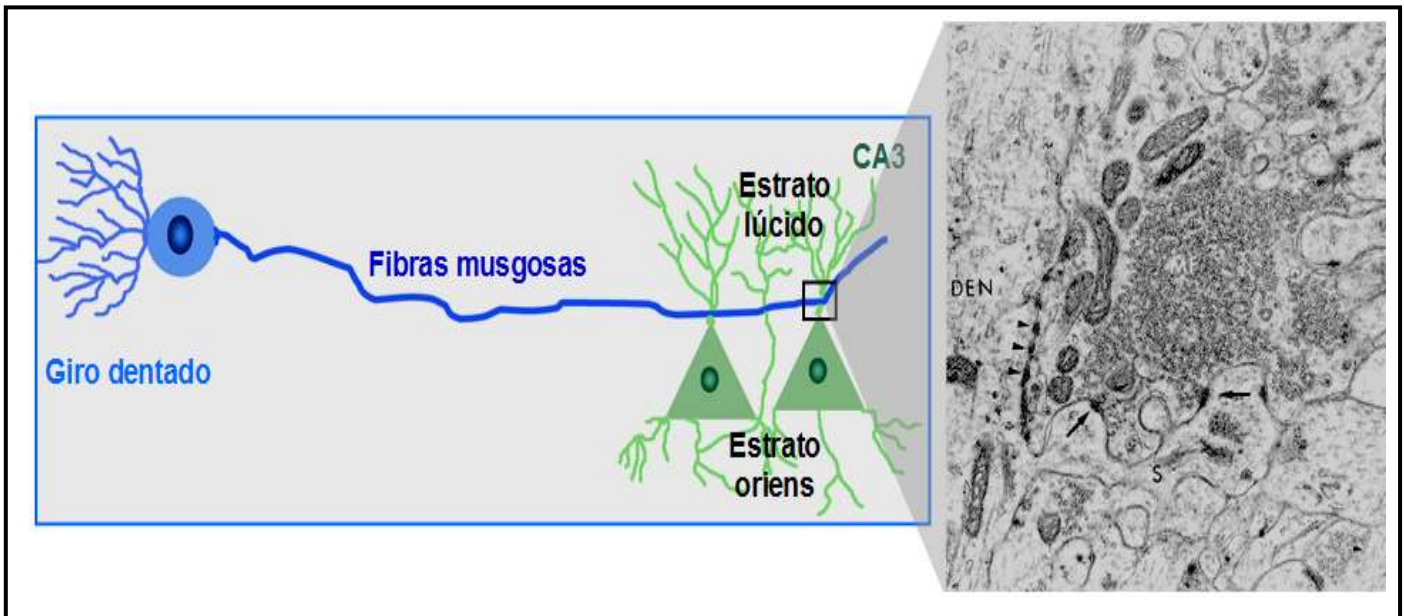


Figura 3. Micrografía electrónica del complejo sináptico de las fibras musgosas. La dendrita de la célula piramidal postsináptica del área CA3 (DEN), es envuelta por la terminal presináptica de una fibra musgosa (MF). La terminal presináptica contiene numerosas vesículas y algunas mitocondrias. La excrecencia de la terminal postsináptica (S) es penetrada por el botón de la fibra musgosa. Las flechas indican algunas vesículas cercanas al sitio de liberación de neurotransmisor en uniones asimétricas localizadas entre el botón terminal y la espina dendrítica; las puntas de flecha indican las uniones simétricas entre las dendritas y el botón de la fibra musgosa (modificado de Amaral y Dent, 1981).

3.2. Potenciación de largo plazo

La memoria, se refleja en la capacidad de las neuronas para modular las respuestas evocadas por un estímulo y para reactivar una respuesta en ausencia del estímulo que la originó (Eichenbaum, 2004). Los mecanismos moleculares de la plasticidad sináptica se han relacionado con cambios en la eficacia sináptica (definida como la capacidad de una entrada presináptica para influir en la respuesta postsináptica; López, 2002) que duran semanas, meses o años; estos cambios se han propuesto como explicaciones potenciales del almacenamiento de información. Uno de los grandes avances para la comprensión de los mecanismos involucrados en el almacenamiento de información en el SNC es la potenciación a largo plazo (LTP, por las siglas en inglés). En 1973 Bliss y Lømo encontraron que breves trenes de estimulación de alta frecuencia aplicados a las aferentes excitadoras del hipocampo de conejos, causaban un incremento en la fortaleza de la transmisión sináptica que podía durar días e incluso semanas en animales intactos, a lo que le llamaron, potenciación a largo plazo. Actualmente, este fenómeno representa un importante escaparate para el estudio del repertorio de cambios plásticos que expresan las células del sistema nervioso y por ello es uno de los modelos experimentales más utilizados para estudiar fenómenos relacionados con el almacenamiento de información (Malenka y Bear, 2004).

En la actualidad se ha inducido la LTP tras diferentes tipos de estimulación en varias áreas del SNC como el hipocampo y la neocorteza (Malenka y Bear, 2004). Asimismo, se han observado modificaciones de la eficiencia sináptica tras la infusión de neurotrofinas como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (Jiang et al., 2001; Paterson et al., 2001; Messaoudi et al., 2002; Escobar et al., 2003; Gómez-Palacio-Schjetnan y Escobar, 2008) y la neurotrofina 3 (NT-3) (Messaoudi et al., 1998; Arvanov et al., 2000) y agonistas del adenosín monofosfato cíclico (AMPC) (Patterson et al., 2001). De igual manera se han observado incrementos en la eficiencia sináptica a través de diversas tareas de aprendizaje, como el condicionamiento al miedo (McKerman et al., 1997; Rogan et al; 1997) y el aprendizaje motor (Rioult-Pedotti et al., 2000). Es importante señalar que en los últimos años el fenómeno de la LTP ha contribuido también a la comprensión de los mecanismos celulares que subyacen a conductas adictivas (Lovinger et al., 2003) así como a desórdenes neurológicos como el dolor crónico y la depresión (Sandkuhler, 2007; Bliss y Cooke 2011).

3.2.1. Incrementos en la eficiencia sináptica dependientes del aprendizaje

Actualmente, existen numerosas evidencias que muestran la estrecha relación existente entre los procesos de aprendizaje y memoria y el fenómeno de la LTP. Algunos ejemplos son los estudios realizados por dos grupos independientes, no en el área del hipocampo sino en la amígdala (McKernan y Shinnick-Gallagher, 1997; Rogan et al., 1997). Los resultados de estos trabajos sugieren que el condicionamiento al miedo, causa un incremento de largo plazo en la eficiencia sináptica en la vía que transmite información auditiva del núcleo geniculado medial del tálamo, a la amígdala lateral. Rogan y cols. (1997) demostraron *in vivo* que el condicionamiento al miedo produce incrementos en la pendiente y en la amplitud de los potenciales postsinápticos excitatorios (PPSE's) en la amígdala lateral de ratas adultas, similares a los vistos después de inducir LTP *in vivo*. Por otra parte McKernan y Shinnick-Gallagher (1997) demostraron que 24 hr después del entrenamiento en una tarea de condicionamiento al miedo, se producía una facilitación presináptica en la amígdala lateral en preparaciones *in vitro*. En este mismo orden de ideas, en 1998 Rioult-Pedotti y cols. demostraron que la corteza motora primaria de ratas adultas presenta un cambio en la eficiencia sináptica debido al aprendizaje de una habilidad motora (motor skill learning). Específicamente observaron un incremento en la amplitud de los PPSEs en la corteza motora primaria del hemisferio entrenado con respecto a la corteza motora primaria del hemisferio contralateral, considerado como control (Rioult-Pedotti et al., 1998). De manera similar, Monfis y Teskey en el 2004, reportaron un incremento de la eficiencia sináptica inducido en la corteza somatosensorial por una tarea de aprendizaje dependiente de ésta corteza. Concordante con lo anterior, un estudio reciente demostró el incremento de la eficacia sináptica en el área CA1 hipocampal de ratas adultas *in vivo*, después del entrenamiento en una tarea dependiente de la actividad hipocampal (denominada prevención pasiva) (Whitlock et al., 2006). Esta serie de evidencias muestra que los cambios en la eficiencia sináptica dependientes del entrenamiento en tareas conductuales se ven representados en las áreas del SN de las que depende cada tarea.

3.2.2. Mecanismos moleculares de la LTP

Los mecanismos moleculares que subyacen al establecimiento y mantenimiento de la LTP han sido ampliamente estudiados en las vías hipocampales, particularmente en la vía de las colaterales de Schaffer que establece sinapsis con las neuronas piramidales en el área CA1. La LTP en este patrón de comunicación se ha relacionado con la activación de los receptores NMDA. La estimulación de alta frecuencia a la neurona presináptica, permite la liberación de glutamato al espacio extracelular y, éste neurotransmisor, activa a los receptores AMPA en la célula postsináptica, dando lugar a la entrada de sodio al interior de la célula. La despolarización de la membrana postsináptica permite el desbloqueo de magnesio de los receptores NMDA y su consecuente activación. Esto otorga a los receptores NMDA la propiedad de funcionar como detectores asociativos, ya que se activan sólo cuando coinciden la actividad de la célula presináptica y la despolarización de la membrana en la célula postsináptica (Malenka y Bear, 2004).

El incremento en las concentraciones de calcio desencadenado por la inducción de LTP conlleva a la activación de la proteína citosólica llamada calmodulina, que funciona como una señal al activar distintas vías de traducción en el interior de la célula, haciendo posible el mantenimiento del incremento en la eficiencia sináptica por tiempos prolongados (Malenka y Bear, 2004). Se ha observado que un mecanismo importante en la generación de la LTP, es la activación de varias proteínas cinasas (las cuales se caracterizan por transferir un grupo fosfato a sus substratos). Entre estas cinasas destaca la actividad de la calcio calmodulina cinasa II (CaMK-II), la cual fosforila a los receptores AMPA y NMDA (Sanhueza y Lisman, 2013). Destaca asimismo la actividad de las tirosinas cinasas (Trk). Tanto la CaMK-II como las Trk, se han mostrado involucradas en la producción y activación de mensajeros retrógrados, los cuales permiten la liberación de más neurotransmisor de la presinapsis (figura 4) (Malenka y Bear, 2004).

Entre los mecanismos que participan en el mantenimiento de la LTP por períodos prolongados se encuentran la síntesis de proteínas así como, las modificaciones estructurales que dan origen a nuevos contactos sinápticos (figura 6) (Lamprecht y Le Doux, 2004). La síntesis de proteínas se lleva a cabo por medio de la activación de la PKA. La unidad catalítica

de esta proteína se transloca al núcleo y una vez en el interior activa al factor de transcripción CREB (proteína de unión al elemento responsivo al AMPc), que regula la transcripción de genes. La LTP tardía se expresa debido a la producción de proteínas de adhesión celular, así como a la polimerización de actina; ambos eventos son necesarios para que ocurran tanto las modificaciones estructurales neuronales, como la formación de nuevos contactos sinápticos (Kelleher et al., 2004).

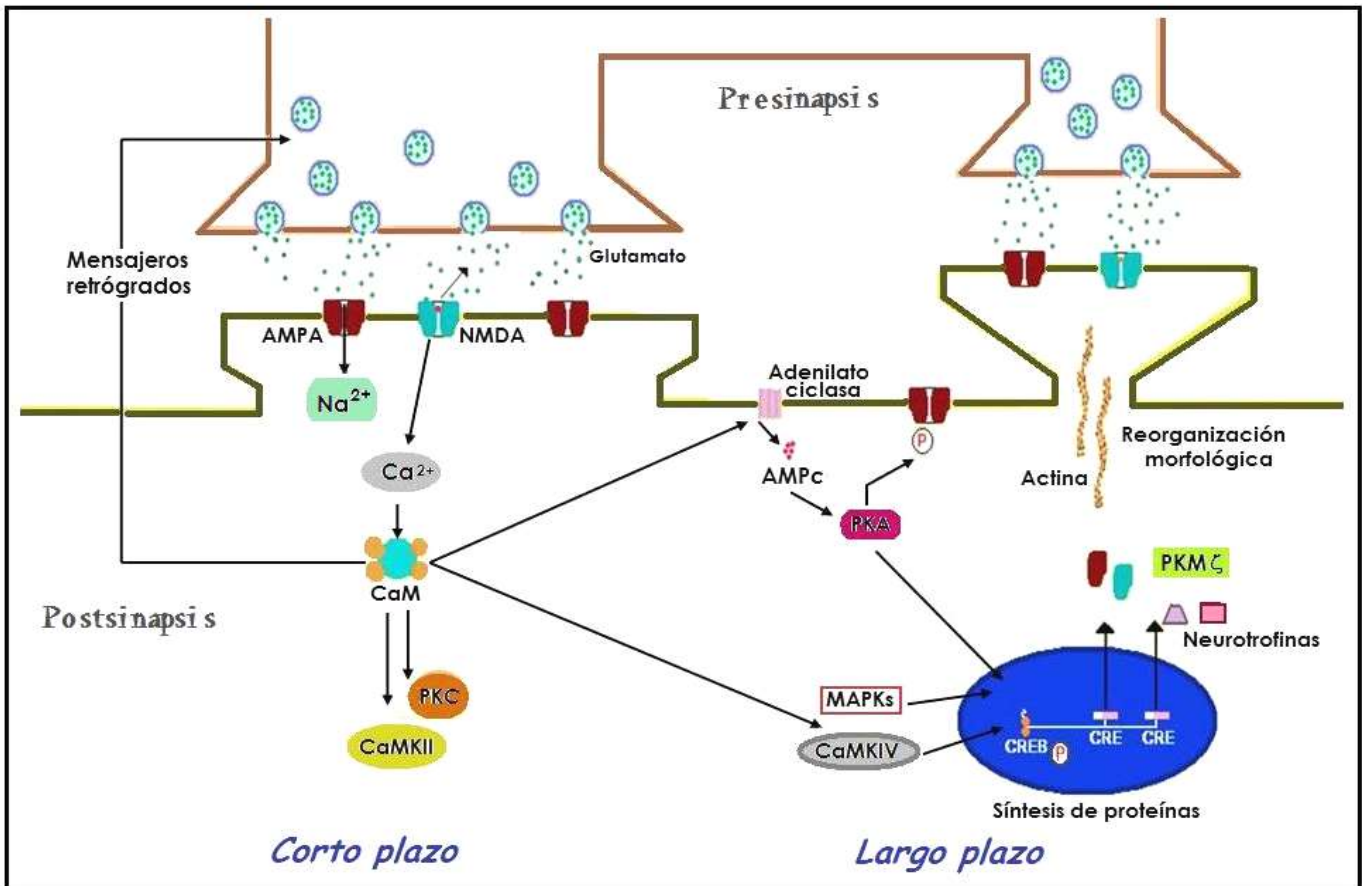


Figura 4. Mecanismos moleculares que subyacen a la LTP dependiente de los receptores NMDA. Se distinguen dos fases: la fase de corto plazo o fase temprana de la LTP, que requiere de la activación de proteínas existentes que favorecen la comunicación sináptica haciéndola más eficiente y la fase tardía de la LTP en la cual, los elementos fundamentales son la síntesis proteica y la formación de nuevos contactos sinápticos. AMPA: receptor a glutamato ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico; NMDA: receptor a glutamato N-metil-D-aspartato; CaM: proteína calcio calmodulina; PKC: proteína cinasa dependiente de calcio; CaMKII: proteína calcio calmodulina cinasa II; AMPc: adenosín monofosfato cíclico; PKA: proteína cinasa dependiente de AMP cíclico; CaMKV: proteína calcio calmodulina cinasa IV; MAPKs: proteínas cinasas activadas por mitógenos; PKM ζ : proteína cinasa M ζ ; CREB: factor de transcripción (proteína de unión al elemento responsivo de AMP cíclico); CRE: elementos responsivos al AMP cíclico; P: forma fosforilada de la proteína (Modificado de Huang et al., 1996)

La importancia de los factores neurotróficos en la LTP se ha mostrado en estudios recientes. Por ejemplo, se ha observado que la expresión de los genes que codifican para los

factores de crecimiento BDNF, NGF y NT-3 aumenta tras la inducción de la LTP (Bramham et al. 1996; Morimoto et al. 1998). El aumento de la transcripción de genes que codifican para factores de crecimiento, así como de moléculas de adhesión celular podrían constituir la conexión entre el incremento en la eficacia sináptica y las modificaciones estructurales de los sitios sinápticos que se han observado tras la inducción de LTP (De Roo et al., 2008). Otra molécula con injerencia en el mantenimiento de la plasticidad sináptica por tiempos prolongados es la PKM ζ , una isoforma de la proteína cinasa C (PKC). Pastalkova y cols. (2006), descubrieron que tras inhibir a la PKM ζ , la LTP mantenida por varias horas se bloqueaba, aunado a la pérdida total de la memoria espacial que ya había sido establecida previamente. Sin embargo, aunque existen varias evidencias que describen el papel de papel de ésta proteína en el mantenimiento de la LTP y la memoria (Hrabetova y Sacktor, 1996; Yao et al., 2008; Sacktor, 2012), también existen evidencias que muestran que el papel de PKM ζ como una base molecular del mantenimiento de los proceso plásticos no es totalmente convincente (Wu-Zhang et al., 2012; Sanhueza y Lisman, 2013; Volk et al., 2013).

3.2.3. Mecanismos moleculares de la LTP en las fibras musgosas

Los eventos moleculares que subyacen a la LTP en la vía que va del GD al área CA3 no han sido clarificados por completo. Sin embargo, en los últimos años ha habido importantes avances en la descripción de éstos (Henze et al., 2000; Malenka y Bear, 2004; Nicoll y Schmitz, 2005). Se ha observado que el incremento en la probabilidad de liberación del neurotransmisor glutamato, es esencial para la inducción de LTP en esta vía de comunicación. Para que el incremento en la liberación de neurotransmisor se lleve a cabo, deben ocurrir mecanismos que incluyen la entrada de calcio por canales de calcio dependientes de voltaje, dando lugar a la activación de la adenilato ciclasa (AC) que produce AMPc, el cual permite la activación de la proteína cinasa A (PKA). Se ha observado que en la LTP en esta vía de comunicación, la activación de la PKA juega un papel esencial modulando la maquinaria de liberación presináptica, permitiendo la unión de la proteína RIM1 α en la zona activa a la proteína vesicular Rab3A (figura 5) (Nicoll y Schmitz, 2005). La LTP de esta vía, también puede depender de la activación de los receptores metabotrópicos mGlu5, de proteínas G como Src y de la liberación postsináptica de calcio intracelular (Thomson et al., 2005). Por otra

parte, en 2008, dos estudios independientes mostraron que la plasticidad de la vía de las fibras musgosas descrita ampliamente como presináptica, presenta una nueva forma de LTP postsináptica inducida y mediada por las corrientes de los receptores NMDA preponderantemente, los cuales se ubican en los sitios pre y post sinápticos de esta sinapsis (Berg et al., 2013); esta forma de LTP fue observada tras distintas frecuencias de estimulación, 24 estímulos de 25Hz (Kwon y Castillo, 2008) ó 6 trenes de 6 estímulos de 50Hz (Rebola et al., 2008).

Se ha observado que la estimulación de alta frecuencia producida por 3 trenes de 100Hz/1s (estimulación utilizada en el presente estudio), produce incrementos en las concentraciones de calcio intracelular en la postsinapsis (Henze et al., 2000). Esta elevación en las concentraciones de calcio puede producirse por tres fuentes distintas. La primera, por la activación de los receptores a glutamato tipo AMPA y kainato que permiten la entrada de iones de calcio; la segunda, por la liberación de calcio de los reservorios intracelulares, a través de la activación de los receptores metabotrópicos de glutamato y; la tercera, por medio de la activación de canales de calcio dependientes de voltaje localizados en la postsinapsis (figura 5) (Henze et al., 2000).

Dentro de los mecanismos postsinápticos que inducen la LTP, se ha reportado que los incrementos en las concentraciones de calcio intracelular, se producen principalmente por la activación de los receptores a glutamato de tipo AMPA y kainato, así como por la activación de canales de calcio dependientes de voltaje. El zinc puede modular la plasticidad sináptica de esta vía; por ejemplo, quelantes de zinc, así como una dieta crónica deficiente de este metal pueden inhibir la inducción de la LTP. La entrada de zinc del espacio extracelular hacia la neurona postsináptica puede darse a través de los receptores AMPA o kainato permeables a calcio y por los canales de calcio dependientes de voltaje (Lu et al., 2000; Li et al., 2001) y generar LTP en esta vía (Pan et al., 2011). El blanco postsináptico aún no se conoce, pero como anteriormente se mencionó el zinc puede activar a los receptores de tirosina cinasa TrkB incrementando la actividad de la familia de cinasas Src por un mecanismo independiente al de las neurotrofinas (Huang et al., 2008).

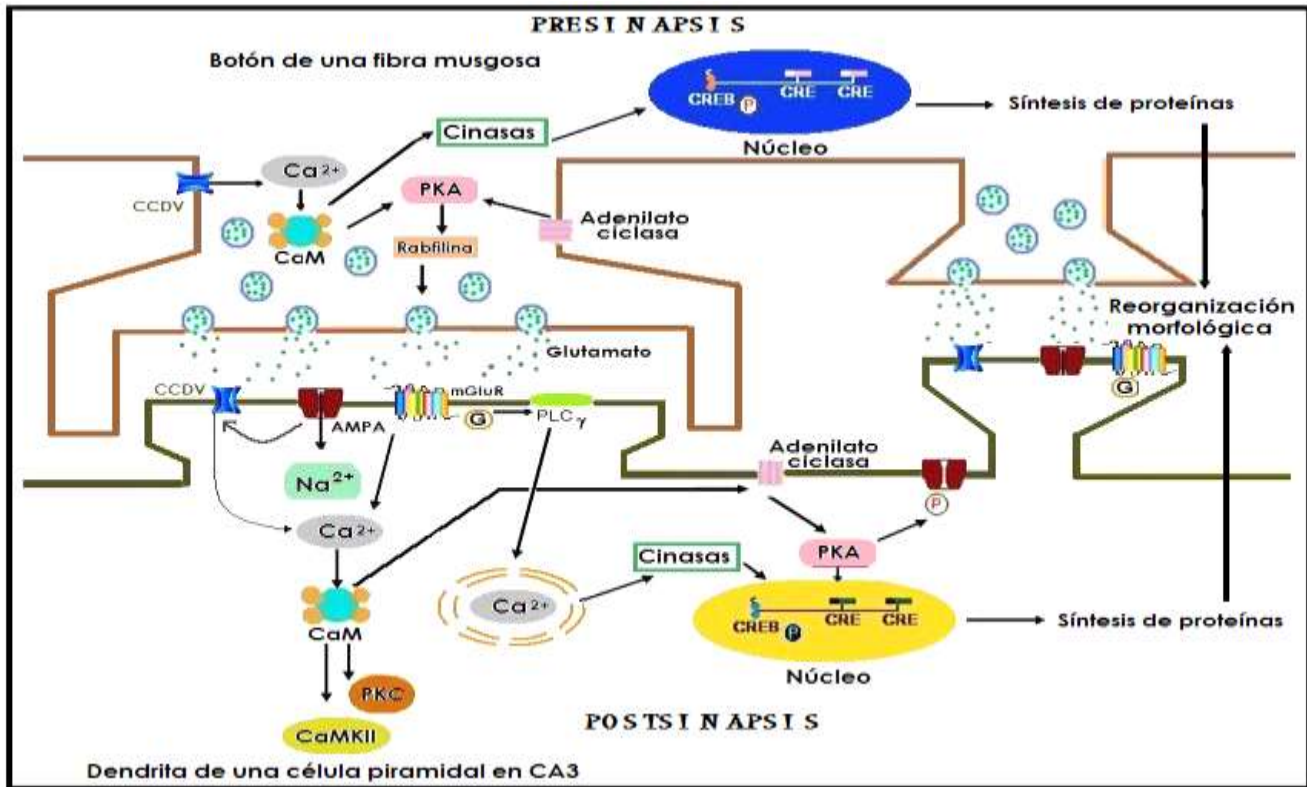


Figura 5. Mecanismos moleculares que subyacen a la LTP en la vía que va del giro dentado al área CA3. Entre los mecanismos descritos para la LTP de la vía GD-CA3, destacan la participación de la entrada de calcio a través de sus canales dependientes de voltaje (CCDV) en la presinapsis, lo que permite el incremento en la probabilidad de liberación de glutamato por medio de la activación de la adenilato ciclasa que produce AMPc, el cual activa a PKA. Ésta proteína modula la maquinaria de liberación presináptica, permitiendo la unión de la proteína de la membrana reguladora de la exocitosis (RIM1 α) en la zona activa, a la proteína vesicular rabifilina (Rab3A). En la postsinapsis, el incremento de calcio se da a través de los CCDV, de los receptores a kainato y de la liberación de calcio intracelular activada mediante la modulación de los receptores metabotrópicos a glutamato mGluR. AMPA: receptor a glutamato ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico; CaM: proteína calcio calmodulina; PLC γ : fosfolipasa C γ ; PKC: proteína cinasa dependiente de calcio; CaMKII: proteína calcio calmodulina cinasa II; PKA: proteína cinasa dependiente de AMP cíclico; CREB: factor de transcripción (proteína de unión al elemento responsivo de AMP cíclico); CRE: elementos responsivos al AMP cíclico; P: forma fosforilada de la proteína (Modificado de Henze et al., 2000 y de Nicoll y Schmitz, 2005).

3.3. Plasticidad sináptica estructural

La plasticidad sináptica ha sido definida como los cambios en las propiedades funcionales de la sinapsis como resultado de su uso. En este sentido, en 1896, Santiago Ramón y Cajal (citado por DeFelipe, 2006), propuso que la información se almacena en nuestro cerebro por medio de cambios en la fortaleza de la transmisión sináptica dependientes de la actividad, que pueden traducirse en modificaciones morfológicas del sistema. Actualmente, sabemos que los cambios de largo plazo en la eficiencia sináptica tales como la LTP resultan en modificaciones morfológicas de la sinapsis incluso en etapas adultas (figura 6).

Hasta el momento se han observado modificaciones estructurales que van desde un aumento en las densidades postsinápticas, engrosamiento de las espinas dendríticas, hasta la generación de nuevas espinas y elongación de prolongaciones axónicas como consecuencia de la actividad relacionada con el aprendizaje y la memoria (Lamprecht y LeDoux, 2004). Muestra de ello son las investigaciones en las que a través de la utilización de microscopía confocal multifotónica se ha revelado la presencia de nuevas espinas en las dendritas de las neuronas del área CA1 hipocampal tras la inducción de LTP. Estas investigaciones revelan también que el crecimiento de estas espinas es dependiente de la actividad de los receptores NMDA (Engert y Bonhoeffer, 1999; Maletic-Savatic et al., 1999).

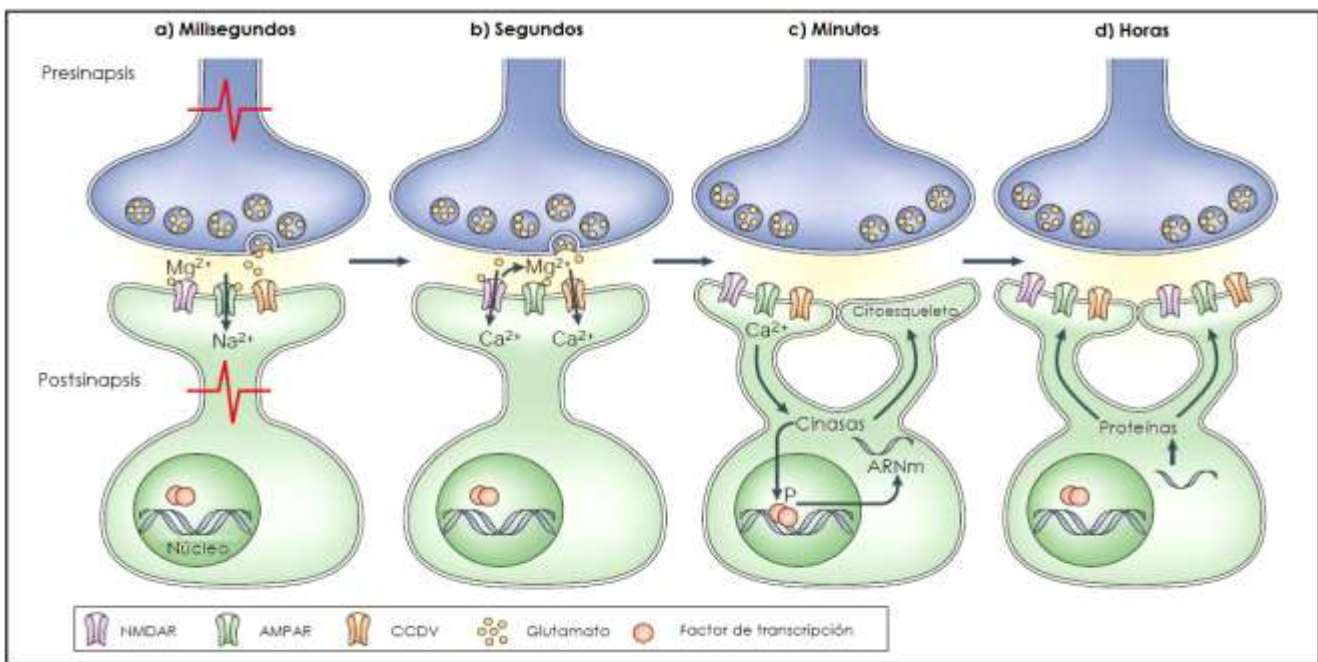


Figura 6. Mecanismos moleculares involucrados en la iniciación y mantenimiento de la plasticidad sináptica. a) La liberación de glutamato dependiente de la actividad en la presinapsis lleva a la activación de los receptores AMPA y la subsecuente despolarización de la membrana postsináptica. b) La depolarización de la neurona postsináptica provoca que el ion de magnesio que bloqueaba al receptor NMDA se libere y entre calcio a través de éste receptor. La depolarización también activa a los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV), que son otra fuente para la entrada de calcio. c) El calcio activa a proteínas que a su vez activarán a proteínas cinasas, las que modulan la actividad de sus sustratos, los cuales contribuyen a cambios locales en las sinapsis, así como en la alteración morfológica que se da mediante la regulación del citoesqueleto o inducen la transcripción de ARNm, ya que dichos sustratos pueden activar a factores de transcripción. d) El ARNm es traducido en proteínas que contribuyen en la estabilización de los cambios sinápticos (Modificado de Lamprecht y LeDoux, 2004).

Las modificaciones estructurales presinápticas han sido menos descritas. Las conexiones que establecen las fibras musgosas han permitido el estudio de este tipo de modificaciones, ya que dichas fibras tienen características especiales que las hacen útiles para la evaluación de

la plasticidad estructural en el sistema nervioso central (SNC) y su relación con los procesos de aprendizaje y memoria por tres razones fundamentales:

1) La anatomía laminar del hipocampo (descrita anteriormente), lo cual permite que cualquier subregión pueda ser marcada de forma aislada y sea fácilmente observable dado el ordenamiento delimitado que existe entre las diferentes subregiones o grupos celulares (Fernández-Espejo, 1996).

2) Los botones sinápticos terminales de las FM son grandes y numerosos, fácilmente visibles con la utilización de la técnica argéntica de Timm, que aprovecha las grandes cantidades de zinc que contienen. Además, se les identifica fácilmente al microscopio electrónico así como con técnicas de trazado fluorescente (Represa et al., 1994).

3) La susceptibilidad que tienen las FM frente a los cambios en la actividad a la que son sometidas en diversas preparaciones experimentales (Represa et al., 1994; Escobar et al. 1997; Ramirez-Amaya et al., 1999). Las fibras musgosas forman conexiones de manera primordial en la zona proximal de las dendritas de las células piramidales del área CA3 en el estrato lúcido, a las que se les denomina conexiones suprapiramidales. Sin embargo se ha observado que tras la inducción de la actividad epiléptica (Represa et al., 1994), el sobreentrenamiento de tareas espaciales (Ramirez-Amaya et al., 1999; Ramirez-Amaya et al., 2001; Holahan et al., 2006; Rekart et al., 2007) y tras la estimulación eléctrica capaz de inducir LTP (Adams et al., 1997; Escobar et al., 1997), las fibras musgosas establecen sinapsis en las dendritas basales de las células piramidales del área CA3 en el estrato oriens, a las que se les denomina conexiones infrapiramidales (Figura 7).

Por estas razones, se han estudiado intensamente las condiciones en las que las fibras musgosas cambian sus patrones sinápticos con el propósito de elucidar los mecanismos desde el nivel celular hasta el anatómico, que son utilizados para la modificación de la conformación sináptica. Este tipo de investigaciones tienen el objetivo final de lograr describir adecuadamente cómo el SN almacena información por medio de la modificación de sus conexiones, no solamente de tipo espacial y localizada en el hipocampo, sino cualquier clase de información en cualquier parte del cerebro.

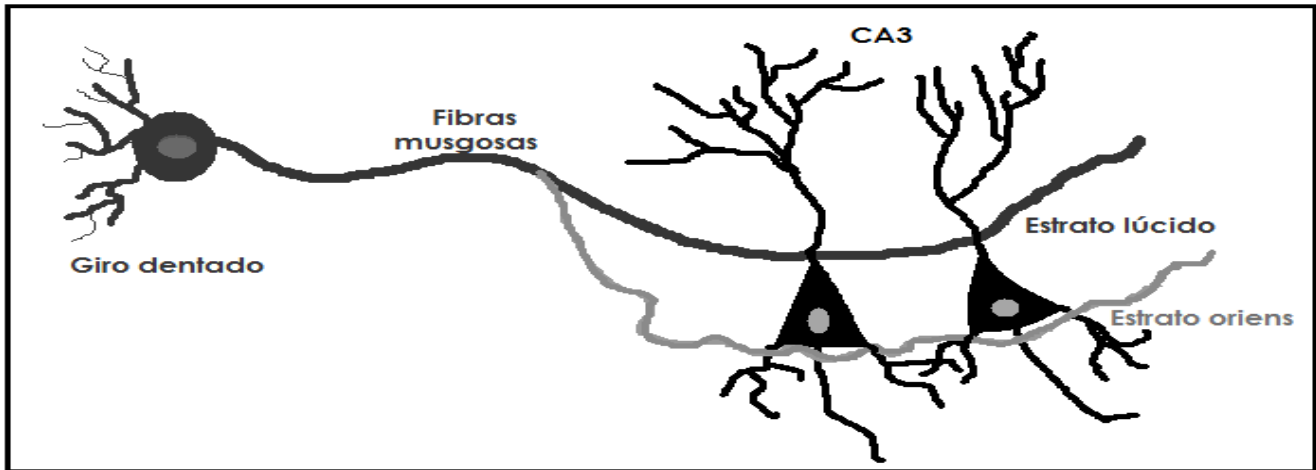


Figura 7. Posible ruta que siguen los axones que dan origen a los botones de las fibras musgosas en el estrato oriens del hipocampo. Axón superior: área correspondiente a las conexiones en el estrato lúcido. Axón inferior: área correspondiente a conexiones que se forman en el estrato oriens del área CA3 (Modificado de Ben-Ari y Represa, 1990).

3.4. Plasticidad homeostática

Conforme nuestro sistema nervioso se va desarrollando, numerosas experiencias van modificando sus conexiones a lo largo de nuestra vida. Es por ello congruente pensar que estas modificaciones plásticas necesiten de un mecanismo regulador que les permita mantenerse en un estado ideal (manteniendo una homeostasis) para poder seguir almacenando información. En este contexto, investigaciones recientes han reportado que las neuronas inician una serie de mecanismos homeostáticos con el fin de mantener los niveles de eficiencia sináptica en un rango determinado, resistiéndose de este modo a modificaciones abruptas que pueden causar daño o muerte neuronal; por tanto, a este tipo de cambios en las propiedades nerviosas se les ha dado el nombre de plasticidad homeostática (Nelson y Turrigiano, 2008). Este tipo de modificaciones se presenta de distintas formas dependiendo del tipo de plasticidad sináptica inducida y la vía que sea sujeto de estudio. Dos de los mecanismos principales de la plasticidad homeostática son la metaplasticidad y el escalamiento sináptico.

3.4.1. La metaplasticidad y el escalamiento sináptico

Hoy en día existen evidencias que muestran que la historia de la actividad de una neurona o vía de conexión puede modificar la manera en que ésta presenta subsecuente plasticidad sináptica (Abraham, 2008). En este sentido, se han observado cambios subsecuentes al inducir LTP en una misma vía; estos cambios incluyen una inhibición de la LTP y una facilitación de la depresión de largo plazo (LTD) (Malenka, 1991; Huang et al., 1992). A este fenómeno se le conoce como metaplasticidad y se define como el cambio en la habilidad para inducir subsecuente plasticidad sináptica en una vía. Este tipo de modificaciones se presentan incluso cuando la actividad previa no fue suficiente para producir modificaciones observables en la eficiencia sináptica (figura 8a).

En 1982 Bienestock, Cooper y Munro propusieron la existencia de un umbral de activación postsináptica, es decir, una vía es potenciada cuando la activación postsináptica excede un valor crítico llamado umbral de modificación o θ_m , mientras que una vía es depotenciada cuando la activación postsináptica es mayor que cero pero menor que el valor θ_m (figura 8b); a esta teoría también se le denominó BCM (por las iniciales de los autores). Es importante señalar que este umbral no es fijo (Bienestock et al., 1982). La frecuencia de estimulación, es directamente proporcional a la activación de la postsinapsis, esto es, que a frecuencias más altas se da una mayor activación de la postsinapsis, mientras que ha frecuencias más bajas la activación es menor, por lo cual el nivel de potenciación o depotenciación depende de la frecuencia de estimulación (Bear, 1996). Esta relación se explica mediante el hecho de que la cantidad de calcio que ingresa a la neurona es dependiente de la frecuencia mediante la cual se le estimula (Jedlicka, 2002; Bear, 2003). De hecho se ha reportado que cuando se aplica estimulación eléctrica que induce LTP, pero se inhibe parcialmente la entrada de calcio a la célula, se presenta LTD en lugar de LTP (Taniike et al., 2008). La modificación del umbral es temporal y se considera un mecanismo homeostático que protege a las neuronas por ejemplo, de estímulos de muy alta intensidad o frecuencias que pudieran provocar excitotoxicidad (Bear, 2003). Durante las tres décadas posteriores al origen de la teoría BCM, numerosas investigaciones se han dirigido a dilucidar algunas propiedades fundamentales de la plasticidad sináptica y han generado una

comprensión más clara de la relación entre la estructura matemática de la teoría y los mecanismos moleculares que subyacen al aprendizaje y a la memoria (Cooper y Bear, 2012).

El hecho de que existan cambios metaplásticos durante tareas de aprendizaje sugiere que éstos cambios no solo tienen un papel neuroprotector, sino modulador del almacenamiento de información. Ejemplo de esto son los estudios realizados por Rioult-Pedotti y cols. (2000), quienes entrenaron a un grupo de ratas en el aprendizaje de una tarea motora que consiste en extraer comida de un pequeño agujero con una pata. Posteriormente, se indujo LTP en el hemisferio entrenado y se observó que dicha tarea reducía la magnitud de la LTP y aumentaba la magnitud de la LTD, en comparación con el hemisferio contralateral el cual se utilizó como control. Este estudio muestra que la conducta produce cambios en las propiedades neuronales que modifican el umbral para la inducción de subsecuente plasticidad sináptica (Rioult-Pedotti et al., 2000). Los cambios metaplásticos inducidos por la conducta también se han encontrado en la corteza piriforme debido a tareas de discriminación olfativa (Quinlan et al., 2004), así como en la corteza visual en respuesta a la estimulación visual (Philpot et al., 2007) y en la amígdala lateral debido al condicionamiento al miedo (Schroeder y Shinnick-Gallagher, 2005).

En seres humanos se han realizado investigaciones que relacionan al aprendizaje con los cambios en la excitabilidad de las neuronas. En una tarea de aprendizaje se entrenó a un grupo de sujetos a incrementar la velocidad en el movimiento de su dedo pulgar, este aprendizaje está asociado con un cambio rápido en la excitabilidad de la corteza motora primaria y es inhibido por la previa estimulación magnética transcraneal en esta zona de la corteza, similar a lo encontrado por Rioult-Pedotti et al., 2000 (Muellbacher et al., 2001). Estudios realizados en la vía de la amígdala basolateral a la corteza insular muestran que tras la inducción de LTP en la corteza insular, hay un incremento en la retención del condicionamiento aversivo a los sabores (CAS) (Escobar et al., 1998).

Recientemente, se han comenzado a estudiar los mecanismos moleculares relacionados con estos tipos de plasticidad y se ha encontrado que existen varios mecanismos encargados de comandar una regulación en las células excitadas. Por un lado, la modulación de la actividad de proteínas cinasas y fosfatasa puede modificar el umbral para la inducción de plasticidad sináptica. Por ejemplo, la entrada de calcio provoca la autofosforilación de la CaMKII, lo cual, limita la actividad de la proteína, evitando que realice acciones que se

encuentran relacionadas con la inducción de la LTP (Jedlicka, 2002; Bear, 2003; Zhang et al., 2005). Por otro lado, la calcineurina, una proteína fosfatasa relacionada con la inducción de la LTD, se activa durante la metaplasticidad, promoviendo cambios que favorecen a la inducción de la LTD y desfavorecen la inducción de la LTP, entre los que se encuentra la regulación negativa de la PKA (Mansuy, 2003).

Se han reportado investigaciones en donde la privación de estímulos visuales incrementa la posibilidad de inducir LTP en la corteza visual primaria que está acompañado de un aumento en la expresión de las subunidades NR2B de los receptores NMDA, mientras que la estimulación visual aumenta la capacidad de inducir LTD por medio de la expresión de las subunidades NR2A en esta vía (Yashiro y Philpot, 2008) (figura 8c). Esto puede deberse a que la subunidad NR2A tiene una cinética más rápida; es decir, en períodos de tiempo iguales, los canales NMDA que contienen la subunidad NR2A se abren y se cierran un mayor número de veces que cuando estos canales contienen la subunidad NR2B (Erreger et al., 2005). Este efecto produce que los receptores NMDA que contienen subunidades NR2A, presenten una mayor resolución (es decir, respondan más efectivamente) ante los estímulos de alta frecuencia, como los que inducen LTP, mientras que los que contienen la subunidad NR2B tendrán una mayor resolución ante estímulos de baja frecuencia, como los que inducen LTD (Quinlan et al., 2004; Pérez-Otaño y Ehlers, 2005). Se ha reportado que la activación de receptores mGluR puede reducir la hiperpolarización de la membrana después del potencial de acción, modificando la posibilidad de inducir LTP (Cohen et al., 1999).

Otro mecanismo desarrollado por el SN para preservar su homeostasis es el escalamiento sináptico, el cual mantiene en un nivel estable la excitabilidad neuronal mediante un incremento progresivo de la eficiencia sináptica como respuesta a la inhibición prolongada de actividad y un decremento progresivo de la eficiencia sináptica como respuesta a la excitación neuronal crónica.

En 1998, Turrigiano y colaboradores reportaron que el bloqueo durante 48hrs de los receptores al ácido γ -aminobutírico (GABA) producía una disminución de las corrientes postsinápticas excitadoras miniatura (CPSEm), compensando el aumento de actividad. De manera similar, cuando se presenta una inhibición crónica de los canales de sodio con tetrodotoxina, se genera un incremento de las CPSEm, compensando la disminución de actividad (figura 9) (Turrigiano et al., 1998; Turrigiano y Nelson, 2004).

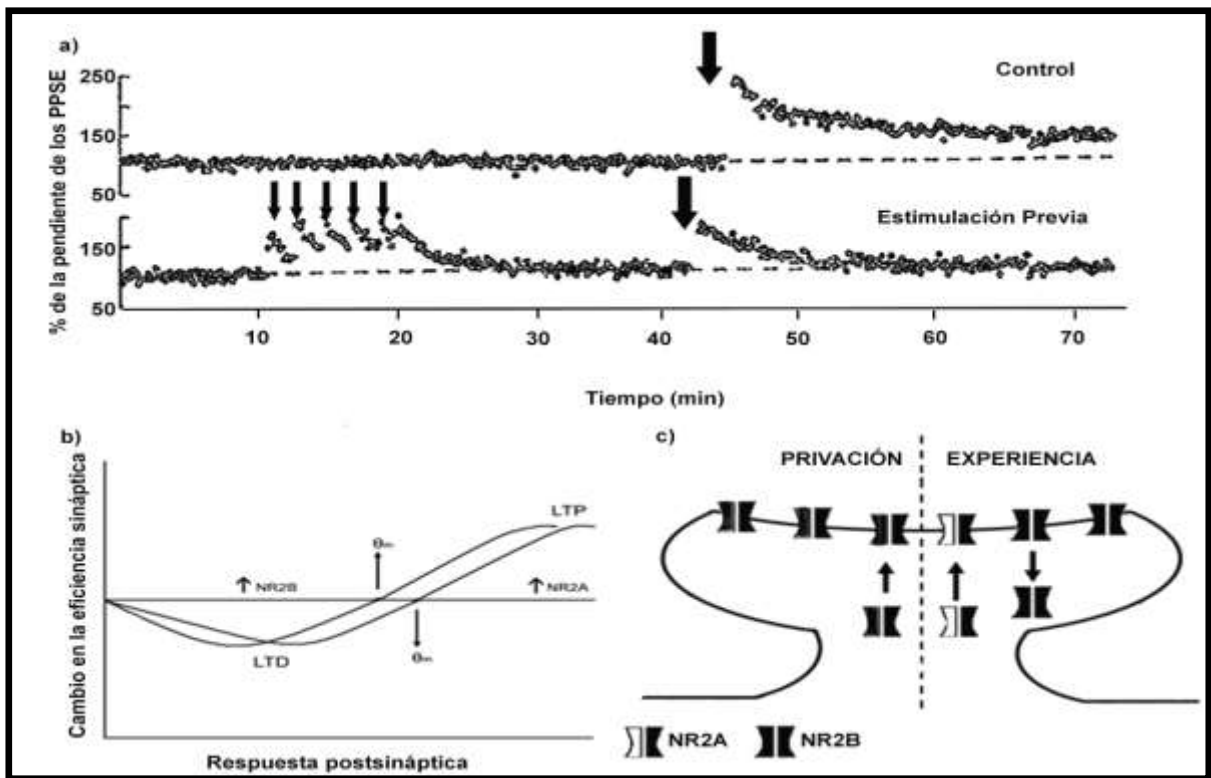


Figura 8. Metaplasticidad. a) La estimulación eléctrica (5 pulsos de 10Hz que no generan LTP; marcado con flechas pequeñas) previa a una estimulación de alta frecuencia (flecha grande) modifica la posibilidad de inducir una subsiguiente potenciación (panel inferior) presente en los animales control (panel superior) (Modificado de Huang, Colino et al. 1992); b) Modelo teórico de metaplasticidad en donde se modifica el umbral θ_m en respuesta a la actividad; c) Modelo de los mecanismos de la metaplasticidad en la corteza visual primaria, en donde la privación de estímulos visuales incrementa la posibilidad de inducir LTP por medio de un aumento en la expresión de las subunidades NR2B de los receptores NMDA, mientras que la estimulación visual (experiencia) aumenta la capacidad de inducir LTD por medio de la expresión de las subunidades NR2A en esta vía (Modificado de Philpot et al., 2007).

El escalamiento sináptico se ha observado en cultivos neocorticales, hipocampales, de médula espinal y en el núcleo accumbens, así como en preparaciones *in vivo* (Abbott y Nelson, 2000) y muestra que las células de SN tienen la capacidad de integrar los estímulos recibidos para ajustar la eficiencia sináptica a través de la modulación del paso de corriente a través de los canales iónicos (Turrigiano y Nelson, 2000).

El estudio de los mecanismos de plasticidad homeostática permite comprender cómo el SN modula su estabilidad ante el gran número de estímulos que procesa continuamente y sobre todo nos acerca a entender cómo se modula la información adquirida para preservar los trazos mnémicos.

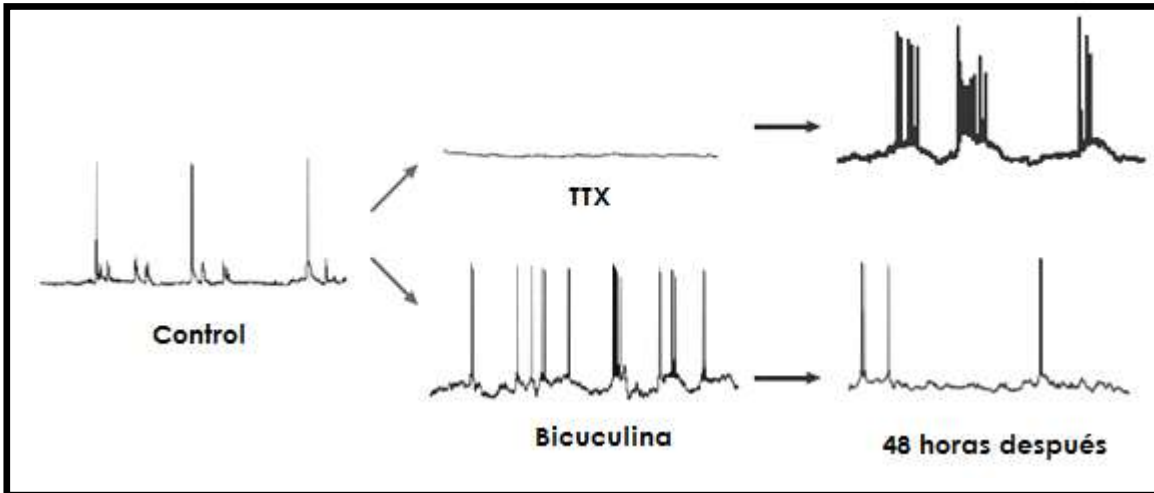


Figura 9. Escalamiento sináptico. El bloqueo crónico de la actividad producido por la aplicación de tetrodotoxina (TTX) incrementa progresivamente las corrientes postsinápticas excitadoras miniatura (CPSEm) y el incremento prolongado de la actividad producido por la aplicación de bicuculina disminuye progresivamente las corrientes postsinápticas excitadoras miniatura (CPSEm) (Modificado de Turrigiano y Nelson, 2004).

3.5. Las neurotrofinas

La diversidad celular en el SN se origina a partir de la acción concertada de los procesos de proliferación celular, diferenciación, crecimiento, migración, supervivencia y formación de sinapsis. Entre los mensajeros involucrados en la comunicación neuronal que dan origen a estos procesos se encuentran los factores neurotróficos, que son proteínas que controlan la supervivencia, el crecimiento y las capacidades funcionales de poblaciones específicas de neuronas (Escobar, 1994; Gómez-Palacio-Schjetnan y Escobar, 2007). Los factores neurotróficos o neurotrofinas constituyen una familia conformada por el factor de crecimiento neuronal (NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), la neurotrofina-3 (NT3), la neurotrofina-4/5 (NT-4/5), la neurotrofina-6 (NT-6) y la neurotrofina-7 (NT-7), las dos últimas identificadas recientemente (Nilsson et al., 1998; Götz et al., 2002).

Inicialmente, las neurotrofinas son sintetizadas como proteínas precursoras (proneurotrofinas) de forma similar a los neuropéptidos y posteriormente se procesan por diversas enzimas que producen a la proteína madura una vez que han sido liberadas al medio extracelular (Lessmann et al., 2003). Cada una de estas proteínas en su forma madura forma un complejo con una proteína gemela (dímero), permitiendo la activación de sus receptores específicos (Chao, 2003). Se ha descrito que existe liberación postsináptica de neurotrofinas como NT-3 y BDNF, la cual es modulada por la CaMKII (Kolarow et al., 2007).

Las neurotrofinas actúan por medio de dos tipos de receptores, los de tirosina cinasa denominados Trk (de alta afinidad con las neurotrofinas maduras) y los p75 (de baja afinidad a las proteínas maduras, pero alta a las inmaduras o precursoras). Las proneurotrofinas actúan como señalizadores moleculares a través de su interacción con el receptor p75, ejerciendo efectos biológicos opuestos a los evocados por las neurotrofinas maduras. De esta manera, la segmentación proteolítica de las proneurotrofinas representa un mecanismo de control que direcciona las acciones de las neurotrofinas (Lu et al., 2005). Los diferentes tipos de receptores Trk identificados hasta el momento, son activados principalmente por uno o varios miembros de esta familia de proteínas. Así, el TrkA actúa como receptor del NGF, el TrkB principalmente para el BDNF y la NT-4/5, y el TrkC para la NT-3 (Chao, 2003).

Existen isoformas de los receptores Trk denominados receptores truncados, que carecen de los residuos de tirosina cinasa. Los receptores truncados son capaces de unirse con sus correspondientes ligandos e incluso se internalizan, pero son incapaces de iniciar los eventos de fosforilación requeridos para la transducción de señales. De esta manera la distribución y concentración membranal de los receptores truncados podría potencialmente modular la actividad de las neurotrofinas restringiendo la disponibilidad de estos factores para interactuar con los receptores completos (Rose et al., 2003).

Una característica interesante de las acciones de las neurotrofinas, radica en su capacidad para autorregular su producción así como la de otras proteínas miembros de esta familia. Un ejemplo en este sentido lo constituye el estudio realizado por Patz y Wahle, 2004, en el que se observó que la administración de BDNF origina incrementos en la expresión de BDNF, NGF y NT-3, en tanto que disminuye la expresión de NT-4, en cultivos de neuronas corticales (Patz y Wahle, 2004).

Una vez que las neurotrofinas se ligan a su receptor Trk pueden activar tres cascadas metabólicas que incluyen la vía de MAPKs (proteínas cinasas activadas por mitógenos), la vía de los fosfoinosítidos (PI3K-Akt) y la vía de la PLC γ ; estas vías de señalización tienen como punto final la activación de síntesis proteica y las consecuentes modificaciones en la comunicación y la morfología de las sinapsis (figura 10) (Patapoutian y Reichardt 2001; Bergado et al., 2003).

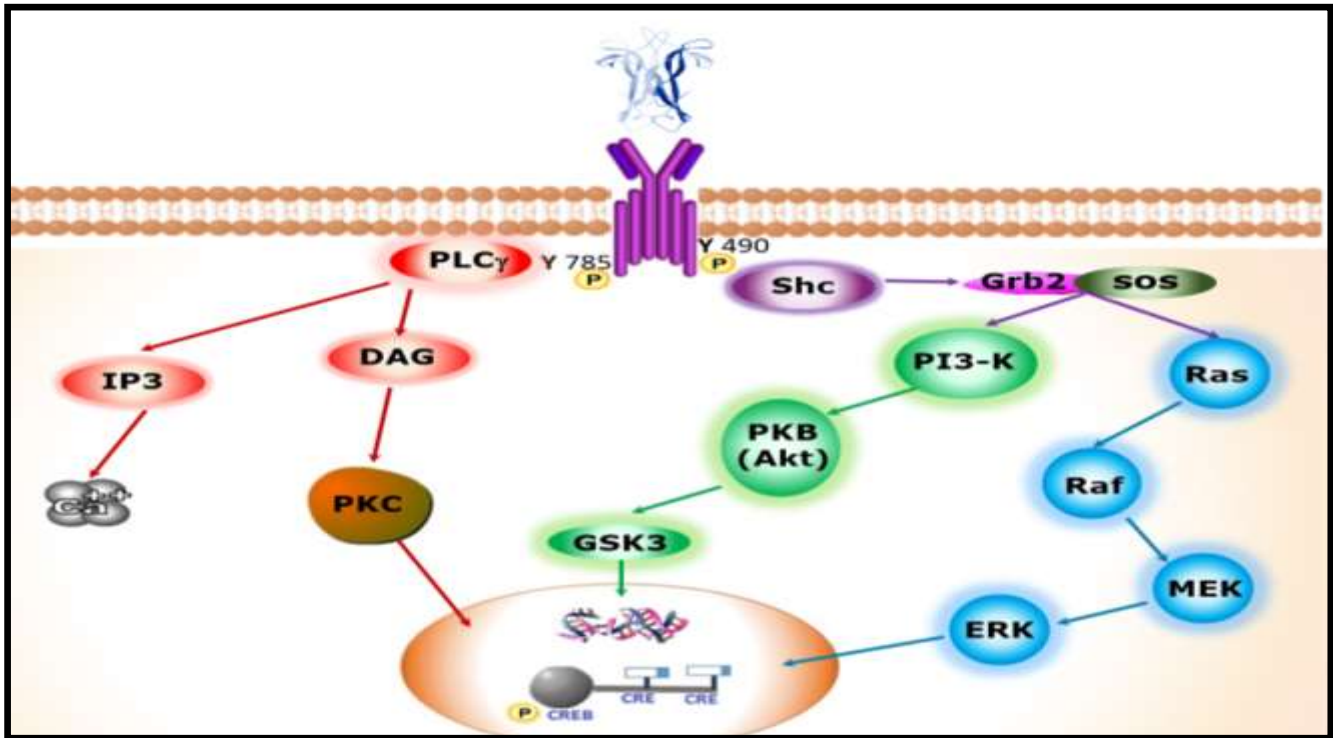


Figura 10. Vías de señalización activadas por las neurotrofinas. Los receptores Trk controlan tres vías de señalización. 1) La fosforilación de Ras inicia la activación de la vía de MAP cinasas, lo que promueve procesos como la diferenciación y el crecimiento neuronal. 2) La activación de PI-3K iniciada por Ras que fosforila a PKB y ésta a GSK3 promoviendo la supervivencia y el crecimiento neuronal. 3) La activación de la vía PLC γ se inicia por la fosforilación de un residuo de tirosina⁷⁸⁵ y tiene como resultado el incremento de calcio intracelular que activa a proteínas cinasas (como PKC y CaMK) relacionadas con la plasticidad sináptica (Modificado de Reichardt, 2006).

3.5.1. La Neurotrofina-3

La NT-3 fue identificada en 1990 por varios laboratorios simultáneamente (Ernfors et al., 1990; Hohn et al., 1990; Maisonpierre et al., 1990a; Rosenthal et al., 1990), siendo la primera neurotrofina identificada sin necesidad de purificar a la proteína nativa previamente. Fue llamada HDNF (Hippocampal derived neurotrophic factor) (Ernfors et al., 1990) y NGF-2 (Nerve growth factor-2) (Kaisho et al., 1990). Esta neurotrofina presenta una homología elevada estructural con NGF y BDNF (Thoenen, 1995), es un polipéptido con un peso molecular de 27.2 kDa en su forma dimérica (figura 11), cuya forma madura consta de 119 aminoácidos y se genera a partir de su precursor pro-NT-3, el cual consta de 258 aminoácidos (Maisonpierre et al., 1990a). Ya en su forma madura tiene una identidad en su secuencia de aminoácidos del 57% y 58% con el NGF y BDNF, respectivamente, teniendo una homología aproximada del 48% entre estas tres proteínas. La NT-3 al igual que el NGF y BDNF

presentan seis residuos de cisteína altamente conservados (Maisonpierre et al., 1990b; Hallböök et al., 1993).

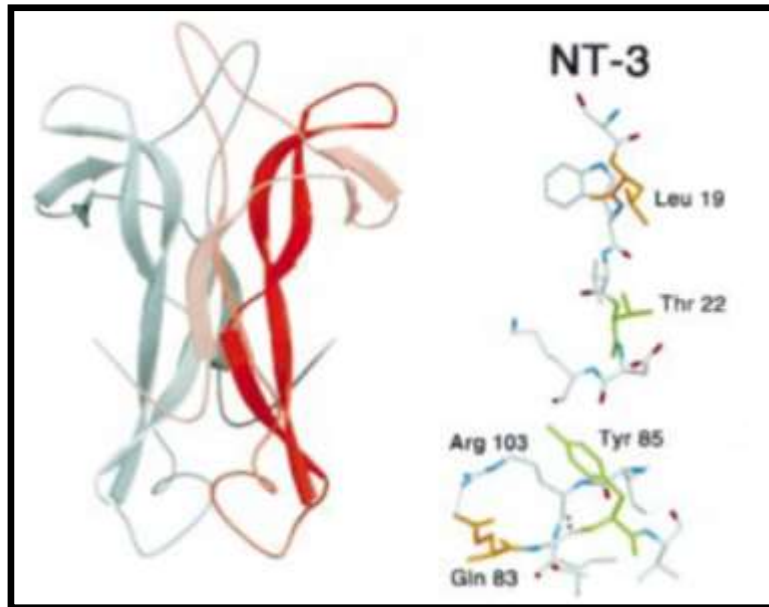


Figura 11. Estructura de la Neurotrofina-3. A la izquierda se muestra la estructura dimérica de la NT-3 obtenida mediante cristalografía de rayos-X. A la derecha se muestran los 4 residuos más importantes para la unión específica con su receptor TrkC: Leu 19, Thr 22, Tyr 85 y Gln 83 (Butte et al., 1998).

En el cerebro adulto la expresión de la NT-3 está ampliamente confinada al giro dentado (GD), donde se ha observado que puede modular la neurogénesis, el aprendizaje y el mantenimiento de la LTP (Shimazu et al., 2006). Asimismo, se ha reportado que la actividad neuronal elevada como la inducción de LTP incrementa la expresión de ARNm de NT-3 en el GD hipocampal, lo que sugiere que esta neurotrofina juega un rol en la plasticidad sináptica en el SNC (Bramham et al., 1996).

En poblaciones de células gliales se ha descrito que las monoaminas, a través de la activación de vías de segundos mensajeros, tienen un papel regulador en la síntesis de NT-3, incrementando los niveles basales de la concentración de la proteína (Mele et al., 2009). Además se observó en los oligodendrocitos que la presencia de NT-3 incrementa la expresión de los factores eIF4E y 4EBP1, que modulan la síntesis proteica y dicho incremento es dependiente de la activación de la vía de MAPK y PI3K (Coelho et al., 2009).

Las acciones de las neurotrofinas en un periodo corto (segundos) están asociadas con el fortalecimiento de las sinapsis preexistentes y en el largo plazo (horas o días), sus acciones involucran la formación de nuevos contactos sinápticos. Recientemente se han observado

efectos similares a los ejercidos por el BDNF con la NT-3, la cual facilita incrementos en la plasticidad sináptica reflejados en la LTP y los procesos de aprendizaje y memoria (Aranov et al., 2000; Je et al., 2005; Shimazu et al., 2006).

Desde el descubrimiento de esta proteína, se describió que podía tener un rol importante en el desarrollo del sistema nervioso, en particular contribuyendo a la formación de contactos sinápticos, debido a su alta presencia en los procesos de proliferación (Maisonpierre et al. 1990). Además el patrón de expresión de la NT-3 en el desarrollo del SNC tiene similitudes con el de la nestina, una proteína de los filamentos intermedios cuya expresión es característica de las células precursoras en regiones en neurogénesis (Lendahl et al., 1990). En este sentido, Miyashita y cols. (2009) reportaron que esta neurotrofina se relaciona con la formación de dendritas apicales de las células de la capa 2 de la corteza granular retrosplenial, un área límbica relacionada al aprendizaje espacial. Ratones mutantes para el gen que codifica para la NT-3 muestran déficits en la ejecución de una tarea espacial (laberinto de agua de Morris y un daño en el mantenimiento de la LTP en la sinapsis del patrón perforante lateral al giro dentado hipocampal, presentando también una disminución significativa en la neurogénesis adulta (Shimazu et al., 2006).

En cultivos de sinapsis neuromusculares de *Xenopus laevis* se ha descrito que la exposición aguda a BDNF y NT-3 potencia la transmisión sináptica, además el tratamiento en periodos prolongados con las mismas neurotrofinas produce cambios significativos en la plasticidad sináptica y la morfología presentando aumentos en la arborización y número de contactos sinápticos, así como un incremento en los niveles de proteínas relacionadas a la liberación del neurotransmisor (sinapsina y sinaptofisina); estos efectos son dependientes de la interacción de las neurotrofinas con sus receptores de tirosina cinasa (Lohof et al., 1993; Wang et al., 1995; Lu, 2004).

Se ha descrito que el pre-tratamiento con NT-3 regula los efectos del BDNF sobre la transmisión sináptica tanto en las sinapsis excitadoras como inhibitoras de cultivos hipocampales y se ha observado que el tratamiento con NT-3 puede modular los niveles de expresión del BDNF y el pro-BDNF en el hipocampo de rata (Gottmann y Lessmann, 2001; Ullal et al., 2007). Sin embargo, el grupo de Jacobi y colaboradores (2009) mostró recientemente en cultivos hipocampales que el tratamiento crónico con NT-3 o BDNF acelera

la maduración de las conexiones de una red neuronal e incrementa el número de contactos sinápticos excitadores sin modificar el número de conexiones inhibitoras.

Los mecanismos a través de los cuales la NT-3 lleva a cabo sus acciones no han sido del todo esclarecidos. En los cultivos de uniones neuromusculares se han descrito algunos rasgos característicos requeridos para que la NT-3 efectúe sus acciones sobre la plasticidad sináptica de corto y largo plazo, estos son: la endocitosis del complejo receptor (NT-3-TrkC), la activación del sustrato de PI3K (Akt o PKB) así como la síntesis de nuevas proteínas (Je et al. 2005). Aunque también se ha descrito que la NT-3 puede modular sus acciones sobre la estructura sináptica a través de la activación de la vía de las MAP cinasas y la eficiencia sináptica mediante la vía de CaMK IV y el factor de transcripción CREB (Figura 12), (Je et al., 2006).

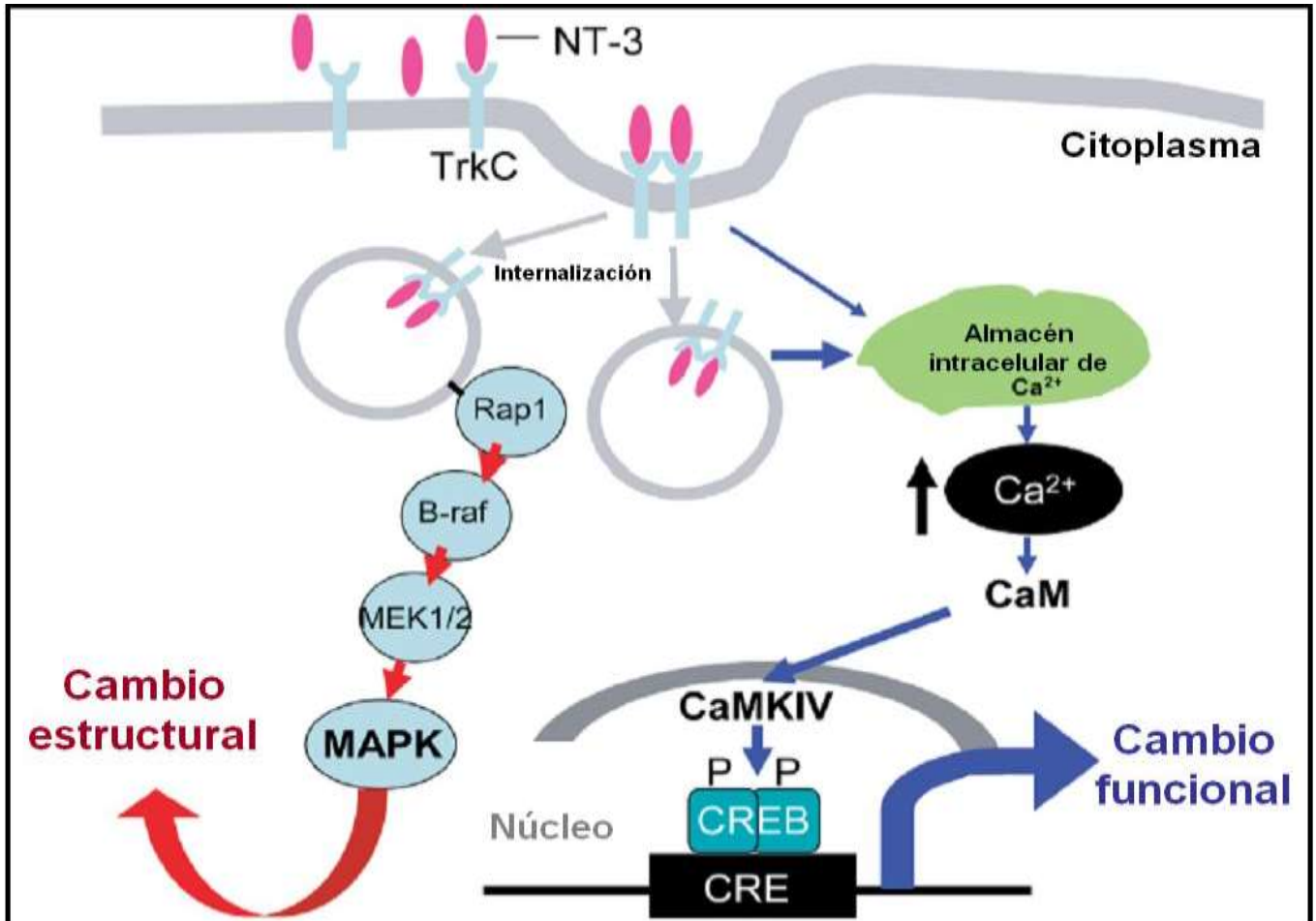


Figura. 12. Modelo propuesto para explicar los mecanismos celulares que subyacen a la modulación de la NT-3 en la estructura y funcionalidad sináptica (Modificado de Je et al., 2006).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El estudio de los mecanismos celulares que subyacen a los fenómenos de aprendizaje y memoria, brinda una concepción más clara de la génesis del comportamiento de los seres vivos. De manera que la conjunción del modelo de plasticidad sináptica representado por la LTP y la potencialidad de las neurotrofinas para fortalecer o modular la transmisión sináptica y las modificaciones estructurales derivadas de ésta, representa una valiosa herramienta para dilucidar los eventos celulares implicados en la adquisición y almacenamiento de información.

Un subsistema celular dentro del hipocampo que constituye un modelo ideal para el estudio de fenómenos plásticos tanto funcionales como morfológicos es el que constituyen las fibras musgosas del hipocampo. Estudios previos han mostrado reorganización morfológica de los axones de las fibras musgosas hacia el área CA3 hipocampal 7 días después de inducir LTP en este sistema (Adams et al., 1997; Escobar et al., 1997).

Recientemente, la NT-3 ha sido considerada como un importante modulador de la plasticidad sináptica. En este sentido, en cultivos de sinapsis neuromusculares, la exposición aguda de NT-3 rápidamente potencia la transmisión sináptica (Lohof et al., 1993). En el cerebro adulto la expresión de NT-3 está ampliamente confinada al hipocampo, en particular al giro dentado (Lauterborn et al., 1994; Zhang et al., 2007), por lo que el estudio de la participación de esta neurotrofina en la plasticidad sináptica de esta estructura es fundamental. En cultivos hipocampales, se ha demostrado que la administración de NT-3 induce un incremento robusto y de largo plazo en la transmisión sináptica de la vía de las colaterales de Schaffer (Kang y Schuman, 1995). Sin embargo, la evidencia directa del papel de la NT-3 en la plasticidad sináptica del SNC adulto es escasa. Así, el presente proyecto consistió en el estudio *in vivo* de la influencia que ejerce la NT-3 en la plasticidad sináptica funcional y estructural en el hipocampo de ratas adultas.

Se han reportado evidencias que muestran que la historia de actividad de una neurona o vía de conexión, puede modificar la manera en que ésta presentará la plasticidad subsecuente sináptica (Abraham, 2008). Considerando la potencialidad de la NT-3 para modular la plasticidad sináptica (Kang y Schuman 1995; Shimazu et al., 2006), en el presente proyecto se analizó también su participación en la inducción de plasticidad subsecuente. Así la segunda

fase del presente proyecto consistió en analizar la influencia que ejerce la NT-3 sobre la plasticidad funcional y estructural previamente generada por inducción de LTP en las FM.

Finalmente, en el presente proyecto se planteó una tercera fase experimental, en la que se analizó la participación de dos vías de señalización relacionadas con las acciones que ejerce la NT-3 tanto en la plasticidad sináptica funcional y estructural de las fibras musgosas, como en los procesos metaplásticos que induce esta neurotrofina en esta vía de comunicación.

5. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

- ¿La NT-3 ejerce efectos en la fortaleza de la transmisión sináptica que se acompañan de reorganización morfológica de las fibras musgosas en el sistema nervioso adulto?
- ¿Estos efectos tienen injerencia en la subsecuente inducción de plasticidad sináptica inducida por la estimulación de alta frecuencia y en la reorganización morfológica derivada de ésta?
- ¿Cuáles son las vías de señalización que activa NT-3 para modular sus acciones en la plasticidad sináptica tanto funcional como morfológica?

6. OBJETIVOS

El presente proyecto tuvo como objetivo analizar los efectos que ejerce la NT-3 sobre los cambios en la fortaleza de la transmisión sináptica así como en la reorganización de los botones musgosos en la vía de comunicación que va del GD al área CA3 en el sistema nervioso adulto de roedores, *in vivo*. Asimismo, se analizó la modulación de esta neurotrofina en la subsecuente inducción de potenciación a largo plazo por estimulación de alta frecuencia y en la reorganización de los botones musgosos en esta conexión. Finalmente se evaluaron algunas vías de señalización relacionadas con las acciones que ejerce la NT-3 para modular la plasticidad sináptica y la metaplasticidad.

6.1. Objetivos particulares

Primera fase:

- Analizar la influencia que la NT-3 ejerce sobre la comunicación sináptica y la reorganización morfológica de las fibras musgosas hipocampales (GD-CA3).
- Evaluar la participación del receptor TrkC en las acciones de la NT-3 sobre la comunicación sináptica y la reorganización morfológica de las fibras musgosas hipocampales.

Segunda fase:

- Evaluar los efectos de la NT-3 sobre la subsecuente expresión de LTP inducida por estimulación de alta frecuencia (HFS) en la vía que va del GD al área CA3, así como en la reorganización morfológica originada por ésta.
- Analizar ultraestructuralmente las características de la reorganización morfológica inducida por NT-3 en la vía de las fibras musgosas.

Tercera fase:

- Explorar parte de las vías de señalización relacionadas con las acciones de la NT-3 sobre la plasticidad sináptica funcional y estructural de las fibras musgosas.
- Dilucidar parte de los las vías de señalización relacionadas con el efecto de metaplasticidad ejercido por la NT3. Para ello se evaluaron las acciones de la NT-3 sobre la inducción subsecuente de LTP producida por HFS en la vía que va del GD al área CA3, y la reorganización sináptica de las fibras musgosas producida por la HFS.

7. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

7.1. Animales

Para la realización de este estudio se emplearon ratas macho de la cepa Wistar con pesos entre 360-390g, que tuvieron un período de habituación de una semana a las condiciones del bioterio, manteniéndose durante los experimentos en cajas individuales de acrílico con agua y

alimento *ad libitum* y, en un ciclo de luz-oscuridad de 12:12 hrs, a una temperatura ambiente promedio de 23°C.

7.2. Procedimiento electrofisiológico

Durante los procedimientos quirúrgicos y electrofisiológicos, se empelaron ratas adultas a los que se anestesió con pentobarbital sódico (Pisabental® 50 mg/Kg IP), suministrando inyecciones suplementarias del mismo (25 mg/Kg) a intervalos de 1hr a fin de mantener los niveles quirúrgicos de anestesia. Con el fin de analizar la participación de la NT-3 en las expresiones de plasticidad antes mencionadas, se efectuaron registros electrofisiológicos basales *in vivo* en dichos sujetos. Brevemente, las respuestas fueron registradas utilizando un electrodo monopolar de infusión (Escobar et al., 2003) colocado en el estrato lúcido, en la capa suprapiramidal del área CA3 del hipocampo dorsal (figura 13), siguiendo las coordenadas estereotáxicas de: AP -2.9 mm; ML +2.2 mm; DV -3.0 mm (Paxinos y Watson, 1986). Los electrodos de registro/infusión fueron contruidos con una cánula guía de calibre 33 de acero inoxidable cubierta con un aislante, conectado a un cable de acero inoxidable cubierto de teflón (0.005", Medwire, Chicago IL, EUA). Este electrodo se acopló en su parte superior a una manguera de polietileno acoplada a su vez a una jeringa Hamilton de 10 µl comandada por una bomba de microinfusión (Cole Palmer Co.; EUA) (figura 13).

Las respuestas fueron evocadas a través de la estimulación directa del giro dentado, empleando un electrodo bipolar de acero inoxidable (diámetro 0.005") colocado en las siguientes coordenadas estereotáxicas: AP -3.5 mm; ML -2.0 mm; DV -3.1 mm (Paxinos y Watson, 1986). La estimulación (pulsos monofásicos de 20-40 µA y 0.1-0.25 ms de duración) fue suministrada por medio de un estimulador Grass S48, llevada al electrodo por una unidad de aislamiento PSIU6. Las respuestas evocadas fueron amplificadas utilizando un amplificador Grass P5, filtradas a 0.1-10 Hz, la señal fue digitalizada (10 puntos/s) para almacenamiento y análisis en una microcomputadora provista del software BrainWave (Datawave Co., EUA). Las respuestas evocadas de las fibras musgosas fueron medidas obteniendo la pendiente de los potenciales postsinápticos excitatorios (PPSE) de campo medidos 1-3 milisegundos después del comienzo de los PPSE. La intensidad de la corriente que producía un 50% del máximo de respuesta fue determinada y utilizada para la subsecuente estimulación.

Con el fin de analizar el efecto de NT-3 en la plasticidad sináptica de las fibras musgosas hipocampales se estableció una línea base de 20 minutos evocando y registrando respuestas cada 20 segundos (0.5Hz). Posteriormente se realizaron las infusiones de NT-3, la sustancia vehículo, NT-3 en compañía del inhibidor de los receptores Trk (K252a), o el inhibidor de la proteína cinasa PI-3K (LY294002), o el inhibidor de la vía de MAPKs (U0126) y se obtuvieron los registros post-infusión por 3 h (Escobar et al. 2003). Con el fin de evaluar el efecto de NT-3 en la subsecuente plasticidad sináptica inducida por estimulación de alta frecuencia (HFS), se estableció una línea base de 20 min, seguida por la inducción de LTP a través de la estimulación con 3 trenes de 100 Hz/1s de duración, con intervalos de 20 s intertrén y se registraron las respuestas por 3 h post estimulación. En esta fase los fármacos fueron infundidos 12 minutos antes de comenzar el registro electrofisiológico.

El agonista del receptor metabotrópico a glutamato tipo II, 2-(2,3-dicarboxi-ciclopropil) glicina (DCG-IV; 0.5 μ l a una concentración de 0.5 μ M infundido en 5 min) fue microinfundido al final de los registros electrofisiológicos con el fin de verificar que la señal obtenida haya sido en efecto generada por las fibras musgosas hipocampales (Calixto et al., 2003).

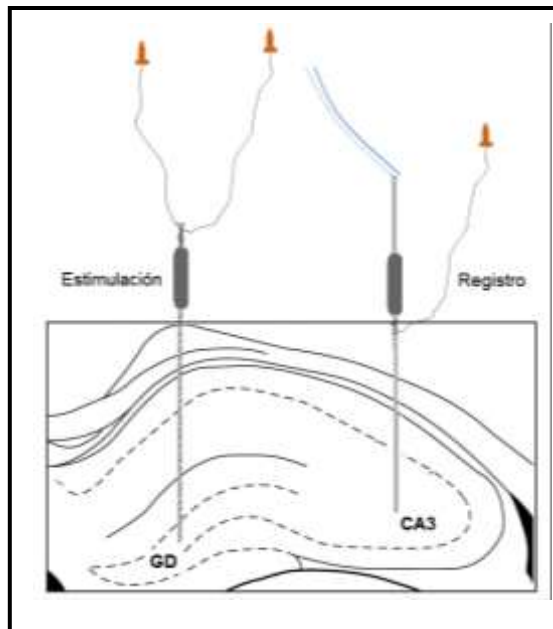
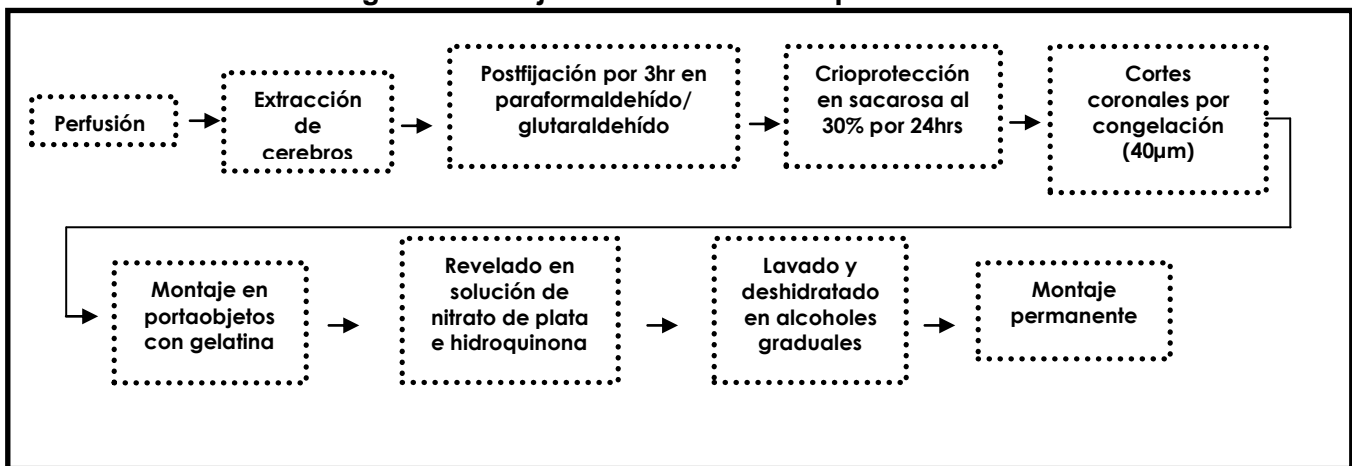


Figura 13. Esquema que muestra el lugar en el que fueron implantados los electrodos. El lugar donde se coloca el electrodo de estimulación en el giro dentado y el electrodo de registro- infusión en el área CA3 hipocampal (Modificado de Paxinos y Watson, 1986).

7.3. Técnica histoquímica de Timm

La técnica histoquímica de Timm para la detección de metales pesados consiste en la reducción de metales pesados libres con sulfuro de sodio, cuyo producto se combina posteriormente con nitrato de plata y se somete a un proceso de revelado análogo al fotográfico, lo que conduce a la formación de plata metálica que puede ser visualizada. En todas las fases, los animales fueron perfundidos transcardialmente con 500 ml de una solución acuosa de sulfuro de sodio al 0.4%, seguida de 500 ml de una solución de paraformaldehído al 1% y glutaraldehído al 1.25%. Posteriormente los cerebros fueron extraídos y para una crioprotección se dejaron en una solución fijadora conteniendo 30% de sacarosa. Al cabo de dos días los cerebros se cortaron por congelación en secciones coronales de 40 μm , se colocaron en portaobjetos cubiertos con gelatina y se revelaron en oscuridad en una mezcla 12:6:2 de goma arábica (20%), hidroquinona (5.6%), buffer de citratos y 1 ml de una solución al 17% de nitrato de plata (Danscher y Zimmer 1978).

Diagrama de flujo de la técnica histoquímica de Timm



7.4. Análisis histológicos

Los cortes procesados con la técnica histoquímica de Timm se examinaron por microscopía de luz con el propósito de evaluar la presencia y distribución de los gránulos de Timm, que a su vez revelan la distribución de los botones sinápticos. A partir del polo septal del hipocampo dorsal se eligió un corte de cada cinco secciones por animal para su análisis (coordenadas: AP -3.2 a 3.5, Paxinos y Watson, 1986). El área CA3 de estas secciones coronales fue

captada por una cámara digital (Coolpix 5000, Nikon, Tokio, Japón) conectada al microscopio óptico (Eclipse E600, Nikon, Tokio, Japón). Estas imágenes se ecualizaron con los mismos parámetros de brillo y contraste (Adobe Photoshop CS). Las imágenes digitales fueron primero analizadas con un programa de análisis de imágenes (Scion Image, Scion Co., Frederick MD, EUA) como ha sido reportado con anterioridad (Ramirez-Amaya, et al. 2001). Brevemente, en cada imagen se midió el área de gránulos de Timm con un rango de densidad óptica de entre 120-255 puntos en escala de grises (32 bits) (el mismo rango de densidad encontrado en el estrato lúcido (SL), que se encontraron el estrato piramidal (SP) y en el estrato oriens (SO) de tal manera que los cerebros de cada animal obtuvieron ocho medidas ipsilaterales y ocho contralaterales. Las áreas del SP y SO (SOSP) fueron combinadas como fue reportado por Rekart y cols., (2007).

Estos resultados fueron corroborados por medio de la utilización de otra metodología utilizada anteriormente en la observación de éste tipo de modificaciones morfológicas (Rekart et al., 2007). Para ello se realizaron medidas del área de interés a través de una rejilla de conteo (cuadros = 25 μ m por lado) que fue digitalmente superpuesta en las imágenes. Posteriormente se contaron las intersecciones de la rejilla pertenecientes al SL o SOSP que contaban con un oscuro precipitado de Timm. Cuando se obtuvieron las medidas por ambas metodologías (obtenidas mediante Scion Image y con la rejilla reportada por Rekart y cols. 2007) se hicieron comparaciones entre grupos utilizando la proporción del área estimada de SOSP entre el el área de SL para tomar en consideración cualquier diferencia en el tamaño de los hipocampos entre los animales (Rekart et al., 2007).

7.5. Inmunohistoquímica

Para corroborar la difusión de NT-3 infundida de manera exógena en el hipocampo, se analizó por histoquímica la presencia del factor en cortes tomados a partir del polo septal del hipocampo dorsal (AP -3.2 a 3.5), 15 minutos después de la infusión de la neurotrofina. Para ello, los animales se sacrificaron mediante una sobredosis del anestésico pentobarbital. La perfusión se efectuó transcardialmente con 500 ml de solución salina al 0.9%, seguida por 500 ml de paraformadehído al 4% y glutaraldehído 0.2% en buffer de fosfatos 0.1 M (pH 7.4). El periodo de exposición a los fijadores durante la perfusión fue de 30 min, seguido por un

periodo post-fijación de 24 h a 4°C. Los cerebros se transfirieron a una solución de sacarosa al 30% en PBS 0.1 M (pH 7.4). Se realizaron secciones coronales de 40 µm y se incubaron por 3 días en el anticuerpo primario, conejo anti-NT-3, (1:300; Alomone Labs., Jerusalem, Israel) a 4°C. Para revelar el anticuerpo se utilizó el método de inmunoperoxidasa-complejo avidina-biotina. Brevemente, las secciones se lavaron en PBS-Tritón X-100 e incubaron por 2 h en el anticuerpo secundario anti conejo (1: 200; Vectastain® ABC Elite Kit, Vector Labs., Burlingame, CA, EUA), se lavaron nuevamente y se incubaron por 2 h con el complejo avidina-biotina-peroxidasa. La marca de peroxidasa fue revelada por la reacción con diaminobenzidina (DAB) en 50 mM de Tris, pH 7.6/0.01% H_2O_2 (0.6 ml DAB (10 mg/ml) 30 ml PBS 0.1M y 5 µl de H_2O_2). Por último los cortes se lavaron tres veces en una solución de PBS al 0.3% por 10 min en cada ocasión. La reacción inmunohistoquímica fue desarrollada usando un estuche Vectastain® ABC Elite (Vector Labs., Burlingame, CA, EUA). Finalmente las secciones se montaron en portaobjetos de cristal bañados en gelatina y se analizaron al microscopio óptico (Eclipse E600, Nikon, Tokio, Japón).

7.6. Microscopía electrónica de transmisión

Con el propósito de corroborar que la precipitación de gránulos de Timm fuera correspondiente con la presencia de botones sinápticos en el estrato oriens, aunados a los correspondientes análisis ultraestructurales de estos nuevos botones formados, en la segunda fase de este estudio se realizó el análisis con microscopía electrónica de transmisión en animales microinfundidos con NT-3 (n=3) y animales microinfundidos con el vehículo (n=3).

Brevemente, los animales fueron perfundidos con 400 ml de solución salina 0.9 % seguida de una solución de paraformaldehído (1%) y glutaraldehído (1%), los cerebros fueron transferidos a una solución de PBS con glutaraldehído al 2.5% 0.12 M, pH 7.4, permaneciendo así por 24 h al cabo de las cuales se procedió a lavar con sacarosa isotónica. Se realizaron pequeñas secciones correspondientes al área CA3 del hipocampo ipsilateral al área de infusión, y el tejido se transfirió a una solución de postfijación de tetróxido de osmio al 2% en el mismo amortiguador. Se procedió a deshidratar y embeber el tejido en óxido de propileno y se procedió a cortar el bloque que contenía el tejido, con un ultramicrotomo. Finalmente las secciones se tiñeron con citrato de plomo y acetato de uranilo para su observación al

microscopio electrónico. Las áreas del SL y SOSP se analizaron a través de un microscopio electrónico (Jeol 1200 EX II, Tokio, Japón). Se procesaron tres imágenes obtenidas a 2,500X del área SOSP y tres del área SL ipsilateral de cada animal. Posteriormente se localizaron las terminales de las fibras musgosas utilizando una amplificación de 10,000X. Las imágenes obtenidas a una amplificación de 2,500X se utilizaron para el conteo de botones sinápticos en ambas áreas. Para ello se utilizó una rejilla de conteo (cuadros = 10µm por lado), que fue digitalmente superpuesta en las imágenes. Posteriormente se contaron las intersecciones de la rejilla pertenecientes al SL o SOSP que contaban con botones de las fibras musgosas localizados por sus características. Los botones fueron caracterizados anatómicamente haciendo una comparación entre grupos.

7.7. Análisis de resultados

Para el análisis de los datos obtenidos a partir de los experimentos electrofisiológicos se llevó a cabo un ANOVA de medidas repetidas, seguido por la prueba post hoc de Fisher utilizando el programa StatView y para analizar los datos morfológicos se utilizó un ANOVA de una sola vía de la proporción obtenida entre las áreas SOSP/SL.

8. DISEÑO EXPERIMENTAL

El presente proyecto fue dividido en las siguientes fases experimentales:

8.1. Primera fase

Con el fin de analizar los efectos de la NT-3 en la comunicación y en la reorganización morfológica en la vía del GD-CA3 del hipocampo los grupos experimentales fueron divididos de la siguiente manera:

- Grupo NT-3: (NT-3, n=9) que fue sometido al registro electrofisiológico antes descrito, este grupo recibió una microinfusión aguda de NT-3 (2µg/2µl; 0.2µl/min; Alomone Labs., Jerusalén, Israel) preparada en buffer de fosfatos (PBS) como vehículo,

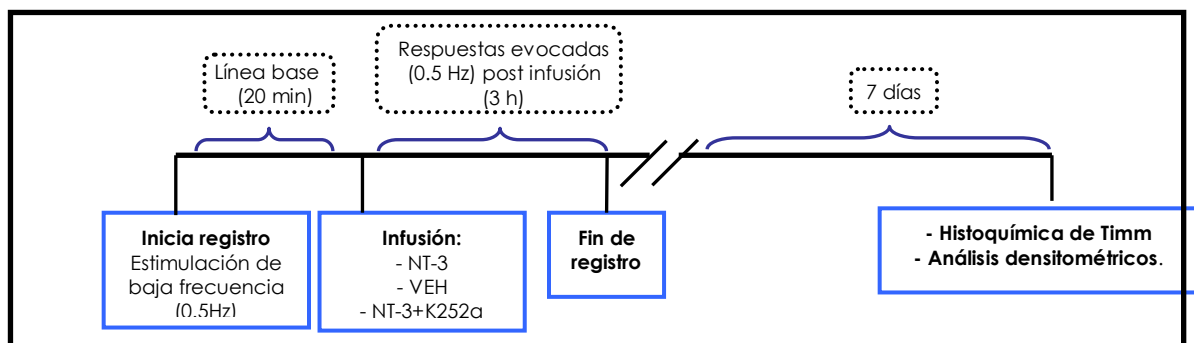
inmediatamente después del registro de la línea base (20 min). Una vez infundida la neurotrofina, el registro electrofisiológico continuó por 3 horas. Al cabo de un periodo postoperatorio de 7 días, los cerebros fueron procesados con la técnica histoquímica de Timm con el fin de observar modificaciones de la estructura sináptica.

➤ Grupo VEH: (VEH, n=9) que fue procesado de forma similar al grupo NT-3, recibiendo una microinfusión de PBS (2µl; 0.2µl/min) después de la obtención de la línea base. Una vez infundido el vehículo, el registro electrofisiológico continuó por 3 horas. Al cabo de un periodo postoperatorio de 7 días, los cerebros fueron procesados con la técnica histoquímica de Timm con el fin de observar modificaciones de la estructura sináptica.

➤ Grupo NT3+K252: (NT3+K252, n=9) que fue sometido al registro electrofisiológico de forma similar al grupo NT-3, este grupo recibió una microinfusión aguda de NT-3 en combinación con el inhibidor de los receptores Trk, K252a (2µg de NT-3/2µl de K252a 20 µM; infundidos a una tasa de 0.2µl/min; Alomone Labs., Jerusalén, Israel). El K252a fue preparado en una solución de dimetil sulfóxido (DMSO al 0.5%; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Tras la microinfusión, el registro electrofisiológico continuó por 3 horas. Siete días después los cerebros fueron procesados con la técnica histoquímica de Timm con el fin de observar modificaciones de la estructura sináptica.

➤ Grupo control intacto: (CON, n=8) el cual fue utilizado para los análisis morfológicos. Los animales de este grupo permanecieron en sus cajas individuales por 7 días después de los cuales fueron perfundidos y el área CA3 analizada por medio de la técnica histoquímica de Timm.

Diagrama de flujo para la primera fase experimental



8.2. Segunda fase

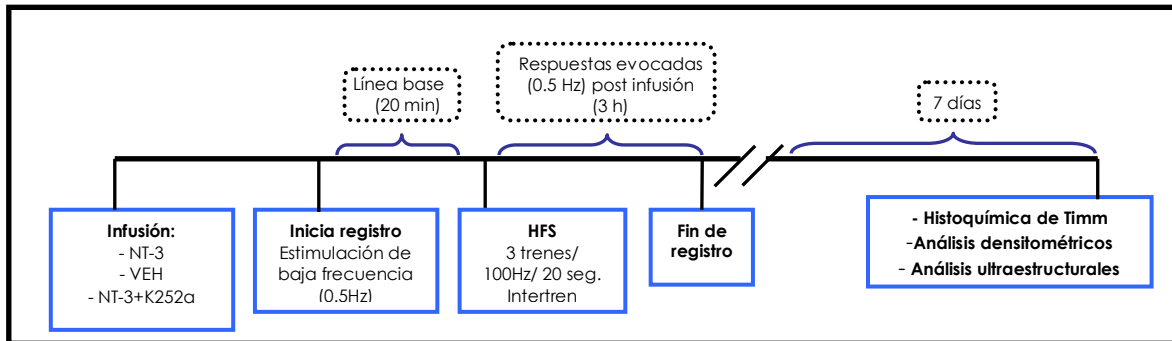
Con el fin de analizar los efectos de la NT-3 sobre la subsecuente inducción de plasticidad en la vía que va del GD al área CA3 así como en la reorganización morfológica inducida por HFS, capaz de inducir LTP en esta vía, los grupos experimentales fueron divididos de la siguiente manera:

- Grupo HFS: (HFS, n=9) que fue sometido al registro electrofisiológico antes descrito acompañado de estimulación de alta frecuencia (HFS). Siete días después los cerebros de los animales pertenecientes a este grupo fueron procesados con la técnica histoquímica de Timm con el fin de observar modificaciones sinápticas.
- Grupo NT-3+HFS: (NT3+HFS, n=9) recibió una microinfusión intrahipocampal de NT-3 (2µg/2µl, 0.2µl/min; Alomone Labs., Jerusalén, Israel) en el área CA3 del hipocampo, seguida del registro electrofisiológico antes descrito acompañado de HFS. Siete días después los cerebros fueron procesados con la técnica histoquímica de Timm con el fin de observar modificaciones sinápticas.
- Grupo VEH+HFS (VEH+HFS, n=8) que recibió una microinfusión intrahipocampal de la solución utilizada como vehículo (2µl PBS, 0.2µl/min) en el área CA3 del hipocampo, seguida del registro electrofisiológico antes descrito acompañado de HFS. Siete días después los cerebros fueron procesados con la técnica histoquímica de Timm con el fin de observar modificaciones sinápticas.
- Grupo NT-3+K252a+HFS: (NT-3+K252+HFS, n=9) al cual se le administró una microinfusión intrahipocampal de NT-3 junto con el inhibidor de los receptores Trk, K252a (2µg de NT-3/2µl de K252a 20 µM; 0.2µl/min; Alomone Labs., Jerusalén, Israel). El K252a fue preparado en una solución de dimetil sulfóxido (DMSO al 0.5%; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) en el área CA3 del hipocampo, seguida del registro electrofisiológico antes mencionado acompañado de HFS. Siete días después los cerebros fueron procesados con la técnica histoquímica de Timm con el fin de observar modificaciones sinápticas.
- Grupo control intacto: (CON, n=6) no fue sometido a ningún procedimiento quirúrgico, electrofisiológico o neuroquímico. Los cerebros fueron analizados de acuerdo

a la técnica histoquímica de Timm con el fin de establecer un parámetro neuroanatómico de las posibles modificaciones sinápticas en el estrato oriens del área CA3 hipocampal.

Adicionalmente, tres animales del grupo NT-3+HFS (n=3) y del grupo VEH+HFS (n=3) fueron procesados de acuerdo al protocolo de microscopía electrónica descrito en líneas anteriores.

Diagrama de flujo para la segunda fase experimental



8.3. Tercera fase

Con el fin de explorar la participación de las vías de señalización relacionadas al efecto de la NT-3 en la plasticidad sináptica y la reorganización morfológica de la vía que va del GD al área CA3 hipocampal, se utilizaron los siguientes grupos:

- Grupo NT-3: (NT-3, n=7) fue sometido al registro electrofisiológico antes descrito. Este grupo recibió una microinfusión aguda de NT-3 (2 μ g/2 μ l; 0.2 μ l/min; Alomone Labs., Jerusalén, Israel) preparada con PBS como vehículo, inmediatamente después del registro de la línea base. Una vez infundida la neurotrofina, se continuó con el registro electrofisiológico por 3 horas. Al cabo de un periodo postoperatorio de 7 días, los cerebros se procesaron con la técnica histoquímica de Timm con el fin de observar modificaciones de la estructura sináptica.
- Grupo VEH: (VEH, n=7) que fue procesado de forma similar al grupo NT-3, recibiendo una microinfusión de PBS (2 μ l; 0.2 μ l/min) inmediatamente después del registro de la línea base. Una vez infundido el PBS, se continuó con el registro electrofisiológico por 3 horas. Al cabo de un periodo postoperatorio de 7 días, los cerebros se procesaron con la técnica histoquímica de Timm con el fin de observar modificaciones de la estructura sináptica.

- Grupo NT3+LY: (NT3+LY, n=9) que fue sometido al registro electrofisiológico antes descrito; este grupo recibió una microinfusión aguda de NT-3 (2µg/2µl, 0.2µl/min; Alomone Labs., Jerusalén, Israel) en combinación con el inhibidor de la PI3K, LY294002 (30 µg/µl en DMSO al 50%, Alomone Labs., Jerusalén, Israel), inmediatamente después del registro de la línea base. El LY294002 fue preparado en una solución de dimetil sulfóxido (DMSO al 50%; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Tras la microinfusión, se continuó con el registro electrofisiológico por 3 horas. Al cabo de un periodo postoperatorio de 7 días, los cerebros se procesaron con la técnica histoquímica de Timm con el fin de observar modificaciones de la estructura sináptica.
- Grupo NT3+U0126: (NT3+U0126, n=10) que fue sometido al registro electrofisiológico antes descrito; este grupo recibió una microinfusión aguda de NT-3 (2µg/2µl, 0.2µl/min; Alomone Labs., Jerusalén, Israel) en combinación con el inhibidor de la vía de las MAPKs, U0126 (1 µg/µl en DMSO al 50%, Alomone Labs., Jerusalén, Israel) inmediatamente después del registro de la línea base. El U0126 fue preparado en una solución de dimetil sulfóxido (DMSO al 50%; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Tras la microinfusión, se continuó con el registro electrofisiológico por 3 horas. Al cabo de un periodo postoperatorio de 7 días, los cerebros se procesaron con la técnica histoquímica de Timm con el fin de observar modificaciones de la estructura sináptica.
- Grupo NT-3+DMSO (NT-3+DMSO, n=6) que fue sometido al registro electrofisiológico antes descrito; este grupo recibió una microinfusión aguda de NT-3 (2µg de NT-3/2µl, 0.2µl/min; Alomone Labs., Jerusalén, Israel) en combinación con el vehículo utilizado para los inhibidores LY29402 y U0126 (DMSO al 50%, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) en el área CA3 del hipocampo, inmediatamente después del registro de la línea base. Tras la microinfusión, se continuó con el registro electrofisiológico por 3 horas. Al cabo de un periodo postoperatorio de 7 días, los cerebros se procesaron con la técnica histoquímica de Timm con el fin de observar modificaciones de la estructura sináptica.
- Grupo control intacto (CON, n=8): el cual fue utilizado para los análisis morfológicos. Los animales de este grupo permanecieron en sus cajas individuales por 7 días después de los cuales se perfundieron y el área CA3 se analizó por medio de la técnica histoquímica de Timm.

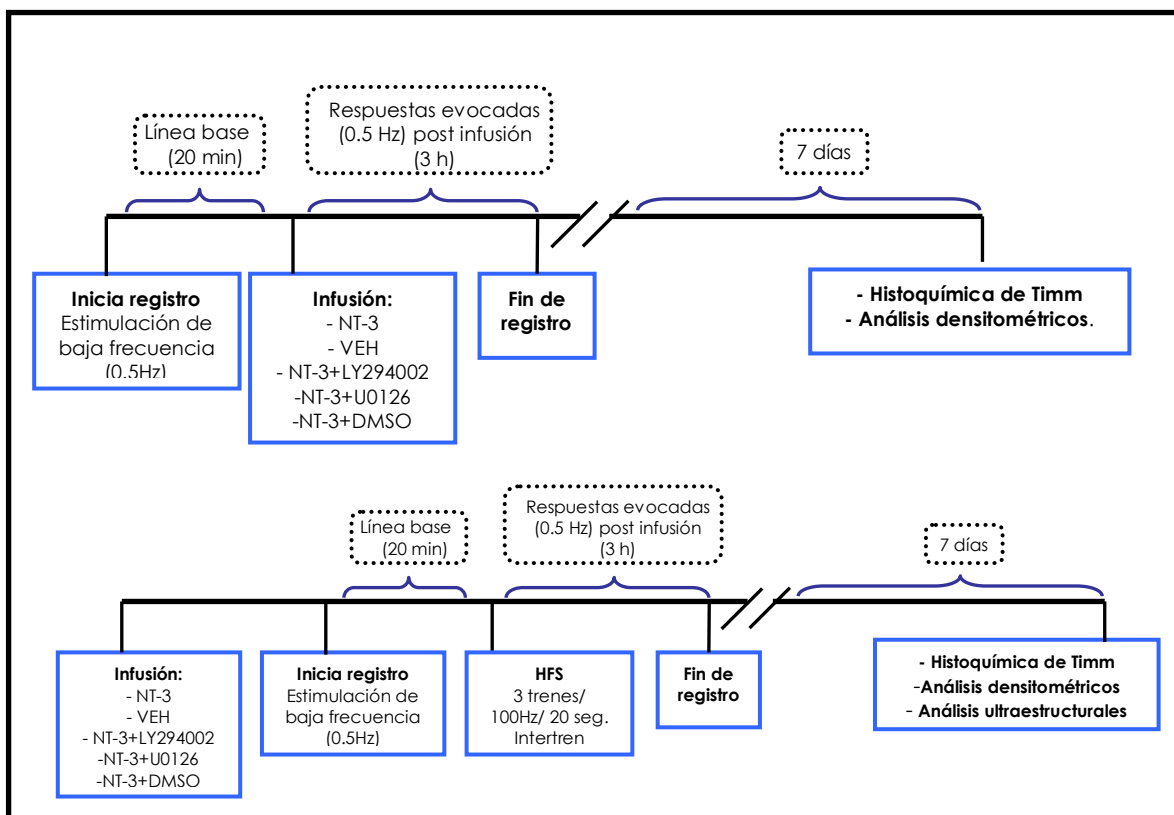
Finalmente con el objetivo de analizar las vías de señalización relacionadas con el efecto de la NT-3 en la subsecuente inducción de plasticidad sináptica, los grupos experimentales fueron divididos de la siguiente manera:

- Grupo NT-3+HFS: (NT3+HFS, n=7) el cual recibió una microinfusión intrahipocampal de NT-3 (2µg/2µl, 0.2µl/min; Alomone Labs., Jerusalén, Israel) en el área CA3 del hipocampo, seguida del registro electrofisiológico antes descrito acompañado de HFS. Siete días después los cerebros se procesaron con la técnica histoquímica de Timm con el fin de observar modificaciones sinápticas.
- Grupo VEH+HFS (VEH+HFS, n=6) el cual recibió una microinfusión intrahipocampal de la solución empleada como vehículo de la neurotrofina (2µl PBS, 0.2µl/min) en el área CA3 del hipocampo, seguida del registro electrofisiológico antes descrito acompañado de HFS. Siete días después los cerebros se procesaron con la técnica histoquímica de Timm con el fin de observar modificaciones sinápticas.
- Grupo NT-3+LY+HFS: (NT-3+LY+HFS, n=9) el cual recibió una microinfusión intrahipocampal de aguda de NT-3 (2µg/2µl, 0.2µl/min; Alomone Labs., Jerusalén, Israel) en combinación con el inhibidor de la PI3K, LY294002 (30 µg/µl en DMSO al 50%, Alomone Labs., Jerusalén, Israel); en el área CA3 del hipocampo, seguida del registro electrofisiológico antes descrito acompañado de HFS. Siete días después los cerebros se procesaron con la técnica histoquímica de Timm con el fin de observar modificaciones sinápticas.
- Grupo NT-3+U0126+HFS: (NT-3+U0126+HFS, n=9) el cual recibió una microinfusión aguda de NT-3 (2µg/2µl, 0.2µl/min; Alomone Labs., Jerusalén, Israel) en combinación con el inhibidor de la vía de MAPKs, U0126 (1 µg/µl en DMSO al 50%, Alomone Labs., Jerusalén, Israel); en el área CA3 del hipocampo, seguida del registro electrofisiológico antes descrito acompañado de HFS. Siete días después los cerebros se procesaron con la técnica histoquímica de Timm con el fin de observar modificaciones sinápticas.
- Grupo NT-3+DMSO+HFS (NT-3+DMSO+HFS, n=7) este grupo recibió una microinfusión aguda de NT-3 (2µg/2µl, 0.2µl/min; Alomone Labs., Jerusalén, Israel) en combinación con el vehículo utilizado para los inhibidores LY29402 y U0126 (DMSO al 50%, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) en el área CA3 del hipocampo, seguida del

registro electrofisiológico antes descrito acompañado de HFS. Siete días después los cerebros se procesaron con la técnica histoquímica de Timm con el fin de observar modificaciones sinápticas.

➤ Grupo control intacto: (CON, n=6) que no fue sometido a ningún procedimiento quirúrgico, electrofisiológico o neuroquímico, cuyos cerebros se analizaron de acuerdo a la técnica histoquímica de Timm con el fin de establecer un parámetro neuroanatómico de las posibles modificaciones sinápticas en el estrato oriens del área CA3 hipocampal.

Diagrama de flujo para la tercera fase experimental



9. RESULTADOS

9.1. Primera fase: Efecto de la NT-3 en la comunicación sináptica y la reorganización morfológica de las fibras musgosas hipocampales

9.1.1. Resultados electrofisiológicos

Los resultados derivados de ésta investigación muestran que la estimulación de alta frecuencia generó LTP en la vía que va del giro dentado (GD) al área CA3 (fibras musgosas) del hipocampo en ratas adultas, *in vivo*. Las respuestas evocadas en el área CA3 fueron medidas a través de la obtención de los potenciales postsinápticos excitatorios de campo (PPSE). La respuestas características de esta señal iniciaron entre 1.5 a 2.8 ms post-estimulación y presentan su valle hacia los 7.5 ms. La amplitud promedio de los potenciales fue de 0.39 ± 0.02 mV con una pendiente de 0.14 ± 0.008 . La LTP se caracterizó por un lento incremento inicial en la pendiente de los PPSE de campo. Con el fin de caracterizar una señal particular de las fibras musgosas, al final de los registros, se administró una microinfusión del agonista de los receptores metabotrópicos de glutamato de la clase II, DCGIV, puesto que evidencias experimentales muestran que este agonista, es un fuerte depresor de la transmisión sináptica de las fibras musgosas hipocampales (Nicoll y Schmitz, 2005). Se observó entonces que la señal registrada fue deprimida hasta en un 0.072 ± 0.03 (figura 14C). En registros electrofisiológicos donde se microinfundió NT-3 ($2\mu\text{g}/2\mu\text{l}$) de forma aguda (12 min) posterior a la línea base con el fin de analizar los efectos de esta proteína en la comunicación sináptica de las fibras musgosas hipocampales, la neurotrofina indujo un incremento porcentual de 141.37 ± 0.39 , mostrando una potenciación de la transmisión sináptica de la vía GD-CA3. Dicha potenciación inició hacia los 20 minutos después de la infusión de la neurotrofina y se mantuvo al menos por 3 horas (figura 14D, panel superior). Asimismo se administró una microinfusión de buffer de fosfatos (PBS) al grupo control (VEH), en el cual se registró un incremento porcentual de 99.16 ± 0.69 (figura 14B, panel central) y que resultó significativamente menor al del grupo infundido con NT3. Para analizar los mecanismos por medio de los cuales la NT-3 ejerce sus acciones, inicialmente se utilizó un inhibidor para los receptores Trk en conjunto con la NT-3. Este grupo no presentó cambios con respecto a los

demás grupos; se registró un incremento porcentual de 101.08 ± 0.94 con respecto a la línea base (figura 14 B, panel inferior).

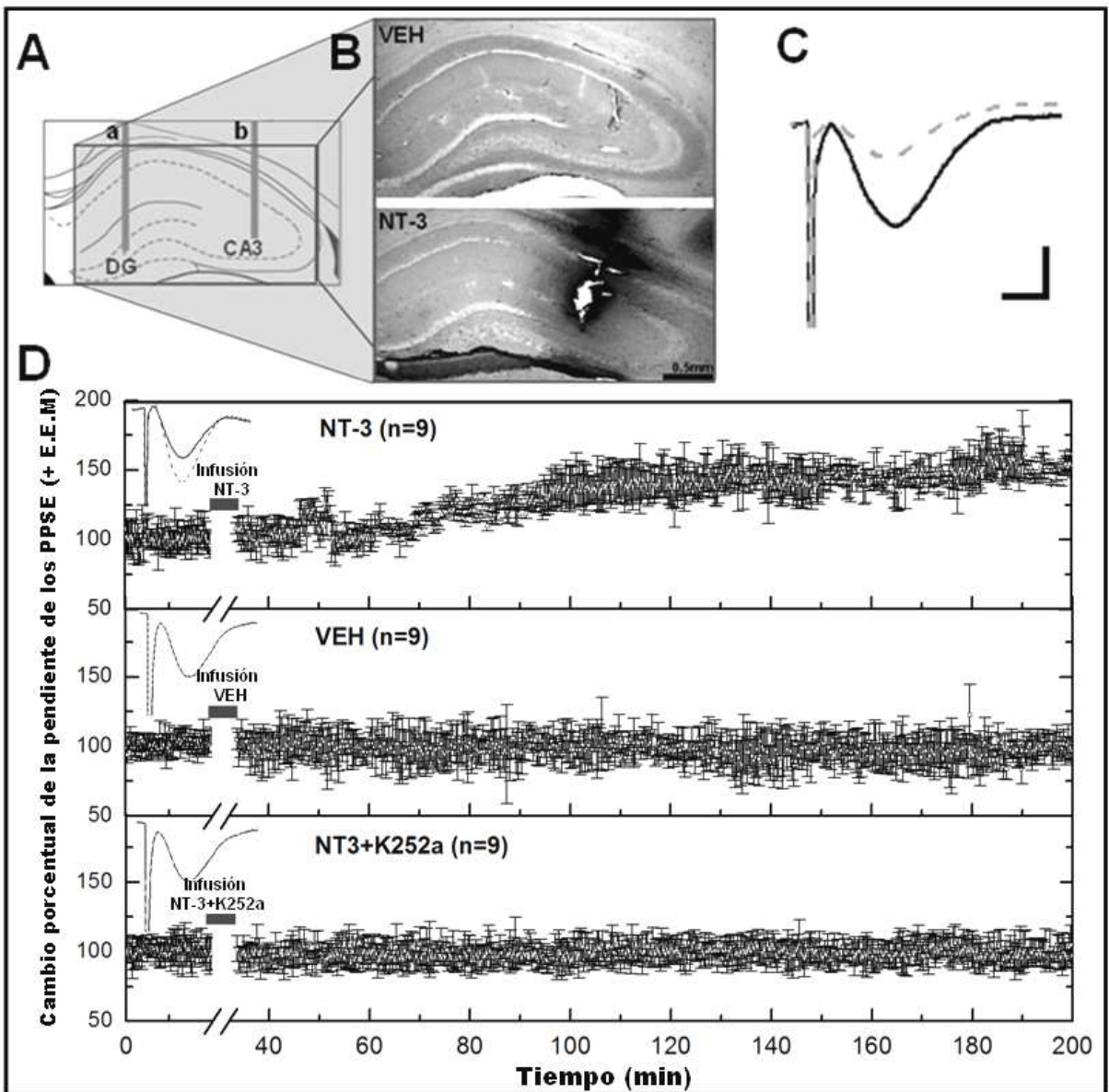


Figura 14. Efectos de la microinfusión aguda de NT-3 en las respuestas de la vía que va del GD al área CA3 in vivo. (A) Representación esquemática de la vía de las FM y la ubicación de los electrodos, mostrando los sitios de estimulación (a) y de registro (b) en un plano coronal. (B) Secciones coronales representativas de hipocampus marcadas con anti-NT-3 después de la infusión de PBS (VEH 2 μ l) o NT-3 (2 μ g/ μ l). Se observa una fuerte inmunoreactividad, restringida únicamente en el área CA3 hipocampal. (C) Señal característica de las fibras musgosas (línea continua), con una señal sobrepuesta (en líneas discontinuas) obtenida después de la infusión de DCG-IV. Se observa que el DCG-IV bloquea selectivamente las respuestas de las fibras musgosas. (D) Se muestra el cambio porcentual de la pendiente de los PPSE de campo durante 20 minutos de línea base, seguido por la microinfusión de la NT-3 (señalada con la barra, panel superior); se muestra el efecto de la sustancia vehículo (PBS) sobre la transmisión sináptica, donde no se observa ningún cambio significativo posterior a la microinfusión (panel central); el inhibidor de los receptores Trk bloquea el efecto de potenciación que la NT-3 induce (panel inferior). Escala de la barra: 5 ms y 0.15mV. Las barras en C indican el periodo de infusión (12 min).

9.1.2. Resultados histológicos: Inmunohistoquímica

Con el objetivo de observar la difusión de NT-3 en el hipocampo alrededor del electrodo de registro, se marcó al hipocampo con la técnica de inmunohistoquímica con un anticuerpo para NT-3. Se observó una fuerte inmunoreactividad restringida únicamente al área CA3 hipocampal (figura 14B).

9.1.3. Resultados histológicos: Técnica histoquímica de Timm

En el análisis histológico realizado siete días después de los registros electrofisiológicos, se observó en el grupo NT3 una reorganización predominantemente ipsilateral de las fibras musgosas en el estrato oriens del área CA3 hipocampal, lo que indica que la neurotrofina además modular la comunicación sináptica de esta vía, modula también la reorganización sináptica (figura 15A). Para el grupo control intacto no se observaron modificaciones hacia el estrato oriens del área CA3 hipocampal (figura 15A) y, en el caso del grupo vehículo tampoco se observaron modificaciones en la morfología de las fibras musgosas (figura 15A). Además se observó que el efecto de la NT-3 sobre la reorganización hacia el estrato oriens también fue bloqueado por los inhibidores para Trk (figura 15A).

El ANOVA del promedio de la superficie del área positiva a Timm, obtenido del análisis densitométrico de SOSP y SL de cada animal, mostró diferencias significativas entre el grupo XX y el YY ($F_{3,20} = 48.315$, $P < 0.001$). El análisis post-hoc de Fisher mostró diferencias significativas ($p < 0.001$) para el grupo donde se microinfundió la NT-3 en comparación a los otros grupos, cabe señalar que se presentó un incremento en la reorganización sináptica en el lado ipsilateral de la estimulación, que tiene diferencias significativas respecto al lado contralateral de la microinfusión, lo cual corrobora las observaciones histológicas (figura 15B). Resultados similares se obtuvieron con las medidas obtenidas con la rejilla, en las cuales el ANOVA también presentó diferencias significativas entre grupos ($F_{3,20} = 43.411$, $P < 0.001$). El análisis post-hoc de Fisher mostró un aumento significativo ($p < 0.001$) en la distribución del marcaje con la técnica de Timm en la región SOSP para el grupo donde se microinfundió la NT-3 en comparación a los otros grupos. El ANOVA del área relativa (SOSP/SL) obtenida de las medidas de ambos protocolos de análisis densitométrico, también mostró que el grupo NT-

3 fue significativamente diferente a los otros grupos ($F_{3,20} = 33.017$, $P < 0.001$). El análisis post-hoc de Fisher mostró que el grupo NT-3 presentó un aumento significativo en la proporción del área SOSP positiva a Timm con respecto al área SL ($p < 0.001$).

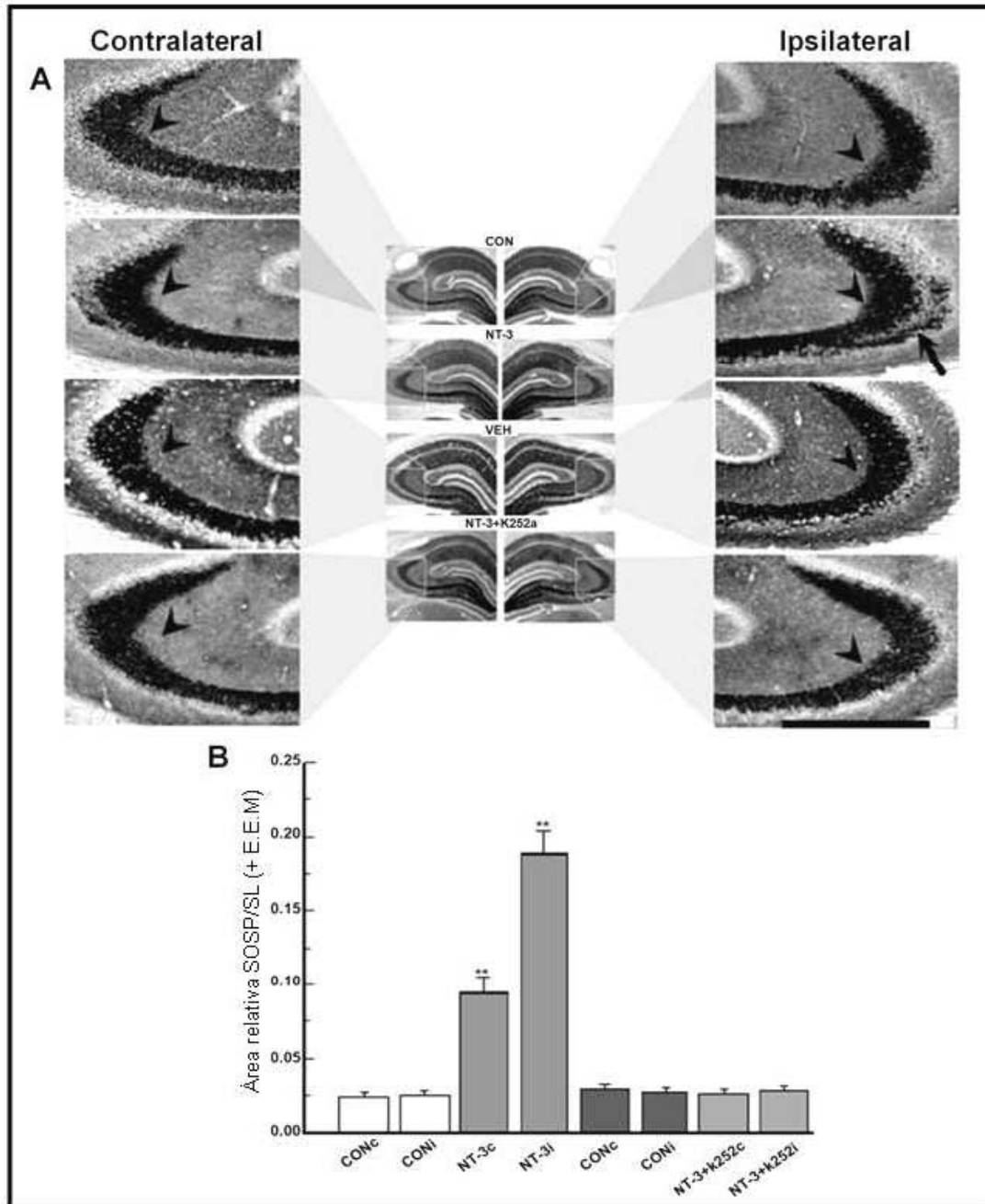


Figura 15. La NT-3 induce reorganización sináptica de las fibras musgosas. (A) Secciones coronales (40 μ m) de los hipocampos dorsales observadas al microscopio (4x y 10x) procesados por la técnica histoquímica de Timm provenientes de los siguientes grupos: Control intacto (CON), grupo NT3; grupo control de microinfusión (VEH); y el grupo NT3+K252; Las flechas indican la región del estrato oriens. (B) Análisis densitométrico de la reorganización morfológica de las fibras musgosas hipocampales. La gráfica muestra el área relativa (SOSP/SL) del área teñida con Timm en el CA3 del hipocampo dorsal de todos los grupos, obtenida a través de las densitometrías realizadas con el programa Scion Image. ** $p < 0.001$; Barra de escala: 0.5 mm; c, contralateral; i, ipsilateral.

9.2. Segunda fase: La NT-3 produce un efecto metaplástico que resulta en un bloqueo de la LTP inducida por HFS

9.2.1. Resultados electrofisiológicos

Los experimentos diseñados para analizar el efecto de la NT-3 en la inducción subsecuente de LTP por HFS revelaron que la presencia de NT-3 obstruye la inducción de LTP originada por HFS, por lo menos durante tres horas post-estimulación (figura 16), registrando un incremento promedio en la pendiente de 99.01 ± 0.28 , la cual mostró diferencias significativas respecto al resto de los grupos ($p < 0.001$). Para el grupo control de microinfusión se administró la sustancia vehículo (PBS, 2 μ l) y en este grupo la HFS indujo LTP obteniendo un incremento porcentual en la pendiente de 142.39 ± 1.04 ($p < 0.001$) (figura 16). La microinfusión de NT-3+K252a (figura 18) bloqueó el efecto del NT-3 en la LTP, obteniendo un incremento porcentual en la pendiente de 140.85 ± 0.84 , enfatizando la participación de los receptores Trk en las acciones efectuadas por la NT-3. El ANOVA de medidas repetidas para los incrementos en la pendiente de los PPSE entre estos grupos mostró diferencias significativas entre los grupos ($F_{3,31} = 55.23$; $p < 0.001$). El análisis post-hoc realizado con la prueba de Fisher reveló diferencias significativas entre el grupo NT-3+HFS con respecto a los demás grupos; mientras que los grupos HFS, VEH+HFS y NT3+K252+HFS no mostraron diferencias entre ellos ($p < 0.001$).

8.2.2. Resultados histológicos

El análisis histológico reveló que siete días después de la estimulación de alta frecuencia capaz de inducir LTP, se indujo una reorganización en la región infrapiramidal del estrato oriens del área CA3 hipocampal, en los grupos procesados electrofisiológicamente (figura 17A). La reorganización sináptica para los grupos HFS y VEH fue preponderantemente contralateral al área de estimulación (figura 19A). Mientras que, la presencia de NT3+HFS modificó este patrón de reorganización sináptica, acentuando su carácter bilateral (figura 19A). Esto revela que en los animales microinfectados con NT-3 y sometidos a la estimulación tetánica, el campo terminal de las fibras musgosas se extendió hacia las dendritas basales del

área CA3 de forma bilateral. Se muestra que en el grupo NT3+K252+HFS se bloquea el efecto producido por la NT-3, mostrando un patrón predominantemente contralateral de la reorganización de las fibras musgosas (figura 17A).

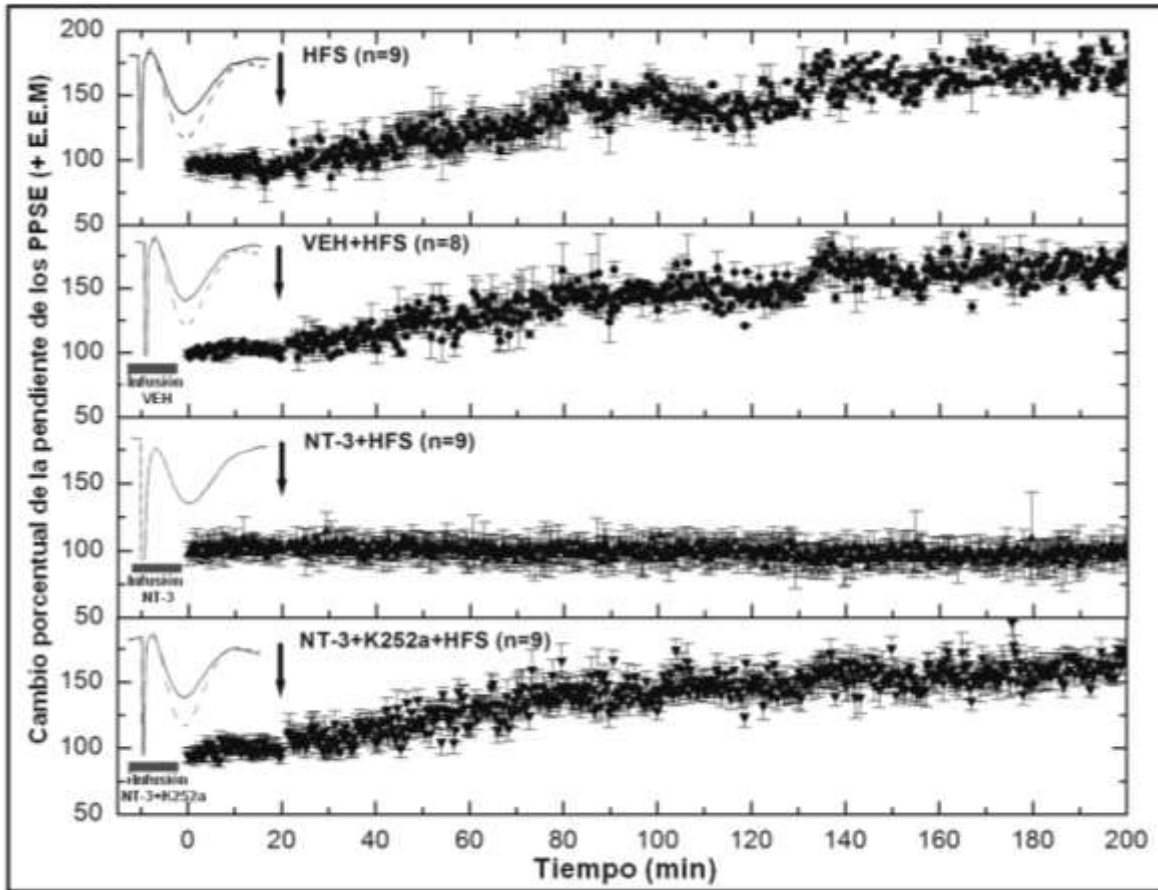


Figura 16. La NT-3 bloquea la subsecuente inducción de HFS en las fibras musgosas. Se observa el cambio porcentual de la pendiente de los PPSE de campo durante 20 minutos de línea base, seguida por la aplicación de trenes de estimulación tetánica (flecha); de animales en los que se realizó un microinfusión de PBS (VEH), NT-3 y NT-3+K252a seguida de HFS. Puede observarse que la NT-3 bloquea la inducción de LTP al menos por 3 hrs post-estimulación; y este efecto se bloquea ante la presencia del inhibidor de los receptores Trk, K252a. Los trazos en líneas continuas corresponden a las señales representativas obtenidas durante la línea base para cada experimento y las líneas discontinuas muestran las señales representativas para el registro posterior a la microinfusión. Las barras indican el periodo de infusión. Las flechas indican la HFS (3 trenes de 100Hz/1 s con intervalo de 20s intertren).

El análisis densitométrico mostró diferencias significativas ($F_{4,25} = 65.12$ $p < .001$) para el grupo NT3+HFS en comparación con el resto de los grupos en ambos lados (contra e ipsilateral de la estimulación). Para el grupo HFS se corrobora lo reportado en la literatura previamente, una reorganización hacia el estrato oriens del área CA3 hipocampal prominentemente contralateral al sitio de estimulación (Escobar et al. 1997), lo cual se presenta de de manera similar para los grupos VEH+HFS y NT3+K252+HFS (figura 17B).

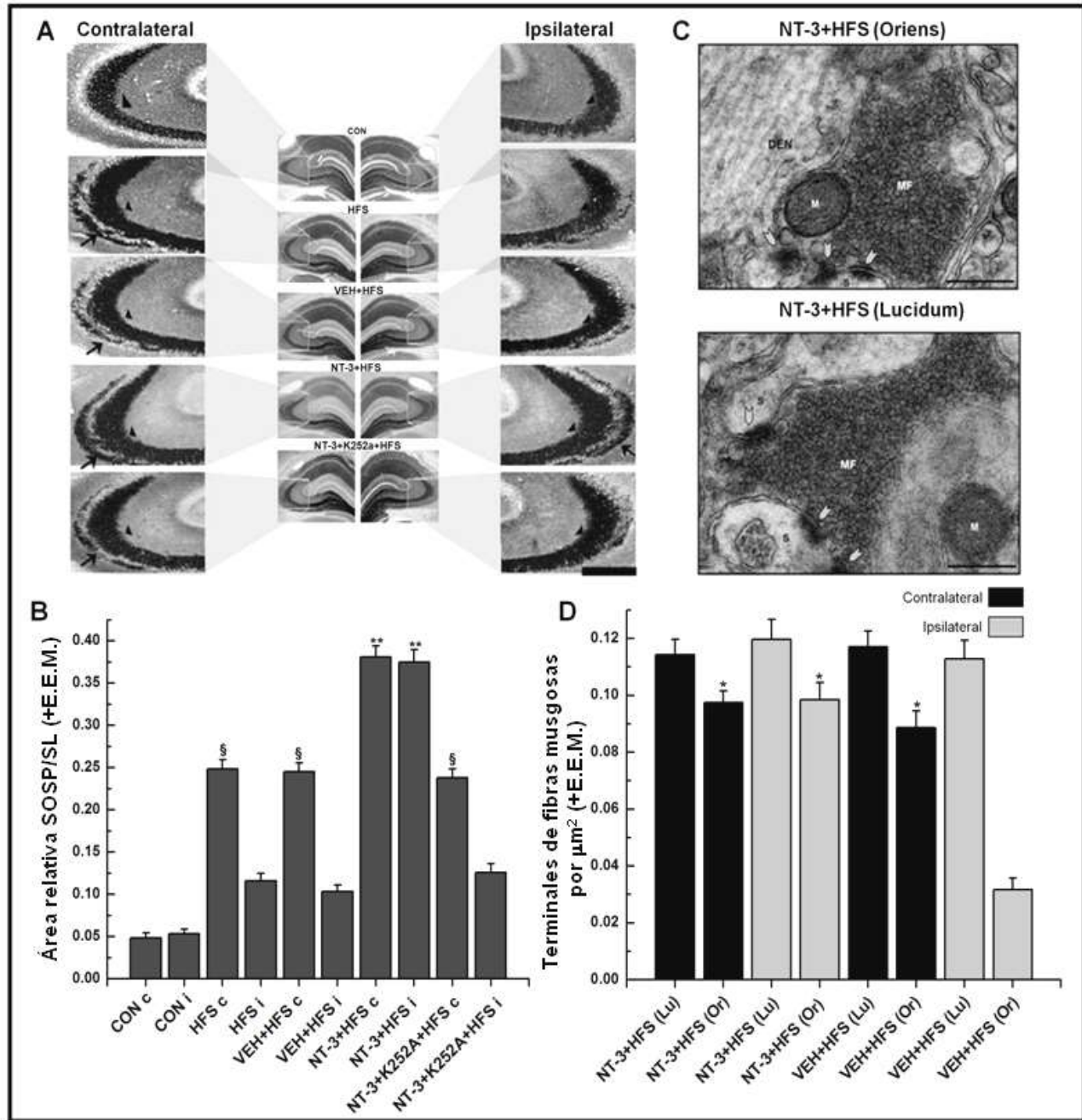


Figura 17. Efectos de la microinfusión de NT-3 en la reorganización sináptica inducida por HFS de las fibras musgosas. (A) Secciones coronales ($40\mu\text{m}$) de los hipocampos dorsales observadas al microscopio (4x y 10x) procesados por la técnica histoquímica de Timm provenientes de los siguientes grupos: Control intacto (CON); grupo HFS; grupo VEH+HFS; grupo NT-3+HFS; y el grupo NT3+K252+HFS. Las flechas indican la región del estrato oriens. (B) Análisis densitométricos de la reorganización morfológica de las fibras musgosas hipocámpales. La gráfica muestra el área relativa (SOSP/SL) del área teñida con Timm en el CA3 del hipocampo dorsal de todos los grupos, obtenida a través de las densitometrías realizadas con el programa Scion Image. $**p < 0.001$; Barra de escala: 0.5 mm; c, contralateral; i, ipsilateral. (C) Micrografías electrónicas de las fibras musgosas en animales infundidos con NT-3. A) Imágenes en donde se observan los botones de las fibras musgosas que presentan sus características representativas en el estrato lúcido y estrato oriens de animales microinfundidos con NT-3. (D) En la gráfica se observa el número de botones característicos de las fibras musgosas encontrados en el estrato lúcido y en el estrato oriens de ambos grupos (NT-3+HFS y VEH+HFS). Se observan diferencias para el estrato oriens ipsilateral del grupo que fue infundido con la sustancia vehículo ($P < 0.001$). Barra de escala= $1\mu\text{m}$.

9.2.3. Análisis ultraestructural

El análisis derivado de la microscopía electrónica nos permitió corroborar que la precipitación de gránulos de Timm observada en nuestros resultados histológicos previos, corresponde a la presencia de botones terminales en el estrato oriens de los grupos NT3+HFS y VEH+HFS. Estos botones establecen múltiples contactos asimétricos, usualmente con los ejes dendríticos y con las espinas dendríticas de las células piramidales, contienen vesículas claras y en ocasiones, vesículas de núcleo denso similares a los botones encontrados en el estrato lúcido (figura 17). Estas características morfológicas son prototípicas de las fibras musgosas maduras (Amaral and Dent 1981). El conteo de botones musgosos en ambos estratos mostró un incremento de éstos en el estrato oriens ipsilateral en los animales infundidos con NT-3 en comparación con los animales infundidos con el VEH. Para el lado contralateral no hubo diferencias entre los grupos NT3+HFS y el grupo VEH+HFS ($F_{3,8} = 28.65$, $P < 0.001$), confirmando nuestros hallazgos con la técnica histoquímica de Timm.

9.3. Tercera fase

9.3.1. Vías de señalización activadas por la NT-3 en la modulación de la comunicación sináptica: Resultados electrofisiológicos

Con el fin de explorar los mecanismos por medio de los cuales la NT-3 ejerce sus acciones en la comunicación sináptica de las fibras musgosas hipocampales, se emplearon inhibidores para las vías PI3K-Akt y la vía de MAPKs en conjunto con la NT-3. En estos grupos no se presentaron cambios con respecto a su línea base. Se observó un incremento porcentual de 99.82 ± 0.30 y de 103.14 ± 0.90 , respectivamente (figura 18 paneles inferiores), lo que sugiere que la NT-3 modula la eficiencia sináptica de la proyección GD-CA3 a través de estas vías de señalización, ya que el grupo NT-3 presentó un aumento en el cambio porcentual de la pendiente de los PPSE de 141.35 ± 0.67 con respecto a los grupos infundidos con los inhibidores. De forma similar el grupo de NT-3 en compañía del vehículo para los inhibidores (NT-3+DMSO) presentó un incremento porcentual de 140.12 ± 0.96 . Se realizó un ANOVA de medidas repetidas para los incrementos en la pendiente de lo PPSE entre estos grupos, así

como del grupo control vehículo (VEH), que reveló diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($F_{4,34} = 49.012$; $p < 0.001$). El análisis post-hoc realizado con la prueba de Fisher mostró diferencias significativas al comparar los grupos NT-3 y NT-3+DMSO con los demás grupos; sin embargo, no se mostraron diferencias entre los grupos VEH, NT3+LY y NT3+U0126 ($p < 0.001$).

9.3.2. Resultados histológicos

El análisis histológico realizado siete días después de los registros electrofisiológicos, mostró la ausencia de reorganización sináptica en los grupos NT-3+LY y NT3+U0126, de forma similar a los grupos control (CON y VEH) (figura 19). Lo que sugiere que la NT-3 modula sus acciones tanto en la comunicación sináptica (figura 18), como en la reorganización morfológica de las fibras musgosas a través de las vías de fosfoinosítidos y de la vía de las MAPKs.

El ANOVA del promedio de la superficie del área positiva a Timm, obtenido del análisis densitométrico de SOSP y SL de cada animal, reveló diferencias significativas ($F_{4,25} = 37.163$, $P < 0.001$). El análisis post-hoc de Fisher mostró diferencias significativas ($p < 0.001$) para los grupos en los que se microinfundió la NT-3 (NT-3 y NT-3+DMSO) en comparación a los otros grupos. Cabe señalar que se observó un incremento en la reorganización sináptica en el lado ipsilateral de la estimulación, que tiene diferencias significativas respecto al lado contralateral de la microinfusión, lo cual corrobora las observaciones histológicas (figura 19).

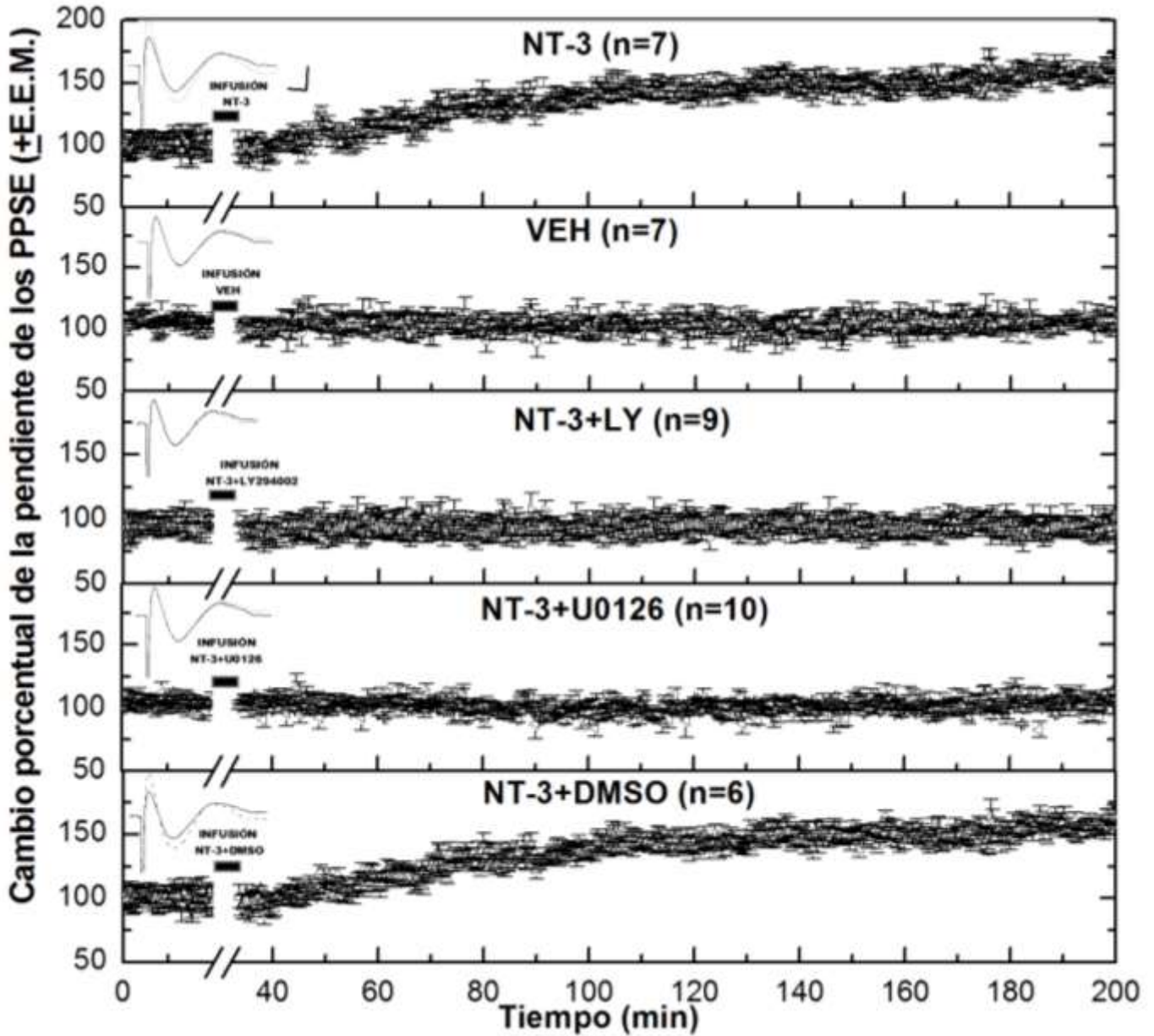


Figura 18. La NT-3 requiere de la activación de las vías de los fosfoinosítidos y de MAPKs para modular la eficiencia sináptica de las fibras musgosas. Se observa el cambio porcentual de la pendiente de los PPSE de campo durante 20 minutos de línea base, seguida por la microinfusión de la NT-3 (panel superior) se muestra el efecto de la sustancia vehículo (PBS) sobre la transmisión sináptica, donde no se observa ningún cambio significativo posterior a la microinfusión (panel central); los inhibidores para PI-3K (grupo NT-3+LY) y la vía de MAPKs (grupo NT-3+U0126) bloquean el efecto de potenciación que la NT-3 induce (paneles inferiores); el vehículo de los inhibidores en compañía de la NT-3 (NT-3+DMSO) tuvo un cambio porcentual similar al del grupo NT-3. Las barras indican el periodo de infusión (12 min).

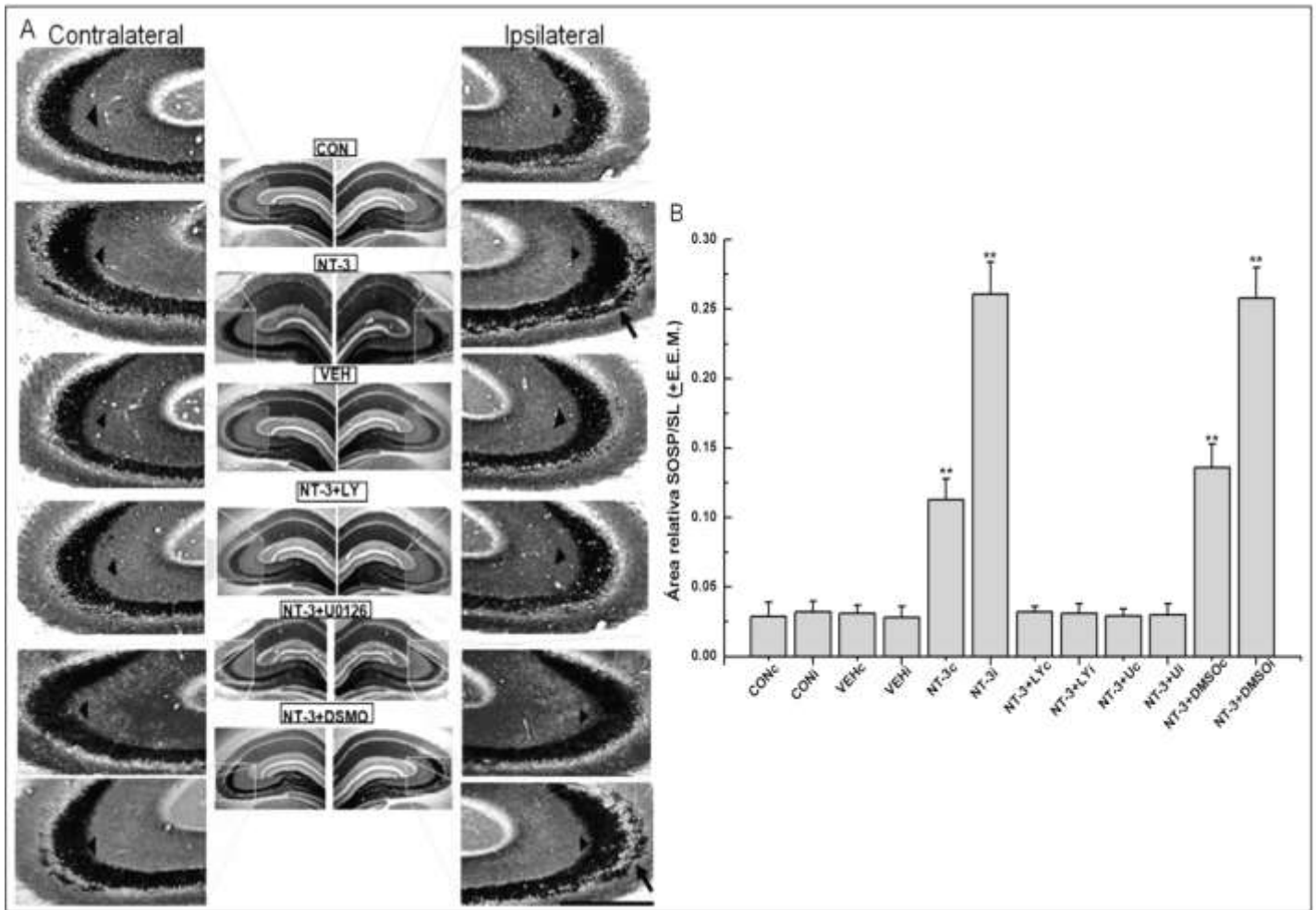


Figura 19. La NT-3 requiere de la activación de las vías de los fosfoinosítidos y de MAPKs para modular la reorganización sináptica de las fibras musgosas. (A) Secciones coronales (40µm) de los hipocampus dorsales observadas al microscopio (4x y 10x) procesadas por la técnica histoquímica de Timm provenientes de los siguientes grupos: Control intacto (CON), grupo NT3; grupo vehículo (VEH), grupo NT-3+LY, grupo NT3+U0126 y el grupo NT-3+DMSO. Las flechas indican la región del estrato oriens. (B) Análisis densitométricos de la reorganización morfológica de las fibras musgosas hipocampales. La gráfica muestra el área relativa (SOSP/SL) del área teñida con Timm en el CA3 del hipocampo dorsal de todos los grupos, obtenida a través de las densitometrías realizadas con el programa Scion Image. **p < 0.001; Barra de escala: 0.5 mm; c, contralateral; i, ipsilateral.

9.3.3. Vías de señalización activadas por la NT-3 en la modulación de inducción de subsecuente plasticidad sináptica: Resultados electrofisiológicos

Para explorar los mecanismos por medio de los cuales la NT-3 ejerce sus acciones en la subsecuente plasticidad sináptica inducida por HFS, se emplearon inhibidores para las vías PI3K-Akt (LY294002) y la vía de MAPKs (U0126) en conjunto con la NT-3. De forma similar los resultados mostrado en la segunda fase, la presencia de NT-3 obstruyó la inducción de LTP

originada por estimulación de alta frecuencia (HFS), por lo menos durante tres horas post-estimulación (figuras 18 y 20), registrando un incremento promedio en la pendiente de 100.01 ± 0.58 . En el grupo al que se administró la sustancia vehículo (grupo VEH, PBS, $2\mu\text{l}$), se observó que la estimulación de alta frecuencia indujo LTP obteniendo un incremento porcentual en la pendiente de 141.30 ± 1.02 (figura 20). De forma interesante la microinfusión de NT-3 en compañía de los inhibidores para las vías de fosfoinosítidos ($2\mu\text{g}$ de NT-3/ $2\mu\text{l}$ de LY294002) y de MAPKs ($2\mu\text{g}$ de NT-3/ $2\mu\text{l}$ de U0126), bloqueó el efecto de la neurotrofina, de modo que se indujo un incremento porcentual en la pendiente de los PPSE de 141.19 ± 0.91 para el grupo NT-3+LY+HFS y de 142.56 ± 1.15 para el grupo NT3+U0126+HFS. Finalmente en el grupo NT-3+DMSO+HFS se indujo un incremento porcentual de 101.75 ± 0.86 , sugiriendo la modulación de la NT-3 en la inducción de subsecuente plasticidad sináptica.

El ANOVA de medidas repetidas para los incrementos en la pendiente de lo PPSE entre estos grupos mostró diferencias significativas entre los grupos ($F_{5,38} = 38.745$; $p < 0.001$). El análisis post-hoc realizado con la prueba de Fisher mostró diferencias significativas al comparar los grupos NT-3+HFS y NT-3+DMSO+HFS con los demás grupos; mientras que los grupos HFS, NT3+LY+HFS, NT3+U0126+HFS y el grupo vehículo (VEH+HFS) no mostraron diferencias entre ellos ($p < 0.001$).

9.3.4. Resultados histológicos

El análisis del tejido procesado con la técnica de Timm que se realizó siete días posteriores a los registros electrofisiológicos, muestra modificaciones en los grupos infundidos con los inhibidores para las vías de fosfoinosítidos y MAPKs (NT3+LY+HFS y NT3+U0126+HFS respectivamente). En estos grupos, el patrón de reorganización bilateral con carácter predominantemente ipsilateral producido por NT-3 más HFS cambia y en su lugar se presenta un patrón predominantemente contralateral de la reorganización de las fibras musgosas (figura 21A), similar al patrón que se presenta en el grupo HFS (figura 19).

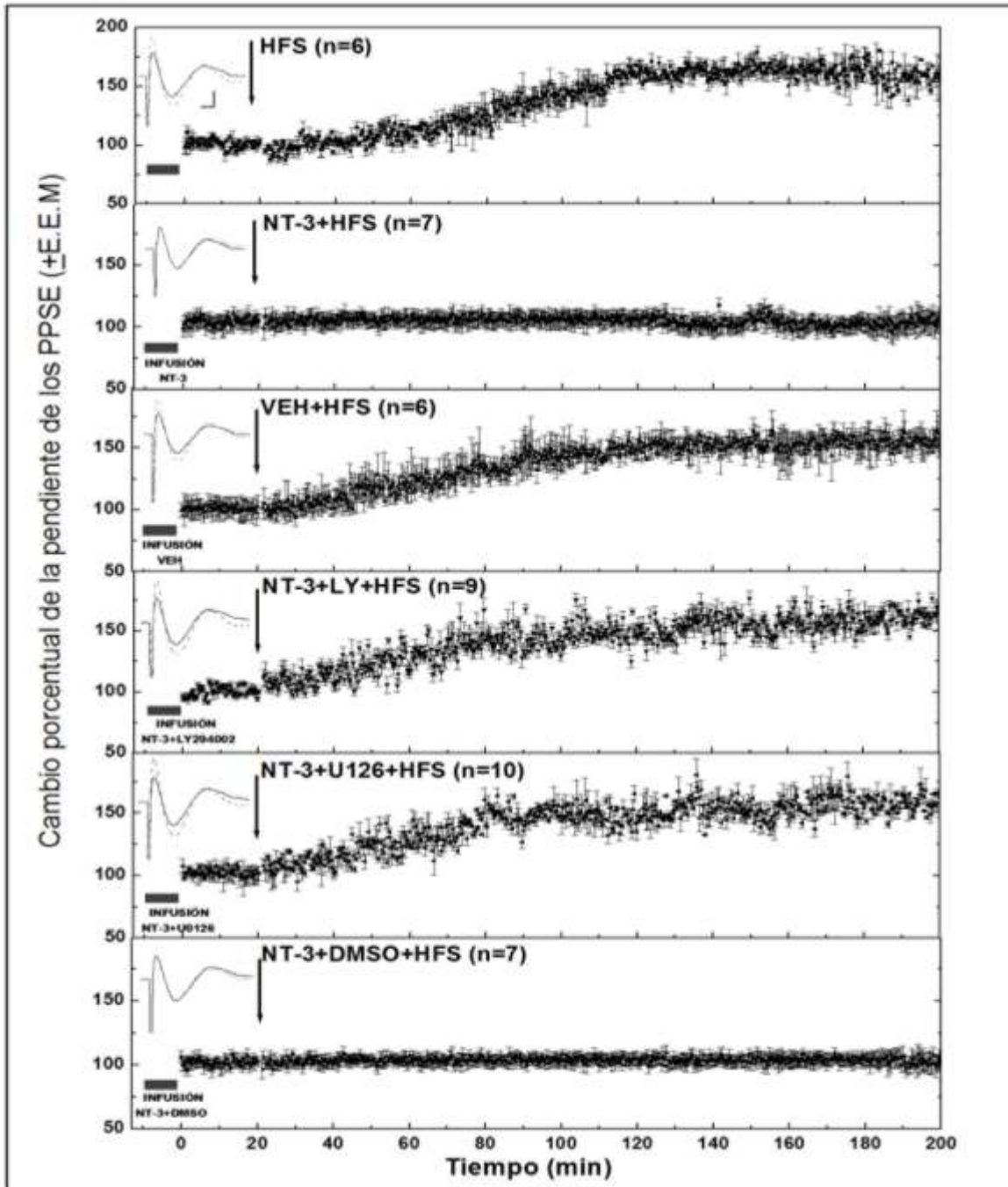


Figura 20. La NT-3 requiere de la activación de las vías de los fosfoinosítidos y de MAPKs para bloquear la subsecuente inducción de HFS en las fibras musgosas. Se observa el cambio porcentual de la pendiente de los PPSE de campo durante 20 minutos de línea base, seguida por la aplicación de trenes de estimulación de alta frecuencia (HFS, flecha) de animales en los que se realizó un microinfusión de PBS (VEH), NT-3, NT-3+LY, NT-3+U0126 y NT-3+DMSO. Puede observarse que la NT-3 bloquea la inducción de LTP al menos por 3 hrs post-estimulación y este efecto es bloqueado debido a la presencia de los inhibidores para la proteína PI3-K y la vía de MAPKs. En el grupo NT-3+DMSO+HFS se muestra una respuesta similar al grupo NT-3+HFS. Los trazos en líneas continuas corresponden a las señales representativas obtenidas durante la línea base para cada experimento y las líneas discontinuas muestran las señales representativas para el registro posterior a la microinfusión. Las barras indican el periodo de infusión. Las flechas indican la HFS (3 trenes de 100Hz/1 s con intervalo de 20s intertren).

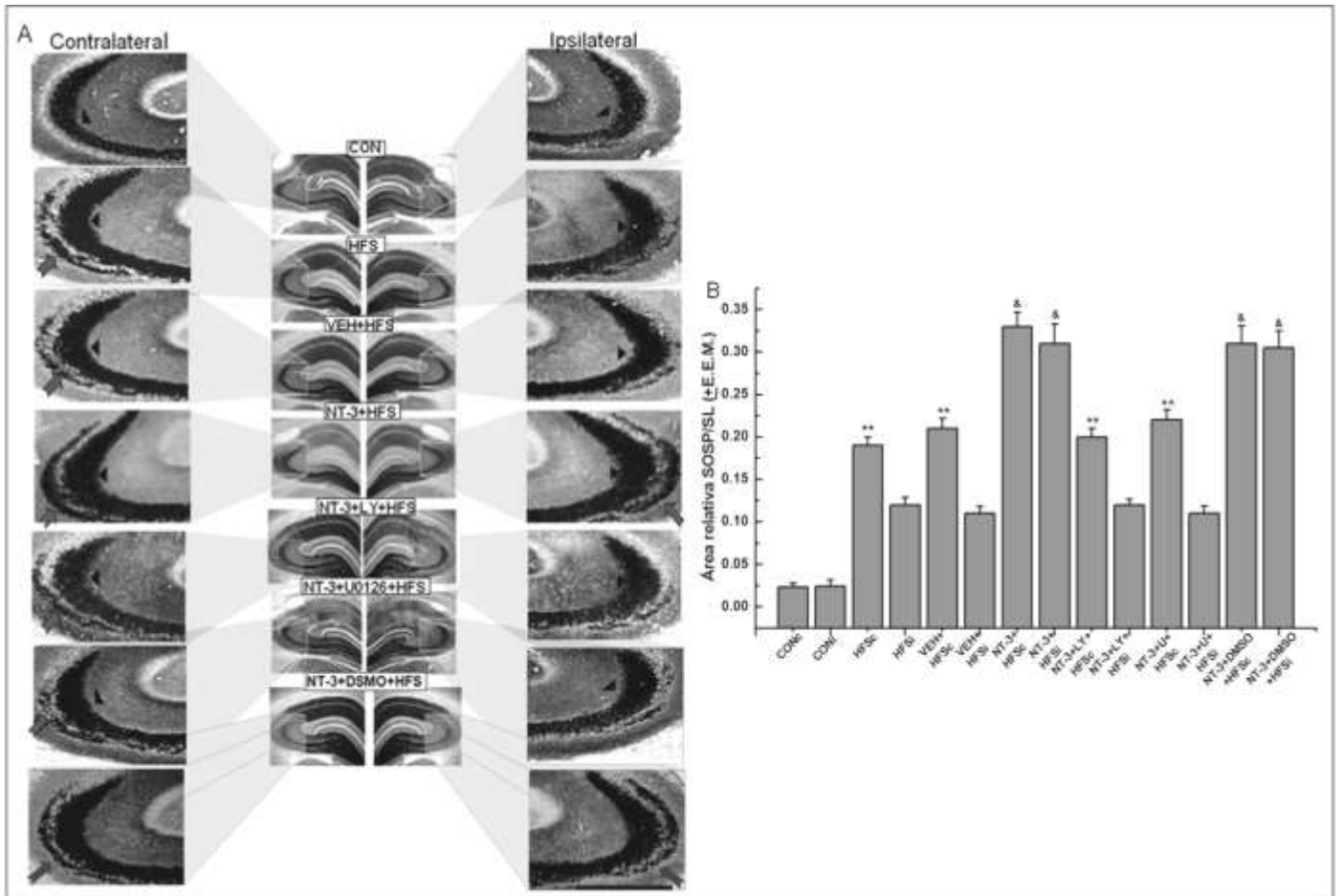


Figura 21. La NT-3 requiere de la activación de las vías de los fosfoinosítidos y de MAPKs para modificar el patrón de reorganización sináptica inducida por la subsecuente inducción de HFS en las fibras musgosas. (A) Secciones coronales (40µm) de los hipocampos dorsales observadas al microscopio (4x y 10x) procesadas por la técnica histoquímica de Timm provenientes de los siguientes grupos: Control intacto (CON); HFS; NT-3+HFS; VEH+HFS; NT3+LY+HFS, NT3+U0126+HFS y NT-3+DMSO+HFS. Las flechas indican la región del estrato oriens y las cabezas de flecha indican la región del estrato lúcido. Escala de la barra 0.5mm. (B). La gráfica muestra el área positiva a Timm en el estrato oriens del área CA3, las letras “c” o “i” indican las medidas contra e ipsilateral del lado de la estimulación, respectivamente. $p < 0.001$. Escala de las barras 0.5mm. ** Diferencia significativa respecto al lado ipsilateral; & diferencia significativa con respecto al resto de los grupos.

El análisis densitométrico muestra diferencias significativas ($F_{6,35} = 42.929$ $p < .001$) para los grupos NT3+HFS y NT-3+DMSO+HFS en comparación con el resto de los grupos en ambos lados (contra e ipsilateral de la estimulación). Los grupos NT3+LY+HFS y NT3+U0126+HFS mostraron un patrón de reorganización similar al que presenta el grupo HFS (prominentemente contralateral al sitio de estimulación) (figura 21B), lo que sugiere que la NT-3 requiere de las vías de los fosfoinosítidos y de MAPKs para modificar el patrón de reorganización sináptica inducida por la subsecuente inducción de HFS en las fibras musgosas.

10. DISCUSIÓN

En las últimas décadas dentro del campo de la neurociencia cognitiva, los investigadores han trabajado de manera interdisciplinaria para buscar los substratos biológicos de procesos como la percepción, el lenguaje, el aprendizaje, la memoria e incluso la conciencia. Dentro de éstos, las investigaciones sobre el aprendizaje y la memoria han tenido importantes avances y han brindado la oportunidad de adentrarse en el análisis de los mecanismos moleculares de estos procesos.

El aprendizaje es el proceso por medio del cual adquirimos información, mientras que la memoria se define como el proceso por medio del cual recordamos lo que hemos aprendido. Estos procesos requieren de la adaptación de los circuitos cerebrales al ambiente conforme vamos adquiriendo nuevas experiencias, permitiendo almacenarlas por largos períodos y recuperarlas cuando nos son necesarias. Es por esto que estos dos procesos son considerados como la base de nuestra individualidad (Kandel y Hawkins, 1992).

Desde los estudios pioneros de Ramón y Cajal (1886), se propone que la información se almacena en nuestro cerebro por medio de cambios anatómicos en la fortaleza de las conexiones nerviosas (citado por DeFelipe, 2006). En la actualidad, las evidencias de que las conexiones nerviosas se modifican como consecuencia de la actividad a la que es sometido, se han vuelto fundamentales para explicar cómo los organismos almacenan información procedente de la interacción con su medio ambiente. Las investigaciones a este respecto, han podido identificar algunas moléculas esenciales que dan lugar a la formación y consolidación de la información (Lamprecht y LeDoux, 2004). Dentro de estas moléculas se encuentran las neurotrofinas, las cuales han sido propuestas como reguladores clave de las modificaciones funcionales y morfológicas que son esenciales para la consolidación sináptica (Poo, 2001; Reichardt, 2006). Durante la última década se ha estudiado la participación de la Neurotrofina-3 en la plasticidad sináptica tanto en el SN central como periférico, elucidando su función en la plasticidad sináptica (Arvanian et al., 2004; Je et al., 2006; Shimazu et al., 2006).

Las fibras musgosas del hipocampo, involucradas en los procesos de memorias declarativas, constituyen un área relevante para el estudio de modificaciones tanto funcionales como anatómicas dentro de los subsistemas del SNC. En el SNC, la expresión de NT-3 está altamente confinada al hipocampo, en particular el giro dentado (Maisonpierre et al., 1990a;

Maisonpierre et al., 1990b; Lauterborn et al., 1994). Por tanto el estudio de su participación dentro de la plasticidad sináptica de esta área es fundamental. Por ello el presente proyecto consistió en el estudio de la influencia que ejerce el NT-3 en la plasticidad funcional y morfológica de las fibras musgosas en ratas adultas, *in vivo*.

10.1. La NT-3 potencia la transmisión sináptica en la vía que va del GD al área CA3 hipocampal

Las neurotrofinas han sido propuestas como reguladores clave y mediadores de las modificaciones sinápticas de largo plazo relacionadas al mantenimiento del aprendizaje y la memoria (Reichardt, 2006). En particular la NT-3 ha emergido recientemente como un potente mediador de la plasticidad sináptica estructural y funcional. En este sentido, se ha descrito que la aplicación exógena de NT-3 induce la potenciación a largo plazo en conexiones de cultivos hipocampales adultos (Kang y Schuman, 1995; Kang y Schuman, 2000). Se ha observado que la NT-3 aumenta rápidamente la actividad neuronal e inhibe la transmisión sináptica regulada por los receptores GABA en cultivos de neuronas corticales (Kim et al., 1994). Asimismo, se ha reportado que la NT-3 induce modificaciones de corto y largo plazo en sinapsis de la unión neuromuscular en *Xenopus laevis* (Lohof et al., 1993; Wang et al., 1995; Je et al., 2005; Je et al., 2006; Je et al., 2010; Je et al., 2011), así como en la médula espinal de rata, *in vitro* (Arvanov et al. 2000). Sin embargo, existen pocas evidencias acerca del papel de NT-3 en la plasticidad sináptica en el SNC *in vivo*. Los resultados obtenidos en el presente estudio, muestran que la infusión intrahipocampal de NT-3 produce una potenciación de largo plazo en la vía que va del GD al área CA3, en ratas adultas anestesiadas. Estos resultados constituyen una demostración *in vivo*, de potenciación de la eficiencia sináptica inducida por ésta neurotrofina en una región considerada como un importante circuito excitador que contiene uno de los más altos niveles de NT-3 en el SNC y que está muy relacionada en la adquisición y el mantenimiento de diferentes tareas de aprendizaje.

La potenciación observada en este estudio, inducida por NT-3, se caracterizó por presentar un incremento lento de la pendiente de lo PPSE, que inició aproximadamente 20 minutos después de la infusión, estableciéndose hacia la hora post-infusión y con una duración de al menos 3 horas, lo cual concuerda con estudios previos observados en el laboratorio, en

los que se mostró que el BDNF induce potenciación en las fibras musgosas hipocampales (Gomez-Palacio-Schjetnan y Escobar, 2008). La mayoría de las formas de LTP, incluyendo la plasticidad dependiente de la sincronización de las espigas (STDP, por sus siglas en inglés), están caracterizadas por un cambio rápido en la magnitud de los PPSE. En contraste, para la potenciación de inicio lento no hay cambios en los PPSE al momento de la inducción, pero hay un incremento gradual de la fortaleza de las conexiones sinápticas. Esta potenciación de inicio lento ha sido observada tras la aplicación del agonista de los receptores a dopamina D1 y D5 (SKF38393) (Navakkode et al., 2007). Otras moléculas capaces de inducir este tipo de LTP son el BDNF, el NGF, el carbacol y la forskolina (Wieraszko et al., 1993; Auerbach y Segal, 1994; Kang y Schuman, 1995; Messaoudi et al., 2002; Navakkode et al., 2007). La LTP de inicio lento también ha sido observada tras la activación de los receptores a opioides de tipo mu (μ) en la vía de las fibras musgosas hipocampales (Derrick et al., 1991, 1992; Escobar et al., 1997; Jin y Chavkin, 1999; Harrison et al., 2002), así como en la actividad de las células de lugar posterior a la activación (Isaac et al., 2009).

El incremento en la eficiencia sináptica inducido por NT-3 en la vía que va del GD al área CA3 fue bloqueado por K252a (Berg, 1995; Escobar et al., 2003; Gomez-Palacio-Schjetnan y Escobar, 2008; Diogenes et al., 2011) un inhibidor de los receptores de tirosina cinasa que es capaz de interactuar con los receptores TrkA, TrkB y TrkC (Kase et al., 1986; Jiang et al., 2001; Lee y Chao, 2001; Messaoudi et al., 2002; Ou y Gean, 2006; Tamura et al., 2006; Kolarow et al., 2007). La inhibición farmacológica de los receptores Trk por K252a en dosis similares a las utilizadas en este estudio, bloquea los efectos producidos por las neurotrofinas en la plasticidad sináptica *in vivo* (Messaoudi et al., 1998, 2002; Jiang et al., 2001; Castillo et al., 2006; Ou y Gean, 2006; Gomez-Palacio-Schjetnan y Escobar, 2008). Como se mencionó en los antecedentes, la NT-3 se une a su receptor TrkC con alta afinidad, aunque puede interactuar con menos eficiencia con los receptores TrkB y TrkA (Lamballe et al., 1991, 1994; Squinto et al., 1991; Ip et al., 1993; Ryden e Ibanez, 1996). De modo que, en el presente estudio es posible que la NT-3 exógena active no solo a los receptores TrkC, sino también a los receptores Trk A y B, produciendo las modificaciones descritas. Los receptores TrkB y TrkC se expresan en los botones terminales de las fibras musgosas (Klein et al., 1990; Tessarollo et al., 1993) y la señalización que inducen es requerida para la formación adecuada y la maduración de los axones de dichas fibras (Otal et al., 2005).

Los mecanismos generados por la interacción NT-3/TrkC pueden regular la potenciación de largo plazo a través de la activación de proteína cinasa PI-3 (PI-3K), de la vía de PLC γ y de la síntesis de proteínas dependiente de la proteína mTOR (Je et al., 2005). Además, la NT-3 deprime la transmisión mediada por los receptores GABA-A en cultivos de neuronas corticales maduras (Kim et al., 1994). Se han descrito resultados similares en cultivos de neuronas hipotalámicas (Gao y van den Pol, 1999). De manera que, es posible que la NT-3, al menos en parte, pudiera modular la actividad gabaérgica permitiendo la potenciación de las FM. En sinapsis neuromusculares de *Xenopus laevis*, se ha descrito que la síntesis de proteínas en la presinapsis es crucial para que la NT-3 module la plasticidad sináptica de largo plazo (Je et al., 2011). Este mismo grupo de investigación describió que NT-3 modula la plasticidad funcional y estructural a través de la interacción con su receptor TrkC activando a la vía de Rap1-MAPKs y a la vía de la Ca²⁺/calmodulina cinasa IV y CREB, respectivamente (Je et al., 2006). Las acciones de las MAPKs, específicamente de la proteína cinasa regulada por una señal extracelular (ERK) han sido identificadas como activadoras del factor de iniciación eIF4E y el factor de elongación eEFa (Kelleher et al., 2004; Kanhema et al., 2006), estos últimos están relacionados con la traducción de proteínas, un requisito para la consolidación sináptica (Malenka y Bear 2004). En el presente estudio observamos que la infusión de los inhibidores para las vías de MAPKs y PI-3K en compañía a la NT-3, bloquea los efectos de esta neurotrofina, tanto en las modificaciones sinápticas como en la reorganización estructural de la vía de las fibras musgosas, lo que sugiere la participación de estas vías en las acciones de la NT-3 para modular la plasticidad sináptica.

Desde la descripción del fenómeno de la LTP se han realizado numerosas investigaciones acerca de este tipo de modificaciones plásticas en diversas áreas del SN. Estas investigaciones han mostrado que este fenómeno plástico está relacionado, no sólo con los procesos de aprendizaje y memoria, sino también con otro tipo de conductas como por ejemplo las adicciones (Berretta et al., 2008). Estos estudios han reflejado también que la LTP presenta una amplia gama de mecanismos que dependen del área en la que se induce y del tipo de estimulación por la que es inducida (Malenka y Bear, 2004). Los mecanismos que subyacen a la LTP de las fibras musgosas han sido investigados a detalle (Henze et al., 2000; Nicoll y Schmitz, 2005) aunque no se ha logrado una idea consensuada. La LTP de las FM ha sido caracterizada por un incremento inicial lento de la pendiente de los PPSE que ha sido descrito

como independiente de la activación de los receptores NMDA (debido a que no se bloquea por antagonistas de este receptor como D-APV) y con una modulación importante de péptidos opioides, en específico encefalinas y dinorfinas que inhiben a las interneuronas glutamatérgicas, lo cual permite la mayor activación de las fibras musgosas mostrando incrementos en la probabilidad de liberación del neurotransmisor (Derrick et al., 1991; Derrick et al., 1992; Escobar et al., 1997; Harrison et al., 2002; Thompson et al., 2003; Derrick, 2007; Schjetnan y Escobar, 2012). Como se ha mencionado en párrafos anteriores la activación de los receptores a péptidos opioides de tipo μ es esencial para la inducción de la LTP en esta sinapsis (Derrick et al., 1992). Asimismo, la inducción de la LTP de las FM requiere también la activación de receptores metabotrópicos a glutamato (mGluRs) (Harris y Cotman, 1986; Ito y Sugiyama, 1991; Bashir et al., 1993; Thompson et al., 2005). Sin embargo, existe evidencia en contra del papel de los receptores mGluR en la LTP de las FM *in vivo* (Mellor y Nicoll, 2001) que sugiere que estos receptores no son esenciales para este proceso, aunque probablemente intervengan como moduladores (Nicoll y Schmitz, 2005). La LTP de las fibras musgosas también involucra la activación de la proteína cinasa C (PKC) (Son et al., 1996), la cual aumenta la liberación de glutamato y dinorfina B en sinaptosomas de fibras musgosas (Terrian et al., 1991). Aunado a lo anterior, en años recientes se ha descrito una forma de LTP en las FM dependiente de la activación de los receptores NMDA que es inducida por trenes de estimulación cortos (Kwon y Castillo, 2008; Rebola et al., 2008).

A diferencia de la LTP expresada en otras áreas del SNC, se ha propuesto que la LTP en las fibras musgosas es altamente dependiente de las acciones presinápticas, mencionadas anteriormente. Una muestra de ello es que la potenciación en esta vía puede ser bloqueada por la eliminación del gen que codifica para la proteína PKA, que está involucrada ampliamente en la activación de moléculas que pertenecen al aparato de liberación del neurotransmisor (Huang et al., 1995). Sin embargo, una serie de investigaciones resaltan la participación de la activación pre y postsináptica en la LTP de esta vía, observando que requiere la introducción de calcio a la postsinapsis a través de sus canales tipo L o la elevación en sus concentraciones intracelulares a través de la activación de los receptores metabotrópicos a glutamato (Yeckel et al., 1999; Mellor y Nicoll, 2001; Sokolov et al., 2003). Las cascadas de señalización dependientes de AMPc, están involucradas también en la participación postsináptica de la LTP en las fibras musgosas (Yeckel et al., 1999). Las evidencias que muestran que el zinc, liberado en grandes

cantidades por las fibras musgosas, tiene que translocarse a las células postsinápticas del CA3 para que pueda producirse LTP, son también un ejemplo de la participación postsináptica de la LTP en esta área del hipocampo (Lu et al., 2000; Li et al., 2001). Se ha evidenciado una relación entre el zinc liberado por las fibras musgosas con la activación postsináptica de los receptores TrkB (Huang et al., 2008).

10.2. La NT-3 induce reorganización sináptica en las fibras musgosas hipocampales

Los resultados del presente estudio muestran que la potenciación de la eficiencia sináptica en la vía que va del GD al área CA3 inducida por NT-3 está acompañada por una reorganización estructural de las fibras musgosas de forma prominentemente ipsilateral; ésta reorganización se observó 7 días después de la aplicación de NT-3, tal como había sido reportado para la inducción de HFS (Escobar et al., 1997) o la infusión de BDNF (Gómez-Palacio-Schjetnan y escobar, 2008). La reorganización morfológica como resultado de la actividad es considerada como la base de la estabilización de la plasticidad sináptica (Lynch et al., 2007). Nuestros resultados muestran un incremento en el área marcada mediante la tinción histoquímica de Timm en el estrato oriens (SO) del área CA3, 7 días después de la infusión de NT-3. Un incremento en el marcaje de Timm es generalmente aceptado como evidencia de la sinaptogénesis de las FM, debido a que revela la presencia de zinc, el cual se encuentra en concentraciones elevadas en los botones de las FM (Amaral y Dent, 1981). En estudios previos, mediante análisis ultraestructural y de microscopía de fluorescencia, se ha mostrado que un incremento en el marcaje de Timm coincide con un incremento en los botones sinápticos en el SO con características similares a los botones de las FM que se encuentran en el estrato lúcido (SL) (Ramirez-Amaya et al., 1999; Henze et al., 2000; Galimberti et al., 2006; Schjetnan y Escobar, 2012).

Reorganización bilateral de esta naturaleza ha sido observada en el hipocampo de roedores después de la inyección unilateral de ácido kaínico en el hipocampo, que produce actividad epiléptica (Davenport et al., 1990; Sundstrom et al., 1993), después de inducir estimulación de alta frecuencia (HFS) en las FM en ausencia de actividad epiléptica (Escobar et al., 1997) y como consecuencia de la administración de BDNF en las FM (Gomez-Palacio-Schjetnan y Escobar, 2008). El que la reorganización de las fibras musgosas haya sido

observada de forma bilateral sugiere que la potenciación en esta vía, activa a las vías comisurales hipocampales. Estas fibras se originan de las células piramidales del área CA3 y se proyectan a través de la comisura hasta llegar al área CA3 contralateral (Wheal et al., 1983; Queiroz y Mello, 2007). Previamente se ha descrito que la coactivación de las sinapsis de las fibras musgosas a través de las aferentes comisurales, induce una LTP asociativa en las fibras musgosas (Derrick y Martinez, 1994). Adicionalmente, Bramham y cols. (1996) observaron un incremento en las respuestas comisurales después de inducir LTP bilateral que se correlaciona con la expresión bilateral de ARNm de NGF, BDNF y los receptores TrkB y TrkC (Bramham et al., 1996). Resulta importante mencionar que la activación de las células hilares excitadoras, que contribuyen a la vía comisural pueden también contribuir a la reorganización morfológica bilateral, como ha sido sugerido con anterioridad (Escobar et al., 1997; Scharfman et al., 2002). Las células musgosas son grandes neuronas bipolares que despliegan espinas dendríticas gigantes o excrescencias en sus dendritas proximales de manera similar a las neuronas piramidales del área CA3, las cuales presentan LTP (Henze et al., 2000; Lysetskiy et al., 2005). El análisis subsecuente acerca del papel de la señalización interhemisférica hipocampal, puede adentrarnos en el entendimiento de cambios plásticos como la LTP, además de la regulación de los circuitos hipocampales durante la formación de la memoria (figura 22).

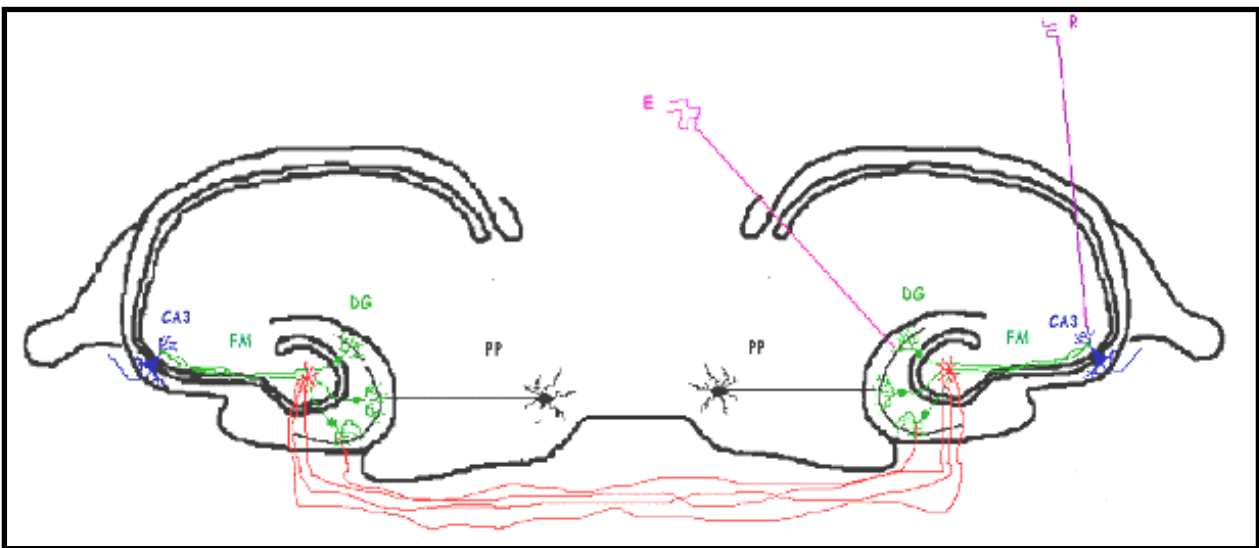


Figura 22. Principales proyecciones contralaterales de las fibras musgosas. Esquema representativo del hipocampo (corte horizontal) en donde se observan las células musgosas del giro dentado que se dirigen al giro dentado del hipocampo, haciendo contacto con las fibras musgosas contralaterales. Las fibras comisurales provenientes de las células piramidales de CA3 hacen contacto con las mismas células en la parte contralateral del CA3 atravesando ambas proyecciones por la fimbria. GD: Giro dentado; FM: fibras musgosas; E: electrodo de estimulación; R: electrodo de registro/infusión (modificado de Bramham, 1996).

Nuestros resultados también muestran que en los grupos en los que se inhibió a los receptores Trk y las vías de señalización de los fosfoinosítidos y de las MAP cinasas, la reorganización morfológica inducida por NT-3 fue bloqueada. Los mecanismos moleculares inducidos por la activación de los receptores TrkC están relacionados de forma importante con la plasticidad estructural. En este contexto, se ha descrito que la NT-3 potencia la transmisión sináptica y aumenta los niveles de sinapsina y sinaptofisina (proteínas presinápticas asociadas a la liberación de neurotransmisor) produciendo cambios en la morfología sináptica de cultivos de sinapsis neuromusculares (Wang et al., 1995). Además se ha reportado que la falta de receptores TrkC en las FM genera botones más pequeños y menos complejos, así como un número reducido de vesículas sinápticas alterando la sinaptogénesis y la maduración de los botones terminales de las FM (Martinez et al., 1998; Otal et al., 2005). En este mismo sentido, se ha descrito que la infusión intraventricular prolongada de NT-3 (12 μ g/día por 14 días) genera el brote de axones musgosos en la capa molecular interna del GD y el SO del área CA3 (Xu et al., 2002). Los estudios enfocados a analizar los mecanismos intracelulares activados por NT-3 en la plasticidad sináptica, han mostrado que se requiere de la endocitosis del complejo receptor (NT-3-TrkC) y de la activación del sustrato de PI3K (Akt o PKB) así como la síntesis de nuevas proteínas (Je et al., 2005). Aunque también se ha descrito que la NT-3 puede modular sus acciones sobre la estructura sináptica a través de la activación de la vía de MAPKs y la eficiencia sináptica mediante la vía de CaMK IV y el factor de transcripción CREB (Je et al., 2006) (Figura 12). Se ha descrito que la activación de la PI-3K tiene implicaciones importantes en la formación de nuevos contactos sinápticos funcionales en terminales neuromusculares (Jordan-Alvarez et al., 2012) y cultivos de neuronas hipocampales (Cuesto et al., 2011). Finalmente, se ha relacionado a la participación de la activación de la vía de MAPKs por neurotrofinas, principalmente BDNF, con procesos de reorganización sináptica como la sinaptogénesis (Vicario-Abejón et al., 1998; Collin et al., 2001; Tyler y Pozzo-Miller, 2001; Vicario-Abejón et al., 2002; Alonso et al., 2004). Al inhibir estas vías de señalización, en el presente estudio, se muestra que la reorganización inducida por NT-3 es bloqueada, sugiriendo la importancia de su activación para modular la plasticidad sináptica funcional y morfológica.

10.3. Acciones de la NT-3 en los procesos metaplásticos en la vía que va del GD al área CA3

A lo largo de nuestra vida, adquirimos innumerables experiencias que modulan nuestro comportamiento. El SN tiene la capacidad de almacenar estas experiencias modificando las propiedades de sus conexiones nerviosas; teniendo la capacidad de modularlas, clasificarlas y recuperarlas con el fin de que podamos tener un comportamiento acorde al entorno y a nuestra historia. Por ello se ha postulado que el SN tiene mecanismos que modulan la plasticidad sináptica manteniendo un estado que le permitirá seguir adquiriendo información. Los cambios en la eficiencia sináptica y la morfología son ejemplos de las modificaciones versátiles que ocurren en las sinapsis como resultado de la actividad. Se ha propuesto que las formas Hebbianas de plasticidad pueden requerir algunos tipos de regulación homeostática para preservar su adecuada función (Davis, 2006; Nelson y Turrigiano, 2008). Las formas de plasticidad homeostática pueden proveer una regulación global necesaria para mantener la fortaleza sináptica y la plasticidad en un rango dinámico funcional. Estas formas de plasticidad operan mediante diversos mecanismos, por ejemplo modificando la habilidad de las sinapsis para presentar modificaciones Hebbianas subsecuentes (metaplasticidad), lo cual se considera que no solo es esencial para mantener a las sinapsis dentro de un rango dinámico funcional, sino también que se requiere para el mantenimiento de la memoria (Abbott y Nelson, 2000; Perez-Otano y Ehlers, 2005; Abraham, 2008). En este contexto y considerando los efectos de la NT-3 en la eficiencia sináptica y en la morfología, en el presente proyecto, se utilizó una infusión intrahippocampal de NT-3 para analizar sus efectos en la funcionalidad a largo plazo y en la reorganización sináptica morfológica inducida por subsecuente estimulación de alta frecuencia, suficiente para inducir LTP en la vía de las fibras musgosas de ratas adultas *in vivo*. Nuestros resultados muestran que la NT-3 inicia una serie de mecanismos reguladores que modifican la habilidad de las FM para presentar LTP inducida por HFS.

Se ha propuesto que algunas neurotrofinas como el BDNF podrían comandar algunas de las acciones esenciales que regulan la inducción de subsecuente plasticidad sináptica (Nelson y Turrigiano, 2008). Recientemente, estudios de nuestro laboratorio mostraron que el BDNF modifica la plasticidad sináptica funcional inducida por HFS en las sinapsis de las FM *in vivo* (Schjetnan y Escobar, 2012). En el presente estudio se mostró que la infusión de NT-3 produce un efecto metaplástico que se expresa en el bloqueo de la inducción de LTP inducida por HFS

cuando ésta última es aplicada 20 minutos después de la infusión de NT-3, antes de que la potenciación inducida por la NT-3 haya iniciado. Estos resultados apoyan estudios previos en los que se muestra que estímulos de baja frecuencia (10Hz) en la vía de las colaterales de Schaffer pueden inhibir la inducción posterior de LTP (Fujii et al., 1991; Huang et al., 1992). Estos resultados enfatizan la importancia de que el estado de actividad de una red es un determinante crítico de la magnitud del cambio metaplástico producido. En la vía perforante lateral se ha reportado que la LTP está asociada a una reducción de la facilitación de pulsos pareados que se mantiene al menos una hora posterior a la inducción de la LTP (Christie y Abraham, 1994). Estudios similares han mostrado que en la corteza motora, la LTP es bloqueada en animales previamente entrenados en una tarea dependiente de aprendizaje motor (Rioult-Pedotti et al., 2007), asimismo en la corteza insular, la LTP no se presenta en animales previamente entrenados al condicionamiento aversivo a los sabores (CAS) (Rodríguez-Durán et al., 2011). Estos estudios en conjunto a nuestros resultados sugieren que la estimulación previa, relevante para una vía determinada, inicia eventos metaplásticos que modifican su capacidad posterior para producir plasticidad sináptica.

La identidad molecular que subyace a la metaplasticidad no ha sido del todo esclarecida. Una serie de experimentos llevados a cabo en la corteza visual han mostrado que en animales expuestos a la oscuridad, los umbrales de inducción de LTP y LTD son modificados, en parte debido a la modulación generada por la composición de las subunidades del receptor NMDA y a las diferentes corrientes de calcio producidas (Philpot et al., 2003; Quinlan et al., 2004). Las evidencias actuales sugieren que varios sensores dependientes de calcio podrían regular el tráfico de los receptores de glutamato y así aumentar o disminuir la acumulación de éstos en los sitios sinápticos (Nelson y Turrigiano, 2008). El efecto metaplástico observado en el presente estudio fue bloqueado por infusión de K252a, sugiriendo que la NT-3 es importante en la respuesta de las FM a la subsecuente plasticidad sináptica y que esta modulación se da a través de sus receptores Trk. Además como se muestra en la tercera fase, la inhibición farmacológica de las vías de señalización de fosfoinosítidos y MAPKs bloquea el efecto de NT-3, sugiriendo la participación de estas vías para ejercer las acciones de la neurotrofina en las expresiones de plasticidad homeostática. Respecto al papel de los receptores Trk, se ha observado que la sobreexpresión de TrkC aumenta la actividad sináptica y la LTP en la vía de las colaterales de Schaffer, generando aumentos significativos en las subunidades del receptor

NMDA (Sahun et al., 2007), la activación de este receptor es considerada una clave para modular la inducción de la plasticidad sináptica subsecuente (Yashiro y Philpot, 2008). Además la NT-3 incrementa los PPSE monosinápticos mediados por los receptores AMPA en motoneuronas y esta acción requiere la disponibilidad de funcional de los receptores de NMDA (Arvanov et al., 2000; Arvanian et al., 2004). Los receptores a glutamato tipo AMPA y NMDA se han considerado como reguladores de la respuesta sináptica a la inducción posterior de plasticidad y se ha sugerido que subyacen los mecanismos homeostáticos que permiten la integración sináptica (Abraham, 2008). Recientemente, las investigaciones en torno a los mecanismos celulares de la metaplasticidad tanto funcional como estructural se han apoyado de herramientas de biología molecular, revelando la importancia de factores de transcripción y de procesos epigenéticos en la modulación homeostática de las conexiones sinápticas (Chen et al., 2012; Baker-Andresen et al., 2013).

10.4. La NT-3 modifica el patrón de reorganización sináptica inducido por estimulación de alta frecuencia en las fibras musgosas hipocampales

La plasticidad sináptica estructural que resulta de la actividad, ha sido propuesta como una de las bases para la consolidación sináptica (Lynch et al. 2007). En este sentido, la modulación de las modificaciones estructurales en respuesta a actividad previa, es de particular interés para la comprensión de los procesos metaplásticos. Los resultados de la presente tesis muestran que la infusión *in vivo* de la NT-3 previa a la aplicación de HFS en la vía que va del GD al área CA3 modifica el patrón de reorganización sináptica observado cuando solo se aplica HFS, presentando una reorganización bilateral pronunciada en el SOSP del área CA3. Como se mencionó en líneas anteriores, la reorganización bilateral de esta naturaleza, ha sido observada después de infundir ácido kaínico (Davenport et al., 1990; Sundstrom et al., 1993), de recibir HFS (Escobar et al., 1997) y después de la microinfusión intrahipocampal de BDNF (Gomez-Palacio-Schjetnan y Escobar, 2008). Los resultados del presente proyecto, obtenidos mediante microscopía electrónica, corroboran un incremento en las terminales sinápticas de las fibras musgosas hacia el estrato oriens en las ratas infundidas con NT-3, y estos botones terminales presentan características similares a los que se observan en el estrato lúcido. Recientemente, un estudio mostró que tras inducir LTP de forma química en las fibras musgosas, se inducen

cambios morfológicos en sus botones y en los sitios postsinápticos, encontrando un mayor número de zonas activas (Zhao et al., 2012). Nuestros resultados muestran que las terminales de las fibras musgosas encontradas *de novo* por los efectos de la NT-3, contienen vesículas claras, algunas vesículas de núcleo denso, y varias densidades sinápticas, las cuales son características fundamentales de los botones musgosos maduros (Amaral y Dent, 1981; Faulkner et al., 2008). Esto sugiere que la NT-3, seguida por HFS inicia una redistribución homeostática de las sinapsis. Aunque se ha propuesto que la reorganización estructural de las sinapsis puede ser producida como una consecuencia de la plasticidad homeostática, la dinámica de las modificaciones estructurales relacionadas a la plasticidad homeostática ha sido escasamente abordada en la investigación (Butz et al., 2009).

Algunos estudios sobre aumentos en la plasticidad estructural como resultado de actividad previa coinciden con los resultados del presente proyecto. En este contexto, un estudio realizado por Harms y cols. 2008 se reportó un incremento en el tamaño de las espinas dendríticas de la corteza motora primaria cuando la LTP había sido bloqueada por el previo entrenamiento en una tarea motora (Harms et al., 2008). Además, se ha descrito que la infusión crónica de NT-3 induce un rebrote axonal que se acompaña de una regulación a la baja de los receptores TrkA y TrkC (Xu et al., 2002). De forma interesante, la NT-3 regula el incremento en la frecuencia y amplitud de las corrientes postsinápticas excitadoras miniatura (CPSEm) dependientes de la infusión de BDNF en cultivos de neuronas hipocámpales (Paul et al., 2001). Aunado a lo anterior, se ha descrito que existen interacciones recíprocas entre las acciones de las neurotrofinas, especialmente las que existen entre el BDNF y la NT-3 tienen un papel importante en la maduración dependiente de la actividad en sistemas corticales (McAllister et al., 1997; Yamamoto y Hanamura, 2005), y generan incrementos recíprocos en los niveles de ARNm de estas neurotrofinas en la corteza (Xiong et al., 2002, Patz y Wahle, 2004). Finalmente se ha reportado que la infusión de NT-3 disminuye los niveles de ARNm para BDNF, así como la expresión de la proteína en nervios sensoriales (Karchewski et al., 2002) y en el hipocampo (Ullal et al., 2007). En estudios posteriores sería importante analizar si estas interacciones recíprocas entre estas neurotrofinas tienen injerencias en la metaplasticidad.

11. CONCLUSIONES

El dilucidar los mecanismos celulares que subyacen a los procesos de aprendizaje y memoria, nos brinda una concepción más clara de la génesis del comportamiento de los seres vivos. De forma que, la potencialidad de las neurotrofinas para modular la transmisión sináptica y las modificaciones estructurales derivadas de ésta, representa una valiosa herramienta para esclarecer los eventos celulares implicados en la adquisición y almacenamiento de información. Los resultados de este estudio, muestran que la NT-3 induce una potenciación de la eficiencia sináptica de larga duración que es dependiente de la activación de su receptor TrkC, así como de las vías de señalización de las MAP cinasas y de los fosfoinosítidos. Estas modificaciones funcionales están acompañadas por la formación de nuevos botones sinápticos, presentes 7 días después de la infusión de la neurotrofina, localizados en el estrato oriens del área CA3. Los cambios inducidos por la NT-3 en las fibras musgosas muestran que esta neurotrofina puede producir modificaciones plásticas de larga duración estrechamente relacionadas con la consolidación de la información, en un área fundamental para la memoria. Aunado a esto, en el presente proyecto se observó que la NT-3 modifica la inducción de subsecuente plasticidad sináptica a través de la activación de su receptor TrkC y también de las vías de las MAPKs y de los fosfoinosítidos. Finalmente se observó que la infusión de esta neurotrofina seguida de la estimulación de alta frecuencia modifica el patrón de reorganización e incrementa la densidad de nuevos botones encontrados tras la inducción de potenciación de largo plazo. En conjunto, los resultados derivados de este proyecto indican que la NT-3 tiene un papel importante como modulador de los cambios plásticos de larga duración que subyacen a la consolidación sináptica en las fibras musgosas hipocampales. Finalmente los resultados indican que las acciones de la NT-3 modifican la habilidad para presentar una subsecuente plasticidad sináptica, un mecanismo considerado esencial para mantener al SN en un estado de homeostasis, que le permite seguir adquiriendo y almacenando información.

12. REFERENCIAS

- Abbott, L.F. and Nelson, S.B. (2000). "Synaptic plasticity: taming the beast." Nat. Neurosci., **3**(Suppl): 1178–1183.
- Abraham, W. C. (2008). "Metaplasticity: tuning synapses and networks for plasticity." Nat Rev Neurosci **9**(5): 387.
- Adams, B., M. Lee, et al. (1997). "Long-term potentiation trains induce mossy fiber sprouting." Brain Res **775**(1-2): 193-7.
- Alonso, M., J.H. Medina, et al. (2004). "ERK1/2 activation is necessary for BDNF to increase dendritic spine density in hippocampal CA1 pyramidal neurons." Learn Mem **11**(2): 172-78.
- Amaral, D. G. and J. A. Dent (1981). "Development of the mossy fibers of the dentate gyrus: I. A light and electron microscopic study of the mossy fibers and their expansions." J Comp Neurol **195**(1): 51-86.
- Andersen, P. S., R. G. Morris, et al., Eds. (2007). The hippocampus book. New York, Oxford University Press.
- Arvanian, V. L., W. J. Bowers, et al. (2004). "Viral delivery of NR2D subunits reduces Mg²⁺ block of NMDA receptor and restores NT-3-induced potentiation of AMPA-kainate responses in maturing rat motoneurons." J Neurophysiol **92**(4): 2394-404.
- Arvanov, V. L., B. S. Seebach, et al. (2000). "NT-3 evokes an LTP-like facilitation of AMPA/kainate receptor-mediated synaptic transmission in the neonatal rat spinal cord." J Neurophysiol **84**(2): 752-8.
- Auerbach, J.M. and M. Segal (1994). "A novel cholinergic induction of long term potentiation in rat hippocampus." J. Neurophysiol **72**(4): 2034–40.
- Baker-Andresen, D., V.S. Ratnu, T.W. Bredy (2013). "Dynamic DNA methylation: prime candidate for genomic metaplasticity and behavioral adaptation." Trends Neurosci **36**(1):3-13.
- Bashir, Z.I., Z.A. Bortolotto et al. (1993). "Induction of LTP in the hippocampus needs synaptic activation of glutamate metabotropic receptors." Nature, **363**(6427): 347–50.
- Bear, M. F. (1996). "A synaptic basis for memory storage in the cerebral cortex." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(24): 13453-9.
- Bear, M. F. (2003). "Bidirectional synaptic plasticity: from theory to reality." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **358**(1432): 649-55.
- Berg, M. M., D. W. Sternberg, et al. (1992). "K-252a inhibits nerve growth factor-induced trk proto-oncogene tyrosine phosphorylation and kinase activity." J Biol Chem **267**(1): 13-16.
- Berretta, N., R. Nistico, et al. (2008). "Synaptic plasticity in the basal ganglia: a similar code for physiological and pathological conditions." Prog Neurobiol **84**(4): 343-62.
- Bienenstock, E. L., L. N. Cooper, et al. (1982). "Theory for the development of neuron selectivity: orientation specificity and binocular interaction in visual cortex." J Neurosci **2**(1): 32-48.
- Bliss, T. V. and S.F. Cooke (2011) "Long term potentiation and long-term depression: a clinical perspective." Clinics (Sao Paulo) **66** Suppl 1:3-17.

- Bramham, C. R., T. Southard, et al. (1996). "Unilateral LTP triggers bilateral increases in hippocampal neurotrophin and trk receptor mRNA expression in behaving rats: evidence for interhemispheric communication." J Comp Neurol **368**(3): 371-82.
- Butz, M., F. Worgotter, et al. (2009). "Activity-dependent structural plasticity." Brain Res Rev **60**(2): 287-305.
- Calixto, E., E. Thiels, et al. (2003). "Early maintenance of hippocampal mossy fiber--long-term potentiation depends on protein and RNA synthesis and presynaptic granule cell integrity." J Neurosci **23**(12): 4842-9.
- Castillo, D.V., Figueroa-Guzman, Y. Escobar, M.L. (2006). "Brain-derived neurotrophic factor enhances conditioned taste aversion retention." Brain Res., **1067**(1): 250–55.
- Chao, M. V. (2003). "Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways." Nat Rev Neurosci **4**(4): 299-309.
- Chen, S.X., A. Cherry, et al. (2012). "The transcription factor MEF2 directs developmental visually driven functional and structural metaplasticity." Cell **151**(1):41-55.
- Christie, B.R. and W.C. Abraham (1994). "Differential regulation of paired-pulse plasticity following LTP in the dentate gyrus." NeuroReport **5**(4): 385–88.
- Cohen, A. S., C. M. Coussens, et al. (1999). "Long-lasting increase in cellular excitability associated with the priming of LTP induction in rat hippocampus." J Neurophysiol **82**(6): 3139-48.
- Collin, C., C.Vicario-Abejón, et al. (2001). "Neurotrophins act at presynaptic terminals to activate synapses amongcultured hippocampal neurons." Eur. J. Neurosci **13**(7): 1273-82.
- Cooper, L. N. and M. F. Bear (2012). "The BCM theory of synapse modification at 30: interaction of theory with experiment." Nat Rev Neurosci **13**(11): 798-810.
- Cuesto, G., Enriquez-Barreto, L., et al. (2011). "Phosphoinositide-3-kinase activation controls synaptogenesis and spinogenesis in hippocampal neurons." J Neurosci **31**(8):2721-2733.
- Danscher, G. and J. Zimmer (1978). "An improved Timm sulphide silver method for light and electron microscopic localization of heavy metals in biological tissues." Histochemistry **55**(1): 27-40.
- Davenport, C. J., W. J. Brown, et al. (1990). "Sprouting of GABAergic and mossy fiber axons in dentate gyrus following intrahippocampal kainate in the rat." Exp Neurol **109**(2): 180-90.
- Davis, G.W. (2006). "Homeostatic control of neural activity: from phenomenology to molecular design." Annu. Rev. Neurosci., **29**: 307–23.
- De Roo, M., P. Klauser, et al. (2008). "Spine dynamics and synapse remodeling during LTP and memory processes." Prog Brain Res **169**: 199-207.
- DeFelipe, J. (2006). "Brain plasticity and mental processes: Cajal again." Nat Rev Neurosci **7**(10): 811-7.
- Derrick, B. E., S. B. Weinberger, et al. (1991). "Opioid receptors are involved in an NMDA receptor-independent mechanism of LTP induction at hippocampal mossy fiber-CA3 synapses." Brain Res Bull **27**(2): 219-23.
- Derrick, B. E., S. B. Rodriguez, et al. (1992). "Mu opioid receptors are associated with the induction of hippocampal mossy fiber long-term potentiation." J Pharmacol Exp Ther **263**(2): 725-33.

- Derrick, B. E. and J. L. Martinez, Jr. (1994). "Opioid receptor activation is one factor underlying the frequency dependence of mossy fiber LTP induction." J Neurosci **14**(7): 4359-67.
- Derrick, B. E. (2007). "Plastic processes in the dentate gyrus: a computational perspective." Prog Brain Res **163**: 417-51.
- Diogenes, M. J., A. R. Costenla, et al. (2011). "Enhancement of LTP in aged rats is dependent on endogenous BDNF." Neuropsychopharmacology **36**(9): 1823-36.
- Döbrössy, M. D. y S.B. Dunnett (2001). "The influence of environment and experience on neural grafts." Nat Rev Neurosci **2**(12): 871-9.
- Eichenbaum, H. (2004). "Hippocampus: cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory." Neuron **44**(1): 109-20.
- Engert, F. and T. Bonhoeffer (1999). "Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity." Nature **399**(6731): 66-70.
- Erreger, K., S. M. Dravid, et al. (2005). "Subunit-specific gating controls rat NR1/NR2A and NR1/NR2B NMDA channel kinetics and synaptic signalling profiles." J Physiol **563**(Pt 2): 345-58.
- Escobar, M. L. (1994). "El factor de crecimiento neuronal en el sistema nervioso central. ." Ciencia **45**: 21-24.
- Escobar, M. L., E. J. Barea-Rodriguez, et al. (1997). "Opioid receptor modulation of mossy fiber synaptogenesis: independence from long-term potentiation." Brain Res **751**(2): 330-5.
- Escobar, M. L., I. Alcocer, et al. (1998). "The NMDA receptor antagonist CPP impairs conditioned taste aversion and insular cortex long-term potentiation in vivo." Brain Res **812**(1-2): 246-51.
- Escobar, M. L., Y. Figueroa-Guzman, et al. (2003). "In vivo insular cortex LTP induced by brain-derived neurotrophic factor." Brain Res **991**(1-2): 274-9.
- Faulkner, R. L., M. H. Jang, et al. (2008). "Development of hippocampal mossy fiber synaptic outputs by new neurons in the adult brain." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(37): 14157-62.
- Fernandez-Espejo, E. (1996). "[Basic neurobiology of hippocampal formation]." Rev Neurol **24**(131): 779-84.
- Fujii, S., K. Saito, et al. (1991). "Reversal of long-term potentiation (depotential) induced by tetanus stimulation of the input to CA1 neurons of guinea pig hippocampal slices." Brain Res **555**(1): 112-22.
- Galimberti, I., N. Gogolla, et al. (2006). "Long-term rearrangements of hippocampal mossy fiber terminal connectivity in the adult regulated by experience." Neuron, **50**(5): 749-63.
- Gao, X.B. and A.N. van den Pol, (1999). "Neurotrophin-3 potentiates excitatory GABAergic synaptic transmission in cultured developing hypothalamic neurones of the rat." J. Physiol., **518** (Pt 1): 81-95.
- Gomez-Palacio-Schjetnan, A. and M. L. Escobar (2008). "In vivo BDNF modulation of adult functional and morphological synaptic plasticity at hippocampal mossy fibers." Neurosci Lett **445**(1): 62-7.
- Harms, K. J., M. S. Rioult-Pedotti, et al. (2008). "Transient spine expansion and learning-induced plasticity in layer 1 primary motor cortex." J Neurosci **28**(22): 5686-90.

- Harris, E.W. and C.W. Cotman, (1986). "Long-term potentiation of guinea pig mossy fiber responses is not blocked by N-methyl D-aspartate antagonists." Neurosci. Lett., **70**(1), 132–37.
- Harrison, J.M., R.G. Allen, et al. (2002). "Chronic morphine treatment alters endogenous opioid control of hippocampal mossy fiber synaptic transmission." J. Neurophysiol., **87**(5): 2464–70.
- Henze, D. A., N. N. Urban, et al. (2000). "The multifarious hippocampal mossy fiber pathway: a review." Neuroscience **98**(3): 407-27.
- Holahan, M. R., J. L. Rekart, et al. (2006). "Spatial learning induces presynaptic structural remodeling in the hippocampal mossy fiber system of two rat strains." Hippocampus **16**(6): 560-70.
- Hrabetova, S. and T. C. Sacktor (1996). "Bidirectional regulation of protein kinase M zeta in the maintenance of long-term potentiation and long-term depression." J Neurosci **16**(17): 5324-33.
- Huang, Y. Y., A. Colino, et al. (1992). "The influence of prior synaptic activity on the induction of long-term potentiation." Science **255**(5045): 730-3.
- Huang, Y. Y., E. R. Kandel, et al. (1995). "A genetic test of the effects of mutations in PKA on mossy fiber LTP and its relation to spatial and contextual learning." Cell **83**(7): 1211-22.
- Huang, Y. Z., E. Pan, et al. (2008). "Zinc-mediated transactivation of TrkB potentiates the hippocampal mossy fiber-CA3 pyramid synapse." Neuron **57**(4): 546-58.
- Ip, N.Y., Stitt, T.N., et al. (1993). "Similarities and differences in the way neurotrophins interact with the Trk receptors in neuronal and nonneuronal cells." Neuron, **10**(2): 137–49.
- Isaac, J.T., Buchanan, K.A., et al. (2009) Hippocampal place cell firing patterns can induce long-term synaptic plasticity in vitro. J. Neurosci., **29**(21): 6840–50.
- Ito, I. and Sugiyama, H. (1991). "Roles of glutamate receptors in long-term potentiation at hippocampal mossy fiber synapses." NeuroReport, **2**(6): 333–36.
- Je, H. S., Y. Ji, et al. (2011). "Presynaptic protein synthesis required for NT-3-induced long-term synaptic modulation." Mol Brain **4**: 1.
- Je, H. S., J. Zhou, et al. (2005). "Distinct mechanisms for neurotrophin-3-induced acute and long-term synaptic potentiation." J Neurosci **25**(50): 11719-29.
- Je, H. S., F. Yang, et al. (2006). "Neurotrophin 3 induces structural and functional modification of synapses through distinct molecular mechanisms." J Cell Biol **175**(6): 1029-42.
- Je, S. H., Y. Ji, et al. (2010). "Presynaptic protein synthesis required for NT-3-induced long-term synaptic modulation." Mol Brain **4**(1): 1.
- Je, S. H., Y. Ji, et al. (2011). "Presynaptic protein synthesis required for NT-3-induced long-term synaptic modulation." Mol Brain **4**(1): 1.
- Jedlicka, P. (2002). "Synaptic plasticity, metaplasticity and BCM theory." Bratisl Lek Listy **103**(4-5): 137-43.

- Jiang, B., Y. Akaneya et al. (2001). "Brain-derived neurotrophic factor induces long-lasting potentiation of synaptic transmission in visual cortex in vivo in young rats, but not in the adult." Eur. J. Neurosci., **14**(8): 1219–28.
- Jin, W. and C. Chavkin, (1999). "Mu opioids enhance mossy fiber synaptic transmission indirectly by reducing GABAB receptor activation." Brain Res., **821** (2), 286–293.
- Jordán-Álvarez S., W. Fouquet et al. (2012). "Presynaptic PI3K activity triggers the formation of glutamate receptors at neuromuscular terminals of *Drosophila*" J. Cell Sci., **125**(Pt 15): 3621-3629.
- Kandel, E. R. and R. D. Hawkins (1992). "The biological basis of learning and individuality." Sci Am **267**(3): 78-86.
- Kang, H. and E. M. Schuman (1995). "Long-lasting neurotrophin-induced enhancement of synaptic transmission in the adult hippocampus." Science **267**(5204): 1658-62.
- Kang, H. and E. M. Schuman (2000). "Intracellular Ca(2+) signaling is required for neurotrophin-induced potentiation in the adult rat hippocampus." Neurosci Lett **282**(3): 141-4.
- Kanhema, T., G. Dagestad, et al. (2006). "Dual regulation of translation initiation and peptide chain elongation during BDNF-induced LTP in vivo: evidence for compartment-specific translation control." J Neurochem **99**(5): 1328-37.
- Karchewski, L.A., K.A. Gratto et al. (2002). "Dynamic patterns of BDNF expression in injured sensory neurons: differential modulation by NGF and NT-3." Eur. J. Neurosci **16**(8): 1449–62.
- Kase, H., K. Iwahashi, Y. Matsuda (1986). "K-252a, a potent inhibitor of protein kinase C from microbial origin." J. Antibiot. (Tokyo), **39**(8): 1059–65.
- Kelleher, R. J., 3rd, A. Govindarajan, et al. (2004). "Translational control by MAPK signaling in long-term synaptic plasticity and memory." Cell **116**(3): 467-79.
- Kim, H. G., T. Wang, et al. (1994). "Neurotrophin 3 potentiates neuronal activity and inhibits gamma-aminobutyrate synaptic transmission in cortical neurons." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(25): 12341-5.
- Klein, R., D. Conway et al. (1990). "The trkB tyrosine protein kinase gene codes for a second neurogenic receptor that lacks the catalytic kinase domain." Cell, **61**(4): 647–56.
- Kolarow, R., T. Brigadski, et al. (2007). "Postsynaptic secretion of BDNF and NT-3 from hippocampal neurons depends on calcium calmodulin kinase II signaling and proceeds via delayed fusion pore opening." J Neurosci **27**(39): 10350-64.
- Kwon, H. B. and P. E. Castillo (2008). "Long-term potentiation selectively expressed by NMDA receptors at hippocampal mossy fiber synapses." Neuron **57**(1): 108-20.
- Lamballe, F., R. Klein, M. Barbacid (1991). "trkC, a new member of the trk family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3." Cell, **66**(5): 967–79.
- Lamballe, F., R.J. Smeyne, M. Barbacid (1994). "Developmental expression of trkC, the neurotrophin-3 receptor, in the mammalian nervous system." J. Neurosci., **14**(1): 14–28.
- Lamprecht, R. and J. LeDoux (2004). "Structural plasticity and memory." Nat Rev Neurosci **5**(1): 45-54.

- Lauterborn, J. C., P. J. Isackson, Gall, C.M. (1994). "Cellular localization of NGF and NT-3 mRNAs in postnatal rat forebrain." Mol Cell Neurosci **5**(1): 46-62.
- Lee, F.S. and Chao, M.V. (2001). "Activation of Trk neurotrophin receptors in the absence of neurotrophins." Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **98**(6): 3555–60.
- Li, Y., C. J. Hough, et al. (2001). "Induction of mossy fiber --> Ca3 long-term potentiation requires translocation of synaptically released Zn²⁺." J Neurosci **21**(20): 8015-25.
- Lohof, A. M., N. Y. Ip, et al. (1993). "Potentiation of developing neuromuscular synapses by the neurotrophins NT-3 and BDNF." Nature **363**(6427): 350-3.
- López, J. C. (2002). "Quantifying synaptic efficacy." Nat Rev Neurosci **3** (332) doi:10.1038/nrn814.
- Lovinger, D. M, J. G. Partridge, K.C. Tang (2003). "Plastic control of striatal glutamatergic transmission by ensemble actions of several neurotransmitters and targets for drugs of abuse" Ann NY Acad Sci **9**: 226-240.
- Lu, Y. M., F. A. Taverna, et al. (2000). "Endogenous Zn(2+) is required for the induction of long-term potentiation at rat hippocampal mossy fiber-CA3 synapses." Synapse **38**(2): 187-97.
- Lu, B., P. T. Pang, et al. (2005). "The ying and yang of neurotrophin action." Nat Rev Neurosci **6**(8): 603-14.
- Lynch, G., C.S. Rex, C.M. Gall (2007). "LTP consolidation: substrates, explanatory power, and functional significance." Neuropharmacology, **52**(1):12–23.
- Lysetskiy, M., C. Foldy, et al. (2005). "Long- and short-term plasticity at mossy fiber synapses on mossy cells in the rat dentate gyrus." Hippocampus **15**(6): 691-6.
- Maisonpierre, P. C., L. Belluscio, et al. (1990a). "NT-3, BDNF, and NGF in the developing rat nervous system: parallel as well as reciprocal patterns of expression." Neuron **5**(4): 501-9.
- Maisonpierre, P. C., L. Belluscio, et al. (1990b). "Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF." Science **247**(4949 Pt 1): 1446-51.
- Malenka, R. C. (1991). "Postsynaptic factors control the duration of synaptic enhancement in area CA1 of the hippocampus." Neuron **6**(1): 53-60.
- Malenka, R. C. and M. F. Bear (2004). "LTP and LTD: an embarrassment of riches." Neuron **44**(1): 5-21.
- Maletic-Savatic, M., R. Malinow, et al. (1999). "Rapid dendritic morphogenesis in CA1 hippocampal dendrites induced by synaptic activity." Science **283**(5409): 1923-7.
- Mansuy, I. M. (2003). "Calcineurin in memory and bidirectional plasticity." Biochem Biophys Res Commun **311**(4): 1195-208.
- Martinez, A., S. Alcantara, et al. (1998). "TrkB and TrkC signaling are required for maturation and synaptogenesis of hippocampal connections." J. Neurosci., **18**(18): 7336–50.
- McAllister, A.K., L.C. Katz, D.C. Lo (1997). "Opposing roles for endogenous BDNF and NT-3 in regulating cortical dendritic growth." Neuron **18**(5): 767–78.
- McKernan, M. G. and P. Shinnick-Gallagher (1997). "Fear conditioning induces a lasting potentiation of synaptic currents in vitro." Nature **390**(6660): 607-11.

- Mellor, J. and R. A. Nicoll (2001). "Hippocampal mossy fiber LTP is independent of postsynaptic calcium." Nat Neurosci **4**(2): 125-6.
- Messaoudi, E., Bardsen, K., Srebro, B. & Bramham, C.R. (1998). "Acute intrahippocampal infusion of BDNF induces lasting potentiation of synaptic transmission in the rat dentate gyrus." J. Neurophysiol., **79**(1): 496–99.
- Messaoudi, E., S. W. Ying, et al. (2002). "Brain-derived neurotrophic factor triggers transcription-dependent, late phase long-term potentiation in vivo." J Neurosci **22**(17): 7453-61.
- Milner, B., L. R. Squire, et al. (1998). "Cognitive neuroscience and the study of memory." Neuron **20**(3): 445-68.
- Morimoto, K., K. Sato, et al. (1998). "Time-dependent changes in neurotrophic factor mRNA expression after kindling and long-term potentiation in rats." Brain Res Bull **45**(6): 599-605.
- Muellbacher, W., U. Ziemann, et al. (2001). "Role of the human motor cortex in rapid motor learning." Exp Brain Res **136**(4): 431-8.
- Navakkode, S., Sajikumar, S. & Frey, J.U. (2007) "Synergistic requirements for the induction of dopaminergic D1/D5-receptor-mediated LTP in hippocampal slices of rat CA1 in vitro." Neuropharmacology, **52** (7), 1547–1554.
- Nelson, S. B. and G. G. Turrigiano (2008). "Strength through diversity." Neuron **60**(3): 477-82.
- Nicoll, R. A. and D. Schmitz (2005). "Synaptic plasticity at hippocampal mossy fibre synapses." Nat Rev Neurosci **6**(11): 863-76.
- Otal, R., A. Martinez, E. Soriano (2005). "Lack of TrkB and TrkC signaling alters the synaptogenesis and maturation of mossy fiber terminals in the hippocampus." Cell Tissue Res., **319**(3): 349–58.
- Ou, L.C. and P.W.Gean, (2006). "Regulation of amygdala-dependent learning by brain-derived neurotrophic factor is mediated by extracellular signalregulated kinase and phosphatidylinositol-3-kinase." Neuropsychopharmacol., **31**(2): 287–96.
- Park, H. and M. M. Poo (2013). "Neurotrophin regulation of neural circuit development and function." Nat Rev Neurosci **14**(1): 7-23.
- Paul, J., K. Gottmann, V. Lessmann (2001). "NT-3 regulates BDNF induced modulation of synaptic transmission in cultured hippocampal neurons. NeuroReport **12**(12): 2635–39.
- Patz, S. and P. Wahle (2004). "Neurotrophins induce short-term and long-term changes of cortical neurotrophin expression." Eur J Neurosci **20**(3): 701-8.
- Paxinos, G. and C. Watson (1986). The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Orlando, Academic Press.
- Pérez-Otaño, I. and M. D. Ehlers (2005). "Homeostatic plasticity and NMDA receptor trafficking." Trends Neurosci **28**(5): 229-38.
- Philpot, B.D., J.S. Espinosa, M.F. Bear (2003). "Evidence for altered NMDA receptor function as a basis for metaplasticity in visual cortex." J. Neurosci. **23**(13): 5583–88.
- Philpot, B. D., K. K. Cho, et al. (2007). "Obligatory role of NR2A for metaplasticity in visual cortex." Neuron **53**(4): 495-502.

- Poo, M. M. (2001). "Neurotrophins as synaptic modulators." Nat Rev Neurosci **2**(1): 24-32.
- Queiroz, C. M. and L. E. Mello (2007). "Synaptic plasticity of the CA3 commissural projection in epileptic rats: an in vivo electrophysiological study." Eur J Neurosci **25**(10): 3071-9.
- Quinlan, E. M., D. Lebel, et al. (2004). "A molecular mechanism for stabilization of learning-induced synaptic modifications." Neuron **41**(2): 185-92.
- Ramirez-Amaya, V., M. L. Escobar, et al. (1999). "Synaptogenesis of mossy fibers induced by spatial water maze overtraining." Hippocampus **9**(6): 631-6.
- Ramirez-Amaya, V., I. Balderas, et al. (2001). "Spatial long-term memory is related to mossy fiber synaptogenesis." J Neurosci **21**(18): 7340-8.
- Reichardt, L. F. (2006). "Neurotrophin-regulated signalling pathways." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **361**(1473): 1545-64.
- Rekart, J. L., C. J. Sandoval, et al. (2007). "Remodeling of hippocampal mossy fibers is selectively induced seven days after the acquisition of a spatial but not a cued reference memory task." Learn Mem **14**(6): 416-21.
- Represa, A., J. Niquet, et al. (1994). "From seizures to neo-synaptogenesis: intrinsic and extrinsic determinants of mossy fiber sprouting in the adult hippocampus." Hippocampus **4**(3): 270-4.
- Rioult-Pedotti, M. S., D. Friedman, et al. (1998). "Strengthening of horizontal cortical connections following skill learning." Nat Neurosci **1**(3): 230-4.
- Rioult-Pedotti, M. S., D. Friedman, et al. (2000). "Learning-induced LTP in neocortex." Science **290**(5491): 533-6.
- Rioult-Pedotti, M.S. J.P. Donoghue, A. Dunaevsky (2007). "Plasticity of the synaptic modification range." J. Neurophysiol **98**(6): 3688–95.
- Rogan, M. T., U. V. Staubli, et al. (1997). "Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala." Nature **390**(6660): 604-7.
- Rose, C. R., R. Blum, et al. (2003). "Truncated TrkB-T1 mediates neurotrophin-evoked calcium signalling in glia cells." Nature **426**(6962): 74-8.
- Rodriguez-Duran, L.F. D.V. Castillo, et al. (2011). "Conditioned taste aversion modifies persistently the subsequent induction of neocortical long-term potentiation in vivo." Neurobiol. Learn.Memory **95**(4): 519–26.
- Ryden, M. and C.F. Ibanez, (1996). "Binding of neurotrophin-3 to p75LNGFR, TrkA, and TrkB mediated by a single functional epitope distinct from that recognized by trkC." J. Biol. Chem., **271**(10): 5623–27.
- Sacktor, T. C. (2012). "Memory maintenance by PKMzeta--an evolutionary perspective." Mol Brain **5**: 31.
- Sahun, I., J.M. Delgado-Garcia, et al. (2007). "Dissociation between CA3-CA1 synaptic plasticity and associative learning in TgNTRK3 transgenic mice." J.Neurosci. **27**(9): 2253–60.
- Sanhueza, M. and J. Lisman (2013). "The CaMKII/NMDAR complex as a molecular memory." Mol Brain **6**: 10.
- Sandkuhler, J. (2007). "Understanding LTP in pain pathways." Mol Pain **9**: 9.

- Scharfman, H. E., J. H. Goodman, et al. (2002). "Spontaneous limbic seizures after intrahippocampal infusion of brain-derived neurotrophic factor." Exp Neurol **174**(2): 201-14.
- Schjetnan, A. G. and M. L. Escobar (2012). "In vivo BDNF modulation of hippocampal mossy fiber plasticity induced by high frequency stimulation." Hippocampus **22**(1):1-8.
- Schroeder, B. W. and P. Shinnick-Gallagher (2005). "Fear learning induces persistent facilitation of amygdala synaptic transmission." Eur J Neurosci **22**(7): 1775-83.
- Shimazu, K., M. Zhao, et al. (2006). "NT-3 facilitates hippocampal plasticity and learning and memory by regulating neurogenesis." Learn Mem **13**(3): 307-15.
- Sokolov, M. V., A. V. Rossokhin, et al. (2003). "Associative mossy fibre LTP induced by pairing presynaptic stimulation with postsynaptic hyperpolarization of CA3 neurons in rat hippocampal slice." Eur J Neurosci **17**(7): 1425-37.
- Son, H., V. Madelian, D.O. Carpenter (1996). "The translocation and involvement of protein kinase C in mossy fiber-CA3 long-term potentiation in hippocampus of the rat brain." Brain Res., **739**(1-2): 282–92.
- Squinto, S.P., T.N.Stitt, et al. (1991). "trkB encodes a functional receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 but not nerve growth factor." Cell, **65**(5): 885–93.
- Sundstrom, L. E., J. Mitchell, et al. (1993). "Bilateral reorganisation of mossy fibres in the rat hippocampus after a unilateral intracerebroventricular kainic acid injection." Brain Res **609**(1-2): 321-6.
- Tamura, M., R. Koyama, et al. (2006). "K252a, an inhibitor of Trk, disturbs pathfinding of hippocampal mossy fibers." NeuroReport, **17**(5), 481–6.
- Taniike, N., Y. F. Lu, et al. (2008). "Critical differences in magnitude and duration of N-methyl D-aspartate (NMDA) receptor activation between long-term potentiation (LTP) and long-term depression (LTD) induction." Acta Med Okayama **62**(1): 21-8.
- Terrian, D.M., D.K. Ways, R.L. Gannon (1991). "A presynaptic role for protein kinase C in hippocampal mossy fiber synaptic transmission." Hippocampus, **1**(3), 303–14.
- Tessarollo, L., P. Tsoulfas et al. (1993). "trkC, a receptor for neurotrophin-3, is widely expressed in the developing nervous system and in non-neuronal tissues." Development, **118**(2): 463–75.
- Thompson, K.J., M.L. Mata et al. (2005). "Metabotropic glutamate receptor antagonist AIDA blocks induction of mossy fiber-CA3 LTP in vivo." J. Neurophysiol., **93**(5), 2668–73.
- Treves, A., A. Tashiro, et al. (2008). "What is the mammalian dentate gyrus good for?." Neuroscience **154**(4):1155-72.
- Tyler, W. J. y L.D. Pozzo-Miller (2001). "BDNF enhances quantal neurotransmitter release and increases the number of docked vesicles at the active zones of hippocampal excitatory synapses." J Neurosci **21**(12): 4249-58.
- Ullal GR, B. Michalski et al. (2007). "NT-3 modulates BDNF and proBDNF levels in naive and kindled rat hippocampus." Neurochem Int **50**(6): 866-871.
- Vicario-Abejón, C., C. Collin, et al. (1998). "Neurotrophins induce formation of functional excitatory and inhibitory synapses between cultured hippocampal neurons." J Neurosci **18**(18): 7256-71.

- Vicario-Abejón, C., D. Owens, et al. (2002). "Role of neurotrophins in central synapse formation and stabilization." Nat Rev Neurosci **3**(12): 965-74.
- Volk, L. J., J. L. Bachman, et al. (2013). "PKM-zeta is not required for hippocampal synaptic plasticity, learning and memory." Nature **493**(7432): 420-423.
- Wang, T., K. Xie, et al. (1995). "Neurotrophins promote maturation of developing neuromuscular synapses." J Neurosci **15**(7 Pt 1): 4796-805.
- Wheal, H. V., B. Lancaster, et al. (1983). "Long-term potentiation in Schaffer collateral and commissural systems of the hippocampus: in vitro study in rats pretreated with kainic acid." Brain Res **272**(2): 247-53.
- Whitlock, J. R., A. J. Heynen, et al. (2006). "Learning induces long-term potentiation in the hippocampus." Science **313**(5790): 1093-7.
- Wieraszko, A., Li, G., Kornecki, E., Hogan, M.V. & Ehrlich, Y.H. (1993). "Long-term potentiation in the hippocampus induced by platelet-activating factor." Neuron, **10** (3), 553–557.
- Wu-Zhang, A. X., C. L. Schramm, et al. (2012). "Cellular pharmacology of protein kinase Mzeta (PKMzeta) contrasts with its in vitro profile: implications for PKMzeta as a mediator of memory." J Biol Chem **287**(16): 12879-85.
- Xiong, H., T. Futamura et al. (2002). "Neurotrophins induce BDNF expression through the glutamate receptor pathway in neocortical neurons." Neuropharmacology **42**(7): 903–12.
- Xu, B., B. Michalski et al. (2002). "Continuous infusion of neurotrophin-3 triggers sprouting, decreases the levels of TrkA and TrkC, and inhibits epileptogenesis and activity-dependent axonal growth in adult rats." Neuroscience, **115**(4): 1295–308.
- Yamamoto, N. and K. Hanamura (2005). "Formation of the thalamocortical projection regulated differentially by BDNF- and NT-3-mediated signaling." Rev. Neurosci **16**(3): 223–31.
- Yao, Y., M. T. Kelly, et al. (2008). "PKM zeta maintains late long-term potentiation by N-ethylmaleimide-sensitive factor/GluR2-dependent trafficking of postsynaptic AMPA receptors." J Neurosci **28**(31): 7820-7.
- Yashiro, K. and B. D. Philpot (2008). "Regulation of NMDA receptor subunit expression and its implications for LTD, LTP, and metaplasticity." Neuropharmacology **55**(7): 1081-94.
- Yeckel, M. F., A. Kapur, et al. (1999). "Multiple forms of LTP in hippocampal CA3 neurons use a common postsynaptic mechanism." Nat Neurosci **2**(7): 625-33.
- Yoshida, H., H. Tomita, et al. (2008). "BDNF increases the phagocytic activity in cultured iris pigment epithelial cells." Cell Struct Funct **33**(1): 21-6.
- Zhang, L., T. Kirschstein, et al. (2005). "Hippocampal synaptic metaplasticity requires inhibitory autophosphorylation of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II." J Neurosci **25**(33): 7697-707.
- Zhao S., D. Studer, et al. (2012). "Fine structure of hippocampal mossy fiber synapses following rapid high-pressure freezing." Epilepsia **53**(Supp 1): 4-8.

13. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	La formación hipocampal.	12
2	Diferentes estratos del hipocampo y circuito trisináptico.	13
3	Micrografía electrónica del complejo sináptico de las fibras musgosas.	16
4	Mecanismos moleculares que subyacen a la LTP dependiente de los receptores NMDA.	20
5	Mecanismos moleculares que subyacen a la LTP en la vía que va del giro dentado al área CA3.	23
6	Mecanismos moleculares involucrados en la iniciación y mantenimiento de la plasticidad sináptica.	24
7	Posible ruta que siguen los axones que dan origen a los botones de las fibras musgosas en el estrato oriens del hipocampo.	26
8	Metaplasticidad.	30
9	Escalamiento sináptico.	31
10	Vías de señalización activadas por las neurotrofinas.	33
11	Estructura de la Neurotrofina-3.	34
12	Modelo propuesto para explicar los mecanismos celulares que subyacen a la modulación de la NT-3 en la estructura y funcionalidad sináptica.	36
13	Esquema que muestra el lugar en el que fueron implantados los electrodos.	41
14	Efectos de la microinfusión aguda de NT-3 en las respuestas de la vía que va del GD al área CA3 in vivo.	53
15	La NT-3 induce reorganización sináptica de las fibras musgosas.	55
16	La NT-3 bloquea la subsecuente inducción de HFS en las fibras musgosas.	57
17	Efectos de la microinfusión de NT-3 en la reorganización sináptica inducida por HFS de las fibras musgosas.	58
18	La NT-3 requiere de la activación de las vías de los fosfoinosítidos y de MAPKs para modular la eficiencia sináptica de las fibras musgosas.	61
19	La NT-3 requiere de la activación de las vías de los fosfoinosítidos y de MAPKs para modular la reorganización sináptica de las fibras musgosas.	62
20	La NT-3 requiere de la activación de las vías de los fosfoinosítidos y de MAPKs para bloquear la subsecuente inducción de HFS en las fibras musgosas.	64
21	La NT-3 requiere de la activación de las vías de los fosfoinosítidos y de MAPKs para modificar el patrón de reorganización sináptica inducida por la subsecuente inducción de HFS en las fibras musgosas.	65
22	Principales proyecciones contralaterales de las fibras musgosas.	72

14. ANEXO I

El anexo I es el artículo que conjunta los principales resultados de mi proyecto de investigación, esto es, los efectos de NT-3 sobre la eficiencia sináptica de la vía GD-CA3, las modificaciones estructurales derivadas de la infusión de ésta neurotrofina; así como la participación NT-3 en la producción de efectos metaplásticos en la vía de las fibras musgosas, in vivo. Estos resultados son descritos en las fases 1 y 2 de la tesis. El artículo fue aceptado el 23 de diciembre de 2012 y publicado recientemente en la revista *European Journal of Neuroscience*.

Referencia:

Ramos-Languren LE. y Escobar ML. (2013) Plasticity and metaplasticity of adult rat hippocampal mossy fibers induced by neurotrophin-3. *European Journal of Neuroscience* **37**(8): 1248-1259.

MOLECULAR AND SYNAPTIC MECHANISMS

Plasticity and metaplasticity of adult rat hippocampal mossy fibers induced by neurotrophin-3

L. E. Ramos-Languren and M. L. Escobar

División de Investigación y Estudios de Posgrado, Facultad de Psicología, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México City, D.F., México

Keywords: homeostatic plasticity, long-term potentiation, neurotrophins, NT-3, presynaptic reorganization

Abstract

Changes in synaptic efficacy and morphology are considered as the downstream mechanisms of consolidation of memories and other adaptive behaviors. In the last decade, neurotrophin-3 (NT-3) has emerged as one potent mediator of synaptic plasticity. In the adult brain, expression of NT-3 is largely confined to the hippocampal dentate gyrus (DG). Our previous studies show that application of high-frequency stimulation (HFS) sufficient to elicit long-term potentiation (LTP) at the DG-CA3 pathway as well as acute intrahippocampal microinfusion of brain-derived neurotrophin factor produce mossy fiber (MF) structural reorganization. Here, we show that intrahippocampal microinfusion of NT-3 induces a long-lasting potentiation of synaptic efficacy in the DG-CA3 projection accompanied by an MF structural reorganization of adult rats *in vivo*. It is considered that the capacity of synapses to express plastic changes is itself subject to variation depending on previous experience; taking into consideration the effects of NT-3 on MF synaptic plasticity, we thus used intrahippocampal microinfusion of NT-3 to analyse its effects on functional and structural plasticity induced by subsequent MF-HFS sufficient to induce LTP in adult rats, *in vivo*. Our results show that NT-3 modifies the ability of the MF pathway to present subsequent LTP by HFS, and modifies the structural reorganization pattern. The modifications in synaptic efficacy and morphology elicited by NT-3 at the MF-CA3 pathway were blocked by the presence of a Trk receptor inhibitor (K252a). These findings support the idea that NT-3 actions modify subsequent synaptic plasticity, a homeostatic mechanism thought to be essential for maintaining synapses in the adult mammalian brain.

Introduction

It is widely accepted that learning and memory are dependent on changes in synaptic efficiency and morphology that permit the strengthening of synapses. Long-term potentiation (LTP) is a long-lasting enhancement of synaptic strength that has been induced in several areas of the brain, making it an attractive phenomenon for studying the mechanisms underlying memory storage. Numerous studies have revealed that the long-lasting maintenance of LTP is accompanied by gene expression, synthesis of new proteins and changes in synaptic morphology (Malenka & Bear, 2004; Lynch *et al.*, 2007).

Elucidation of the molecular mechanisms that lead to functional and morphological synaptic plasticity recognized neurotrophins as key proteins in the induction and prevalence of such activity-dependent modifications in the adult brain (Reichardt, 2006). Synaptic effects of neurotrophins can be divided into two temporally different modes: the acute effects, which are associated with strengthening of pre-existing synapses occurring within seconds or minutes; and the long-term effects, which involve formation of new synaptic connec-

tions taking hours or days (Lu, 2004; Je *et al.*, 2005). Neurotrophin-3 (NT-3) is a secreted protein, related to neurogenesis, neurite development and maintenance, as well as the establishment of synaptic connections (McAllister *et al.*, 1995; Shimazu *et al.*, 2006). NT-3 has been considered to be an excellent candidate as a mediator of synaptic plasticity. In this regard, at cultured neuromuscular synapses acute exposure to NT-3 rapidly potentiates synaptic transmission (Lohof *et al.*, 1993). Long-term treatment with NT-3 produced a significant change in synaptic plasticity and morphology which included axonal arborization and synaptic growth. Additionally, this treatment increased the levels of synaptic vesicle proteins and protein synthesis. Such effects were dependent on the interaction with the TrkC receptors (Wang *et al.*, 1995; Lu, 2004; Je *et al.*, 2006, 2010). In the adult central nervous system (CNS), the hippocampus is a prominent site of expression of NT-3 and its receptor TrkC (Maisonpiere *et al.*, 1990; Ip *et al.*, 1991; Sandell *et al.*, 1994). The expression of the NT-3 gene in the adult brain is highly confined to the dentate gyrus (DG; Lauterborn *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 2007). Neuronal activity such as LTP induction can modulate the expression of NT-3 and TrkC mRNA in the hippocampus (Patterson *et al.*, 1992; Bramham *et al.*, 1996), which suggests that this neurotrophin may play a role in synaptic plasticity in the adult CNS. It has been reported that NT-3 increases the number of excitatory input connections in hippocampal cultures (Jacobi *et al.*, 2009) and

Correspondence: Dr M. L. Escobar, as above.
E-mail: mesobar@unam.mx

Received 3 February 2012, revised 18 December 2012, accepted 23 December 2012

that NT-3 induces a robust long-lasting enhancement of synaptic transmission at the Schaffer collateral pathway (Kang & Schuman, 1995). However, direct evidence regarding the role of NT-3 in the adult synaptic plasticity *in vivo* is lacking.

A series of recent studies have shown that the activity history of a given neuron or pathway modifies its ability to generate subsequent synaptic plasticity (Abraham, 2008). In this regard, it has been proposed that homeostatic forms of plasticity might provide the global regulation necessary to maintain synaptic strength and plasticity within a functional dynamic range. These forms of plasticity also operate with diverse mechanisms, for example by altering the ability of synapses to undergo subsequent Hebbian modifications (metaplasticity), which is thought not only to be essential to maintain synapses within a dynamic functional range but also to be required for the maintenance of a memory trace. Metaplasticity can significantly modify the susceptibility of synapses for subsequent induction of plasticity and pre-set the direction of the future plasticity at these synapses (Abbott & Nelson, 2000; Abraham, 2008; Nelson & Turriano, 2008).

The hippocampal mossy fiber (MF) pathway constitutes a relevant area for learning and memory processes (Henze *et al.*, 2000). In previous studies, we had reported that application of high-frequency stimulation (HFS) sufficient to elicit LTP as well as acute intrahippocampal microinfusion of brain-derived neurotrophin factor (BDNF) induced synaptogenesis at the MF pathway. Seven days after electrophysiological recordings, a band of Timm's staining, a frequently used marker to visualize MF boutons, revealed reorganization of mossy fiber connections at the stratum oriens of the CA3 area (Escobar *et al.*, 1997; Gomez-Palacio-Schjetman & Escobar, 2008). Here we used intrahippocampal microinfusion of NT-3 to analyse its effects on synaptic efficacy and morphological reorganization at the DG-CA3 pathway *in vivo*. We also used intrahippocampal microinfusion of NT-3 to analyse its effects on long-term functional and morphological synaptic reorganization induced by subsequent MF-HFS, sufficient to elicit LTP in adult rats, *in vivo*.

Materials and methods

Animals

Eighty-eight male Wistar rats, weighing 360–390 g were used in this study. They were housed individually under a 12/12-h light-dark cycle, with food and water available *ad libitum* and an average room temperature of 22 °C. Methods were carried out using adequate measures to minimize pain or discomfort in accordance with the guidelines of the Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999), the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and with the approval of the local animal care committee.

Electrophysiological procedure

Electrophysiological recordings at the MF pathway were performed in anesthetized animals as previously described (Derrick & Martinez, 1994; Escobar *et al.*, 1997; Gomez-Palacio-Schjetman & Escobar, 2008; Schjetman & Escobar, 2012). Briefly, rats were anesthetized with pentobarbital (50 mg/kg *i.p.*), and given supplemental pentobarbital injections (10 mg/kg) at 1-h intervals to maintain a surgical level of anesthesia. Body temperature was maintained at 35 °C with a heating pad. Responses were recorded by using a monopolar microinfusion electrode placed in the CA3 pyramidal layer of the dorsal hippocampus at the following stereotaxic coordinates: AP –2.9 mm, ML +2.2 mm, DV –3.0 mm (Paxinos & Watson, 2007). Responses

were evoked using a bipolar electrode via direct and unilateral stimulation of the MF at coordinates AP –3.5 mm, ML –2.0 mm, DV –3.1 mm (Paxinos & Watson, 2007; Fig. 1A). Microinfusion electrodes consisted of 33-gauge stainless steel epoxyite-covered cannulae coupled to polyethylene tubing through a 26-gauge stainless steel ring, connected to a Teflon-coated stainless steel wire (0.005-inch diameter). Polyethylene tubing was attached to a 10- μ L Hamilton syringe (Reno, NV, USA) that was driven by a microinfusion pump (Cole Parmer Co., Vernon Hills, IL, USA). Responses were evoked using a stainless steel bipolar electrode (0.005-inch diameter; Fig. 1A) via direct and unilateral stimulation of the MF at the coordinates corresponding to the orientation of the MF lamellae (AP –3.5 mm, ML –2.0 mm, DV –3.1 mm, Fig. 1A; Paxinos & Watson, 2007). Constant current stimulation (20–40 μ A monophasic pulses of 0.1–0.25 min duration) was provided by a Grass S48 stimulator and delivered to the stimulating electrode through a Grass Stimulus Isolation Unit (PSIU6). The evoked responses were amplified on a Grass P5 series alternating current preamplifier, filtered at 0.1–10 Hz, digitized (10 points/min) and stored for offline analysis using BrainWave software (DataWave, Broomfield, CO, USA). The MF-evoked responses were measured by obtaining the field excitatory postsynaptic potential (EPSP) slope measured 1–3 min after the EPSP onset. The current intensity that elicited a 50% maximal response was determined and used for all subsequent stimulation. Low-frequency responses were evoked once every 20 s throughout a 20-min baseline period, after which HFS (three trains/100 Hz/1 s/20 s intertrain interval) was applied and evoked responses were collected for 3 h (Escobar *et al.*, 1997; Schjetman & Escobar, 2012). The electroencephalogram (EEG) was monitored during the whole experiment. MF LTP was calculated as a percentage of change compared with the mean slope of the field potentials of the entire baseline period prior to the delivery of HFS. The metabotropic glutamate receptor II agonist 2-(2,3-dicarboxy-cyclopropyl) glycine (DCG-IV; Tocris, Ellisville, MO, USA; 0.5 μ L of 0.5 μ M in 5 min), was used at the end of the electrophysiological recordings to verify that the signal was generated by MF inputs (Calixto *et al.*, 2003).

NT-3 microinfusions

To evaluate the effects of NT-3 in MF synaptic efficacy and morphology, experiments were divided into two phases. For phase 1, the animals were divided into the following treatment groups: the NT-3 group ($n = 9$), which underwent surgery, had electrodes implanted and received intrahippocampal microinfusion of NT-3 (2 μ g/2 μ L/0.2 μ L/min; Alomone Labs, Jerusalem, Israel) prepared with phosphate-buffered saline (PBS) as vehicle, after 20 min of baseline recording (Jiang *et al.*, 2001; Messaoudi *et al.*, 2002; Escobar *et al.*, 2003; Ou & Gean, 2006; Gomez-Palacio-Schjetman & Escobar, 2008); vehicle group (VEH group, $n = 9$) which, under the same conditions as the NT-3 group, received intrahippocampal microinfusion of PBS (2 μ L); NT-3+K252a group ($n = 9$) which, under the same conditions as the NT-3 group, received intrahippocampal microinfusion of NT-3 in combination with K252a, an inhibitor of Trk receptor tyrosine kinases (2 μ g NT-3/2 μ L K252a 20 μ M, 0.2 μ L/min; Alomone Labs) – K252a diluted with dimethyl sulfoxide (DMSO 0.5%; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA; Jiang *et al.*, 2001; Escobar *et al.*, 2003; Gomez-Palacio-Schjetman & Escobar, 2008); and intact control group (CON, $n = 8$), which was used for morphological analysis.

To analyse the effects of NT-3 on long-term functional and morphological synaptic reorganization induced by subsequent MF-HFS, sufficient to induce LTP, the animals were divided into the

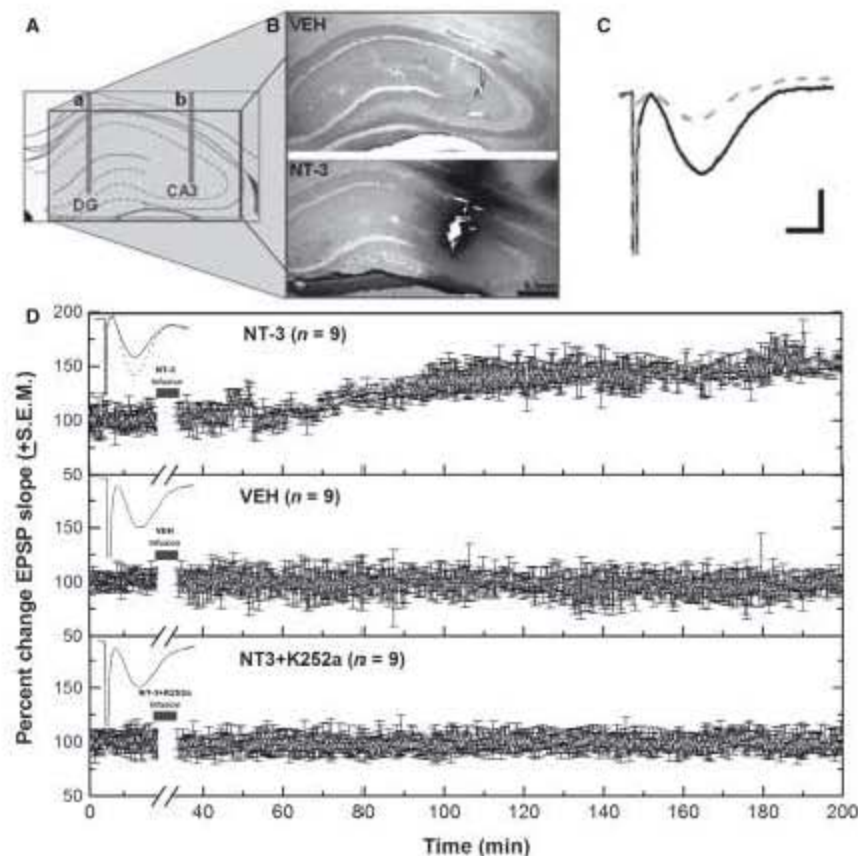


FIG. 1. Effects of acute NT-3 infusion on MF-CA3 responses *in vivo*. (A) Schematic representation of the MF pathway and electrode placement showing the stimulated and recorded sites in a coronal plane. (B) Representative coronal sections of the rat hippocampus stained immunohistochemically with anti-NT-3 antibody after VEH (2 μ L) or NT-3 (2 μ g/2 μ L, 12 min) microinfusion. Strong immunoreactivity was seen only around the NT-3 infusion site. (C) Representative traces of the EPSP obtained at baseline (full line) and after DCG-IV application (dotted line). Note that DCG-IV selectively blocked MF responses to 15% of baseline signals. (D) Plot of MF-evoked responses from animals that received NT-3, PBS (VEH) and NT-3+K252a. After NT-3 infusion, EPSP slope values were significantly elevated above baseline. No changes were observed in the VEH or NT-3+K252 groups. The top of each graph shows average of MF field potentials obtained immediately before (full line) and 170 min after (dotted line) the infusion. Scale bar: 5 min and 0.15 mV. Bars indicate the infusion period (12 min). DG, dentate gyrus.

following treatment groups: the HFS group ($n = 9$), which underwent surgery, had electrodes implanted and received HFS capable of inducing LTP; NT-3+HFS group ($n = 9$) which, under the same conditions as the HFS group, received HFS in the presence of NT-3 (2 μ g/2 μ L/0.2 μ L/min; Alomone Labs) prepared with PBS as vehicle (Jiang *et al.*, 2001; Messaoudi *et al.*, 2002; Escobar *et al.*, 2003; Ou & Gean, 2006; Gomez-Palacio-Schjetnan & Escobar, 2008); VEH+HFS group ($n = 8$) which, under the same conditions as the HFS group, received HFS in the presence of PBS (2 μ L/0.2 μ L/min); NT-3+K252a+HFS group ($n = 9$) which, under the same conditions as the HFS group, received intrahippocampal microinfusion of NT-3 in combination with K252a (2 μ g NT-3/2 μ L K252a 20 μ M, 0.2 μ L/min; Alomone Labs; Jiang *et al.*, 2001; Escobar *et al.*, 2003; Gomez-Palacio-Schjetnan & Escobar, 2008). An intact control group (CON, $n = 8$) was used for morphological analysis. All solutions were infused immediately before the beginning of the electrophysiological recordings (20 min before HFS).

Immunohistochemistry

To visualize to what degree exogenously applied NT-3 spread into the CA3 area around the recording electrode, the hippocampus was

stained immunohistochemically with an anti-NT-3 antibody in animals that were treated in a similar manner as the NT-3 and VEH groups. The hippocampus was sectioned in a microtome at 40 μ m thickness. The tissue was incubated with the primary anti-NT-3 antibody (1 : 300; Alomone Labs) in PBS containing 0.3% Triton X-100 for 3 days at 4 $^{\circ}$ C. Sections were washed three times as above and incubated with a biotinylated anti-rabbit antibody (1 : 200) for 2 h in the same buffer as the primary antibody. The immunohistochemical reaction was developed using the Vectastain ABC Elite kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA).

Histology and electron microscopy

MF reorganization was evaluated 7 days after the electrophysiological procedure using hippocampal tissue from all groups (six animals per group); this tissue was prepared, stained and analysed by two previously reported methods (Ramirez-Amaya *et al.*, 2001; Rekart *et al.*, 2007). Brains were sectioned at 40 μ m in the coronal plane and processed for Timm's staining, a zinc-detecting histological marker previously used to infer synaptogenesis at the MFs (Escobar *et al.*, 1997; Ramirez-Amaya *et al.*, 2001; Rekart *et al.*, 2007). Every fifth section was systematically chosen from the extreme

septal pole of the dorsal hippocampus for a total of six sections per animal (-3.2 to -3.5 mm from bregma) (Paxinos & Watson, 2007). Digital images obtained using a digital camera connected to an optical microscope (Eclipse E600; Nikon, Tokyo, Japan) were first analysed by using image analysis software (Scion Image; Scion Corp., Frederick, MD, USA) as reported previously (Ramirez-Amaya *et al.*, 2001; Rekart *et al.*, 2007; Gomez-Palacio-Schjetnan & Escobar, 2008). Briefly, the surface area occupied by Timm's granules in the stratum oriens (SO) and stratum pyramidale (SP) was measured in each image, so each animal brain produced six right and six left measures. The areas for the SO and SP were combined (SOSP) as they are hard to distinguish, particularly proximal to CA3c (Rekart *et al.*, 2007). Complementary unbiased areal measurements of the same digital images were carried out in the manner described by Rekart *et al.* (2007). Briefly, images were coded and a point-counting grid (squares = $25 \mu\text{m}$ on a side) was digitally superimposed. Grid intersections overlying dark Timm's silver precipitate were counted as belonging either to the stratum lucidum (SL) or to the SOSP. Following densitometric analysis by either of the two measurement methodologies, comparisons among groups were made by using the ratio of the estimated area in SOSP to the estimated area in SL to account for any size differences among individual animals (Rekart *et al.*, 2007).

Three animals from groups NT-3+HFS ($n = 3$) and VEH+HFS ($n = 3$) were used to corroborate that the morphological reorganization observed with Timm's stain in fact consisted of characteristically MF synaptic buttons using electron microscopy as previously described (Ramirez-Amaya *et al.*, 1999; Schjetnan & Escobar, 2012). Three images of $2500\times$ were randomly chosen from the SOSP and three from SL of each animal. MF terminals were identified by using $10\,000\times$ amplification; each MF found was marked in the reference image ($2500\times$), and after an exhaustive search, suprapyramidal and infrapyramidal MF buttons were anatomically characterized and compared between groups. Images obtained at $2500\times$ amplification were digitalized and used for counting the number of MF synaptic terminals per area unit.

Statistical analysis

Electrophysiological data were analysed with two-way repeated-measures ANOVA with treatment as the between-subjects factor and time as the within-subject factor. Histological data were analysed with either two-way repeated-measures ANOVA for Timm's distribution or one-way ANOVA for electron microscopy as indicated.

Results

The CA3 EPSP consisted of potentials of 0.39 ± 0.02 mV (mean \pm SEM), elicited with $20\text{--}40 \mu\text{A}$ current pulses of $0.1\text{--}0.25$ min duration. These responses initiate at $1.5\text{--}2.8$ min post-stimulation and presented their valley at 7.5 min with an average slope of 0.14 ± 0.008 (mean \pm SEM; Fig. 1C), in agreement with previous studies (Escobar *et al.*, 1997; Gomez-Palacio-Schjetnan & Escobar, 2008; Schjetnan & Escobar, 2012). Microinfusion of DCG-IV at the end of the electrophysiological recordings, selectively blocked MF responses to a 15% of baseline signals presenting potentials of 0.072 ± 0.03 mV (mean \pm SEM), with a mean slope of 0.07 ± 0.001 (mean \pm SEM), verifying that the signal was generated by MF inputs (Fig. 1C).

NT-3 produced an enhancement in the CA3 field EPSP slope values that started approximately 20 min after neurotrophin infusion, reaching a stable plateau at 1 h and with duration of at least 3 h

(Fig. 1D, upper panel). No changes were observed in controls receiving only the vehicle (Fig. 1D, middle panel). Infusion of NT-3 in combination with K252a prevented the effects elicited by NT-3 on the enhancement of synaptic efficacy (Fig. 1D, bottom panel). ANOVA for slope increases revealed highly significant group differences ($F_{2,24} = 58.29$; $P < 0.001$). *Post hoc* analysis with Fisher's test showed significant differences between the NT-3 group and all of the other groups ($P < 0.001$), but the VEH and NT3+K252 groups were not statistically significantly different from each other. At 2 h post-infusion, the percentage changes (\pm SEM) in the EPSP slope for the NT-3, VEH and NT3+K252 groups were 141.37 ± 0.39 , 99.16 ± 0.69 and $101.08 \pm 0.94\%$, respectively. NT-3-induced potentiation was not associated with after-discharges or other overt epileptiform activity as assessed by the continuously recorded hippocampal EEG. In regard to the fact that the threshold for eliciting synaptic plasticity can be modified in anesthetized animals, it has been reported that although pentobarbital can increase the size of excitatory depolarizing potentials, it is not sufficient to modify the induction of LTP or long-term depression (LTD) in rat hippocampus (Archer *et al.*, 2001; Archer & Roth, 2007). To clarify the degree to which exogenously applied NT-3 spread into the hippocampus around the recording electrode after the infusion, the hippocampus was stained immunohistochemically with an anti-NT-3 antibody in animals treated in a similar manner as the NT-3 and VEH groups. Strong immunoreactivity was seen only around the NT-3 infusion site (Fig. 1B).

Our morphological analyses show that intact control animals present MF buttons almost exclusively in the SL of the hippocampal CA3 area (Fig. 2A and B) in agreement with previous studies (Escobar *et al.*, 1997; Ramirez-Amaya *et al.*, 2001; Rekart *et al.*, 2007; Gomez-Palacio-Schjetnan & Escobar, 2008). NT-3 microinfusion produced a bilateral increment of hippocampal MF buttons, with a prominent ipsilateral enhancement visualized by the Timm's-stained density at the SOSP of the CA3 area (Fig. 2A). By contrast, the SOSP of animals infused with the vehicle (Fig. 2A) presented scarce Timm's-stained granules. Moreover, infusion of the Trk receptor blocker K252a prevented the effects of NT-3 in MF morphological reorganization (Fig. 2A). ANOVA of the average Timm-positive surface area, obtained by quantitative densitometric analysis of the SOSP from each animal, revealed significant group differences ($F_{3,20} = 48.315$, $P < 0.001$). *Post hoc* analysis with Fisher's test revealed that group NT-3 showed a significantly larger area of Timm-stained granules ($P < 0.001$) in a prominent ipsilateral form at the SOSP region. Similar results were obtained by the measures performed with the point counting grid, where the ANOVA also presents significant differences among groups ($F_{3,20} = 43.411$; $P < 0.001$). *Post hoc* analysis with Fisher's test revealed a significant increment of the Timm's distribution at the SOSP region ($P < 0.001$) of animals infused with NT-3. ANOVA of the relative area (SOSP/SL) obtained by the measures with the two protocols also showed that the NT-3 group was significantly different from all other groups ($F_{3,20} = 33.017$; $P < 0.001$). *Post hoc* analysis with Fisher's test revealed that group NT-3 presents a significantly higher ratio in the SOSP Timm's-positive area with respect to the SL ($P < 0.001$). These data corroborate that there is an increase of MF terminals in the SOSP at the CA3 hippocampal area in animals infused with NT-3, and also indicate that this reorganization is not a result of hippocampal size differences among individual animals (Fig. 2B).

Considering that NT-3 induced a lasting potentiation of synaptic efficacy in the DG-CA3 projection and that these functional modifications are accompanied by a structural reorganization in the SO of

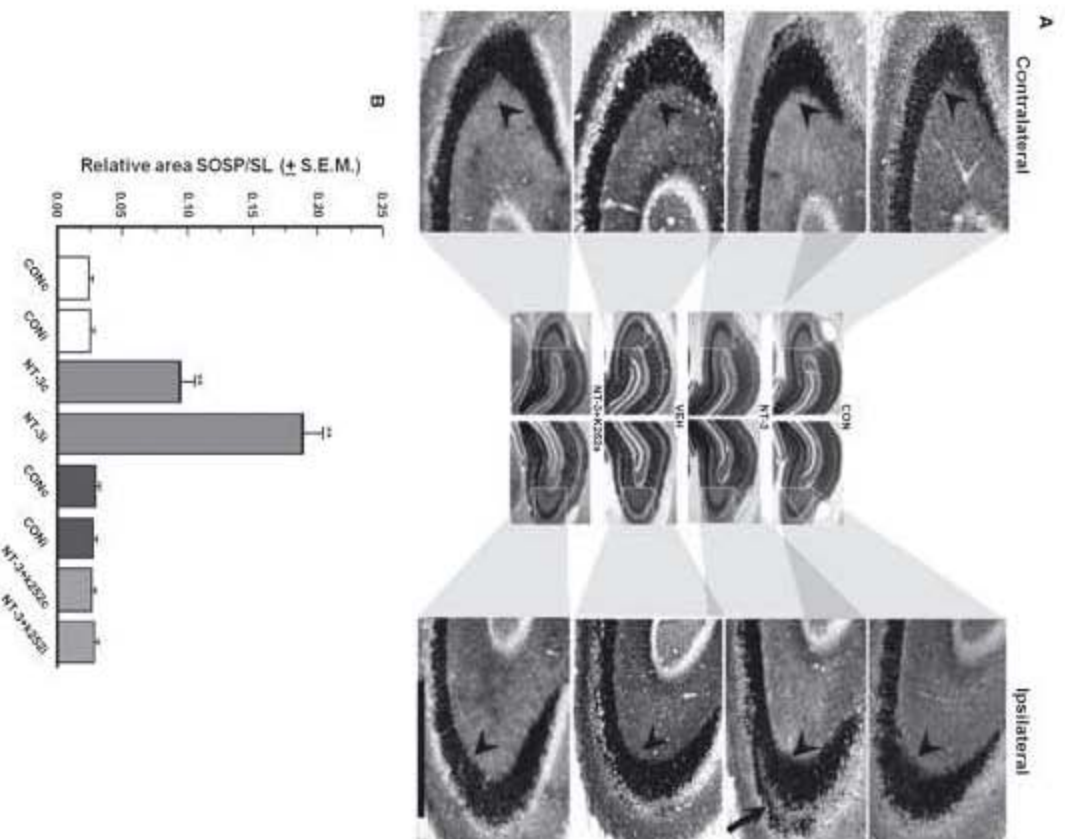


Fig. 2. Effects of acute NT-3 microinfusion on synaptic reorganization of hippocampal mossy fibers. (A) Coronal sections of dorsal hippocampus from intact control (CON), NT-3, VEH and NT-3+K252 groups, showing the distribution of Timm-stained MFs at the stratum lacunosum (arrowhead) and SOSP/SL (arrow). (B) Densitometric analysis of NT-3 effects on synaptic reorganization of hippocampal MFs. Graphs shows the relative area (SOSP/SL) of Timm's staining of the dorsal hippocampus of all groups. ** $P < 0.001$; scale bar: 0.5 mm; e, contralateral; i, ipsilateral.

the CA3 area with a prominent ipsilateral increase in Timm's staining 7 days after NT-3 application, we analysed the effects of NT-3 on long-term functional and morphological synaptic reorganization induced by subsequent HFS. The present results show that HFS (three trains, 100 Hz/1 s/20 s intertrain interval) was capable of inducing LTP at the DG-CA3 pathway, in adult rats *in vivo*, in accordance with our previous studies (Escobar *et al.*, 1997; Schieman & Escobar, 2012). MF LTP was characterized by a slow initial increase in the EPSP slope (Fig. 3A), that has been related to the independence of *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor activation and opioid peptide-relevant modulation (Derrick *et al.*, 1991, 1992; Escobar *et al.*, 1997). At 1 h post-stimulation the HFS group presented a mean EPSP increment (mean \pm SEM) of 143.47 ± 0.73 and the VEH+HFS group of 142.39 ± 1.04 (Fig. 3B). Infusion of NT-3 blocked the subsequent induction of LTP by HFS, indicating

that NT-3 initiates the homeostatic mechanisms that allow the modifications of the ability of the MF pathway to present LTP induced by subsequent HFS. This group (NT-3+HFS) presented a mean slope increment (mean \pm SEM) of 99.01 ± 0.28 (Fig. 3C). This effect was blocked by the microinfusion of NT-3 in the presence of K252a a Trk receptor inhibitor (NT-3+K252+HFS) presenting a mean slope increment (mean \pm SEM) of 140.85 ± 0.84 (Fig. 3D). ANOVA for EPSP slope increases revealed significant differences between groups ($F_{3,31} = 55.23$; $P < 0.001$). *Post hoc* analysis with Fisher's test showed significant differences between the NT-3+HFS group and all of the other groups ($P < 0.001$), but the HFS, VEH+HFS and NT-3+K252+HFS groups were not statistically different from each other. HFS-induced potentiation was not associated with after-discharges or other overt epileptiform activity as assessed by the continuously recorded hippocampal EEG.

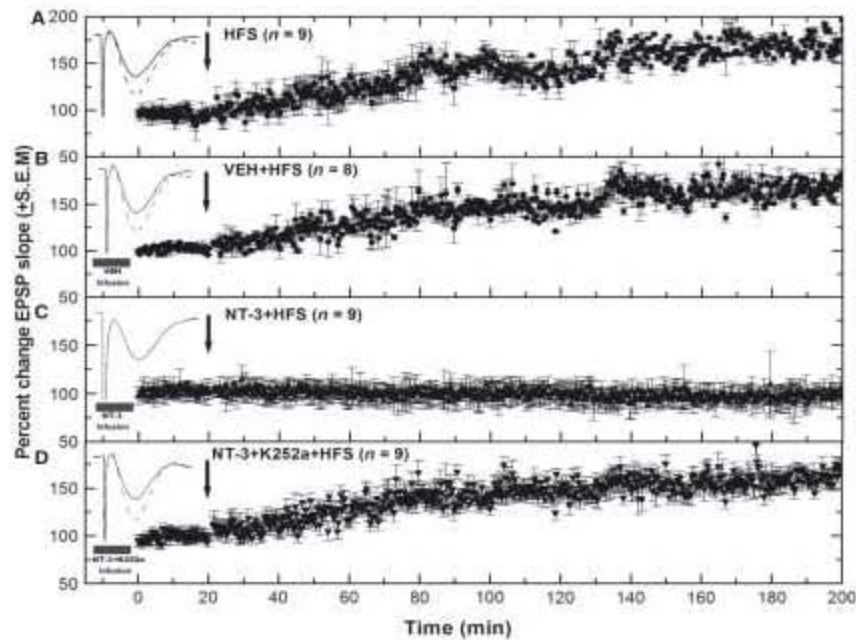


FIG. 3. Effects of NT-3 infusion on MF-CA3 LTP induction by HFS *in vivo*. Plot of MF-evoked responses from animals that received NT-3, PBS (VEH) and NT-3+K252a, followed by HFS. Note that NT-3 blocks LTP induction induced by HFS at the DG-CA3 pathway while HFS, VEH+HFS and NT-3+K252a+HFS groups present LTP. The top of each graph shows representative traces of the EPSP obtained immediately before (full line) and 170 min after (dotted line) HFS. Scale bar: 5 min and 0.15 mV. Arrows indicate HFS (three trains of 100 Hz/1 s/20 s intertrain interval).

Our histological analyses show that high-frequency MF stimulation produced a bilateral increment of hippocampal MF buttons, with a prominent contralateral enhancement visualized by the Timm's-stained density at the SOSp of the CA3 area, in agreement with previous studies (Escobar *et al.*, 1997; Ramirez-Amaya *et al.*, 2001; Rekart *et al.*, 2007; Schjetnan & Escobar, 2012). Seven days after LTP induction, Timm's-stained granules were observed contralaterally in the CA3 infrapyramidal band (SOSP) of the HFS (Fig. 4A) and VEH+HFS (Fig. 4A) groups. Moreover, microinfusion of NT-3 followed by the application of HFS (NT-3+HFS) modified the synaptic reorganization pattern observed in control groups, emphasizing a bilateral expression and an enhancement of synaptogenesis (Fig. 4A). Microinfusion of NT-3+K252a at the CA3 area prevents this effect, revealing that NT-3 modulation is dependent on its Trk receptor activation (Fig. 4A). ANOVA of the average Timm-positive surface area of the SL from each animal, obtained by either measurement methodology, revealed no significant differences contralaterally or ipsilaterally in all groups ($F_{4,25} = 65.12$; $P < 0.001$). ANOVA of the contralateral relative area (SOSP/SL) obtained by means of the two protocols revealed significant differences between groups ($F_{4,25} = 59.83$; $P < 0.001$). *Post hoc* analysis with Fisher's test revealed that the NT-3+HFS group showed a significantly larger area of contralateral Timm-stained granules ($P < 0.001$) compared with all the other groups. In addition, animals from groups HFS, VEH+HFS and NT-3+K252a+HFS showed a significantly larger area of contralateral Timm-stained granules ($P < 0.001$) compared with the intact control group. ANOVA of the ipsilateral relative area (SOSP/SL) obtained by the measures with the two protocols also shows that the NT-3+HFS group was significantly different from all groups ($F_{4,25} = 53.67$; $P < 0.001$). *Post hoc* analysis with Fisher's test revealed that the NT-3 group had a significantly higher ratio in

the SOSp of Timm's-positive area with respect to the SL ($P < 0.001$). These data corroborate that prior infusion of NT-3 modifies the synaptic reorganization pattern that is observed through HFS application, suggesting that NT-3 initiates a homeostatic redistribution of synapses (Fig. 4B).

Electron microscopy revealed the presence of MF buttons in the SO of the VEH+HFS ($n = 3$) and NT3+HFS ($n = 3$) groups. These buttons contain densely packed spherical clear vesicles and sometimes dense core vesicles and establish multiple asymmetrical contacts, usually with the dendritic shaft of pyramidal neurons and occasionally with dendritic spines (Fig. 4C; Amaral & Dent, 1981; Faulkner *et al.*, 2008). Analysis of synaptic density of the characteristic mossy terminals in the SO revealed an increase of MF buttons in NT-3+HFS animals, compared with VEH+HFS animals (Fig. 4D). One-way ANOVA showed statistical differences between VEH+HFS and NT3+HFS groups ($F_{3,8} = 28.65$; $P < 0.001$), corroborating an increased synaptic density in the basal region (SO) of NT-3-infused animals compared with the VEH+HFS group.

To analyse the interaction between NT-3 and HFS once NT-3 potentiation has been established, one additional group was processed. For this, electrophysiological recordings at the MF pathway were performed in anesthetized animals as previously described in the present paper. The NT-3+HFS60 group ($n = 7$) underwent surgery, had electrodes implanted and received HFS 60 min after intrahippocampal microinfusion of NT-3 (2 $\mu\text{g}/2 \mu\text{L}/0.2 \mu\text{L}/\text{min}$; Alomone Labs; Jiang *et al.*, 2001; Messaoudi *et al.*, 2002; Escobar *et al.*, 2003; Ou & Gean, 2006; Gomez-Palacio-Schjetnan & Escobar, 2008). The results show (Supporting Information, Figs. S1 and S2) that once NT-3-LTP at the MF pathway has been established it is not affected in the same proportion as it is when HFS is applied at early potentiation states.

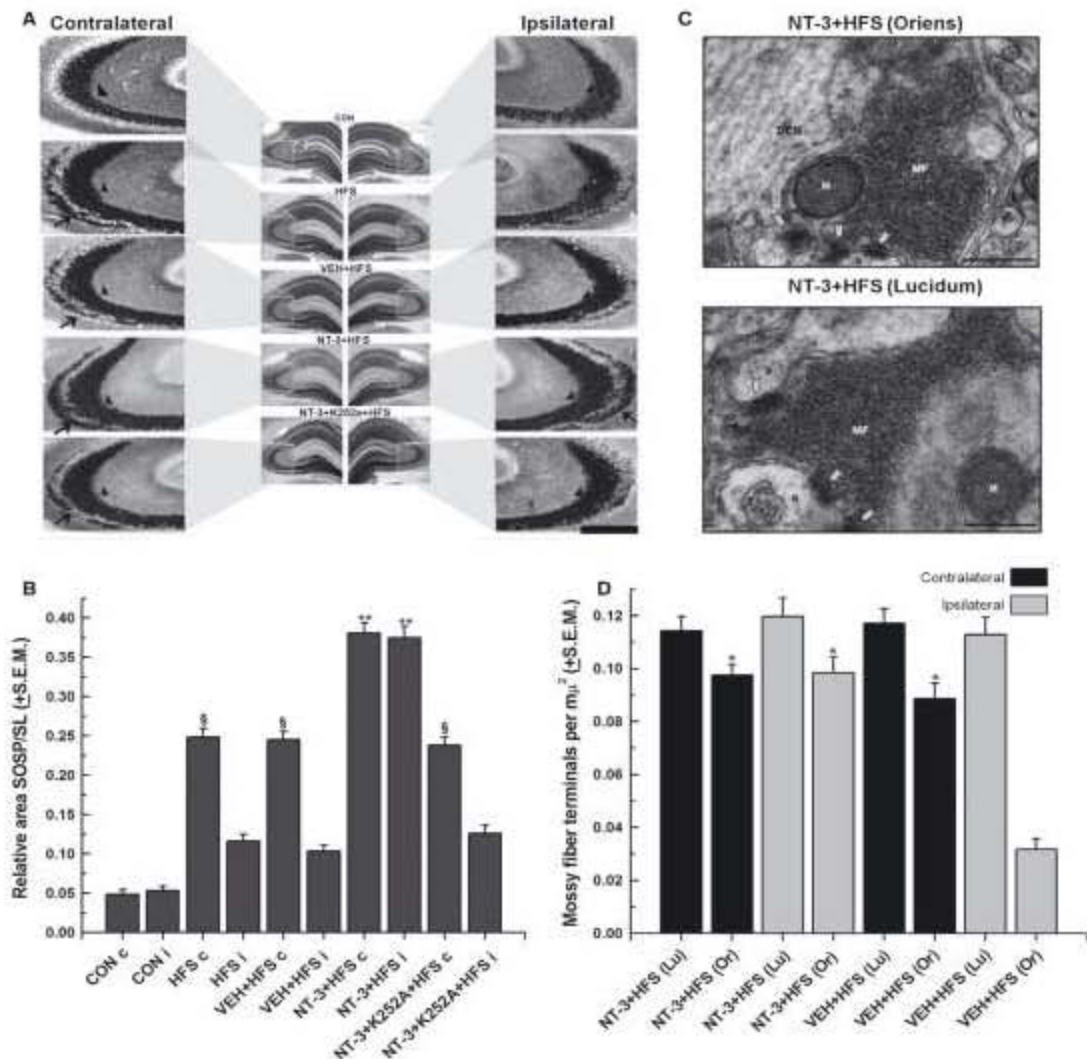


FIG. 4. Effects of acute NT-3 microinfusion on synaptic reorganization induced by hippocampal MF HFS. (A) Coronal sections of dorsal hippocampus from intact control (CON), HFS, VEH+HFS, NT-3+HFS and NT-3+K252a+HFS groups, showing the distribution of Timm-stained MFs at the SL (arrowhead) and SO (arrow). (B) Densitometric analysis of NT-3 effects on synaptic reorganization pattern induced by hippocampal MF HFS. Graphic shows the relative area (SOSP/SL) of Timm's staining of the dorsal hippocampus of all groups. The NT-3 group shows significant differences from all the other groups (**). The contralateral side of HFS, VEH+HFS and NT-3+K252a+HFS groups shows significant differences with ipsilateral sides of all groups (§). $P < 0.001$. Scale bar: 0.5 mm. c, contralateral; i, ipsilateral. (C) Representative electron microphotographs of MF buttons of animals with NT-3 infusion. The images present multiple asymmetrical contacts (arrowheads) and spherical vesicles in SL and SO of animals infused with NT-3 accompanied by HFS. Scale bar 0.5 μ m. (D) Electron microscopic analysis in NT-3+HFS and VEH+HFS animals revealed the mean number of characteristic MF terminals observed in the SO and SL. * $P < 0.001$.

On the other hand, to verify the NMDA receptor-independency of the MF-LTP induced by the protocol of stimulation used in the present study (three trains of 100 Hz/1 s/20 s intertrain interval), we processed two additional groups, in which the competitive NMDA receptor antagonist (RS)-3-(2-carboxipiperazin-4-yl)-propyl-1-phosphonic acid (CPP group, $n = 5$, 3 nmol/ μ L; 0.2 μ L/min; Tocris) or its vehicle (VEH-CPP group, $n = 4$) were infused 30 min before HFS application (Barea-Rodríguez *et al.*, 2000; Escobar *et al.*, 2002; Martínez *et al.*, 2011). The results (Supporting Information, Figs. S1 and S2) corroborate the NMDA receptor-independency of this form of MF-LTP, in agreement with previous studies (Derrick

et al., 1991, 1992; Escobar *et al.*, 1997; Harrison *et al.*, 2002; Thompson *et al.*, 2003).

Discussion

NT-3 potentiates transmission at the DG-CA3 hippocampal projection

Neurotrophins have been proposed as key regulators and mediators of long-term synaptic modifications related to learning and memory maintenance (Reichardt, 2006). In particular, NT-3 has recently

emerged as a potent mediator of functional and structural synaptic plasticity. In this regard, it has been described that exogenous application of NT-3 elicited long-lasting changes in synaptic transmission in the adult hippocampal cultures (Kang & Schuman, 1995, 2000). NT-3 rapidly enhances neuronal activity and inhibits synaptic transmission mediated by γ -aminobutyric acid (GABA) receptors in cultured cortical neurons (Kim *et al.*, 1994). However, evidence of the effects of NT-3 on the CNS *in vivo* are scarce. The present results show that acute intrahippocampal microinfusion of NT-3 potentiates transmission at the DG-CA3 hippocampal projection of anesthetized adult rats.

The results presented here constitute an *in vivo* demonstration of NT-3-induced potentiation of synaptic transmission, in a region considered to be an important excitatory circuit implicated in the acquisition and storage of different learning tasks.

NT-3-induced potentiation was characterized by a slow increment in field EPSP slope that started approximately 20 min after infusion, reached a plateau at 1 h and lasted at least 3 h, in agreement to our previous studies using BDNF (Gomez-Palacio-Schjetnan & Escobar, 2008). Most forms of LTP, including spike timing-dependent plasticity, are characterized by a fast change in EPSP magnitude. By contrast, for slow-onset potentiation there is no change in EPSP at the time of induction but a gradual increase in synaptic strength over time. Slow-onset potentiation has been observed following application of the dopamine receptor D1/D5 agonist SKF38393 (Navakkode *et al.*, 2007). Other molecules are also capable of inducing slow-onset LTP, including BDNF, carbachol and forskolin (Wieraszko *et al.*, 1993; Auerbach & Segal, 1994; Messaoudi *et al.*, 2002; Navakkode *et al.*, 2007). Slow-onset LTP is also seen following mu-opioid receptor activation at hippocampal MF pathway (Derrick *et al.*, 1991, 1992; Escobar *et al.*, 1997; Jin & Chavkin, 1999; Harrison *et al.*, 2002), as well as following place cell activity replay (Isaac *et al.*, 2009).

In accordance with previous studies, the increment in synaptic efficacy elicited by NT-3 at the MF-CA3 pathway was blocked by K252a (Berg *et al.*, 1992; Kang & Schuman, 1995; Escobar *et al.*, 2003; Gomez-Palacio-Schjetnan & Escobar, 2008; Diogenes *et al.*, 2011), a selective inhibitor of tyrosine-kinase receptors that is capable of interacting with TrkA, TrkB and TrkC receptors (Kase *et al.*, 1986; Jiang *et al.*, 2001; Lee & Chao, 2001; Messaoudi *et al.*, 2002; Ou & Gean, 2006; Tamura *et al.*, 2006; Kolarow *et al.*, 2007). Pharmacological inhibition of Trk receptors by K252a, at similar doses used in the present study, has been shown to inhibit the effects on synaptic plasticity produced by neurotrophins *in vivo* (Messaoudi *et al.*, 1998, 2002; Jiang *et al.*, 2001; Castillo *et al.*, 2006; Ou & Gean, 2006; Gomez-Palacio-Schjetnan & Escobar, 2008). Despite of the fact that NT-3 binds to TrkC with high affinity, it can also interact, albeit with less efficiency, with TrkB and TrkA receptors (Lamballe *et al.*, 1991, 1994; Squinto *et al.*, 1991; Ip *et al.*, 1993; Ryden & Ibanez, 1996). TrkB and TrkC receptors are expressed in the MF terminals (Klein *et al.*, 1990; Tessarollo *et al.*, 1993), and the signaling elicited by these receptors is required for the correct formation and maturation of axonal trees (Otal *et al.*, 2005). Thus, in the present study it is possible that exogenously applied NT-3 might have activated not only TrkC but also other Trk receptors, leading to the observed changes.

The mechanisms elicited by NT-3/TrkC interaction have been shown to regulate long-term synaptic potentiation by activation of PI-3 kinase (PI-3K) and PLC- γ pathways, as well as mammalian target of rapamycin (mTOR)-dependent protein synthesis (Je *et al.*, 2005). Moreover, as was mentioned before, NT-3 depresses GABA_A-mediated transmission in mature cultured cortical neurons

(Kim *et al.*, 1994). Similar results have been obtained in mature hypothalamic cultures (Gao & van den Pol, 1999). Thus, in the present study, it is possible that NT-3, at least in part, might modulate GABAergic activity allowing the potentiation of MFs.

The mechanisms that underlie MF LTP have been investigated in detail (Henze *et al.*, 2000) although a consensual idea remains to be elucidated. MF LTP has been characterized by a slow initial increase in the EPSP slope that has been related to the independence of NMDA receptor activation and opioid peptide-relevant modulation (Derrick *et al.*, 1991, 1992; Escobar *et al.*, 1997; Harrison *et al.*, 2002; Thompson *et al.*, 2003; Schjetnan & Escobar, 2012). The activation of mu-opioid receptors is essential for LTP induction at this synapse, which is characterized by a slow increase (Derrick *et al.*, 1992). Additionally, LTP induction at MF-CA3 neuron synapses involves the activation of metabotropic glutamate receptors (mGluRs; Harris & Cotman, 1986; Ito & Sugiyama, 1991; Bashir *et al.*, 1993; Thompson *et al.*, 2005). Nevertheless, evidence against the role of mGluRs in MF LTP *in vitro* (Mellor & Nicoll, 2001) suggests that these receptors are not essential for the process, but perhaps have some modulatory role (Nicoll & Schmitz, 2005). MF LTP also involves the activation of protein kinase C (PKC; Son *et al.*, 1996), which enhances glutamate and dynorphin B release from MF synaptosomes (Terrian *et al.*, 1991). Furthermore, in recent years a form of hippocampal MF-LTP has been described that is dependent of NMDA receptor activation, being induced by application of a short burst of stimuli (Kwon & Castillo, 2008; Rebola *et al.*, 2008).

NT-3 induces synaptic reorganization of hippocampal MFs

Our present results show that potentiation of synaptic efficacy in the DG-CA3 projection elicited by NT-3 is accompanied by a structural reorganization at the CA3 area with a prominent ipsilateral appearance 7 days after NT-3 application.

Morphological reorganization as a result of activity is believed to sustain stabilization of synaptic plasticity (Lynch *et al.*, 2007). Our findings indicate an increase in Timm's staining at the SO CA3 7 days after NT-3 application. An increase in Timm's staining is generally accepted as evidence for MF synaptogenesis because it reveals the presence of zinc, which is present in high concentrations at the MF buttons (Amaral & Dent, 1981). In previous studies, ultrastructural analysis and fluorescence microscopy showed that this increase in Timm's staining coincides with an increase in the synaptic buttons at the SO with similar characteristics of MF buttons at the stratum lucidum (Ramirez-Amaya *et al.*, 1999; Henze *et al.*, 2000; Galimberti *et al.*, 2006; Schjetnan & Escobar, 2012). Our histological analysis shows that an acute infusion of NT-3 at CA3 area induces bilateral synaptogenesis, with a prominent ipsilateral enhancement. Bilateral reorganization of this nature has also been observed in the rat hippocampus after unilateral intraventricular and intrahippocampal injections of kainic acid, which produces extensive seizure activity (Davenport *et al.*, 1990; Sundstrom *et al.*, 1993), following high-frequency MF stimulation in the absence of seizure phenomena (Escobar *et al.*, 1997) and as a consequence of BDNF administration to the MF pathway (Gomez-Palacio-Schjetnan & Escobar, 2008). That MF synaptogenesis was observed bilaterally suggests that NT-3-induced potentiation affects neuronal firing patterns in the hippocampal network probably through the activation of hippocampal commissural pathways, particularly through the activation of glutamatergic hilar mossy cells (Henze *et al.*, 2000). Contralateral MF synaptogenesis might also be supported by the commissural fibres that originate from CA3 pyramidal cells and

project via the hippocampal commissure to the contralateral CA3 area (Escobar *et al.*, 1997; Scharfman *et al.*, 2002; Scharfman, 2007). In fact, it has been reported that stimulation of the CA3 region activates contralateral CA3 cells via commissural projections (Bliss *et al.*, 1983; Queiroz & Mello, 2007) and induces associative MF LTP (Derrick & Martinez, 1994). Additionally, Bramham *et al.* (1996) reported an enhancement in commissural responses after unilateral LTP at the DG that correlates with bilateral nerve growth factor (NGF), BDNF as well as TrkB and TrkC mRNA expression enhancement. Thus, relevant activation of the contralateral MFs through the commissural projection may induce synaptogenesis as a result of associative LTP. In the present experiments, K252a blocked the morphological reorganization elicited by NT-3. Molecular mechanisms elicited by TrkC activation are also importantly related to structural plasticity. In this regard it has been described that NT-3 potentiates synaptic transmission and enhances synapsin and synaptophysin levels, producing changes in synaptic morphology at the neuromuscular synapse (Wang *et al.*, 1995). Furthermore, it has been reported that the lack of TrkC results in smaller and less complex MF buttons, as well as in a reduced number of synaptic vesicles, altering the synaptogenesis and maturation of MF terminals (Martinez *et al.*, 1998; Otal *et al.*, 2005). In the same order of ideas, it has been observed that a prolonged intraventricular infusion of NT-3 (12 µg/day for 14 days) triggers MF sprouting in the inner molecular layer of the DG and the SO of the CA3 region (Xu *et al.*, 2002).

NT-3 produces a metaplastic effect resulting in an MF LTP-HFS blockade

Changes in synaptic efficacy and morphology are examples of the versatile modifications that synapses undergo as a result of activity. It has been proposed that these Hebbian forms of plasticity would need some type of homeostatic regulation to preserve its adequate function (Davis, 2006; Nelson & Turrigiano, 2008). Homeostatic forms of plasticity might provide the global regulation necessary to maintain synaptic strength and plasticity within a functional dynamic range. These forms of plasticity operate with diverse mechanisms, for example by altering the ability of synapses to undergo subsequent Hebbian modifications (metaplasticity), which is thought not only to be essential to maintain synapses within a dynamic functional range but also to be required for the maintenance of a memory trace (Abbott & Nelson, 2000; Perez-Otano & Ehlers, 2005; Abraham, 2008). Thus, considering the NT-3 effects on MF synaptic efficacy and morphology, in the present study, we used intrahippocampal microinfusion of NT-3 to analyse its effects on long-term functional and morphological synaptic reorganization induced by subsequent MF-HFS, sufficient to induce LTP in adult rats *in vivo*.

Our present results show that infusion of NT-3 initiates the regulatory mechanisms that modify the ability of the MF pathway to present LTP induced by HFS. Recently, we showed that BDNF modifies the functional synaptic plasticity induced by HFS at the MF synapse *in vivo* (Schjetnan & Escobar, 2012). Here we observed that the NT-3 infusion produces a metaplastic effect resulting in an MF LTP blockade when HFS is applied 20 min after NT-3 infusion, before NT-3 potentiation is initiated. This idea is supported by previous studies which show that repeated tetanization episodes to the CA1 pathway inhibit the subsequent induction of LTP (Fujii *et al.*, 1991; Huang *et al.*, 1992). In addition, in the present study we included an additional group in which HFS was applied 60 min after NT-3 infusion, when NT-3 potentiation is stable. The results show (Supporting Information, Figs. S1 and S2) that once

NT-3-LTP at the MF pathway has been established it is not affected in the same proportion as it is when HFS is applied at early potentiation states. These results underlie the relevance of the state of activity of the network as a critical determinant of the magnitude of the metaplastic change produced.

In the perforant pathway it has been reported that LTP is accompanied by a robust, long-lasting reduction in lateral path paired-pulse facilitation (Christie & Abraham, 1994). Similar reports have been presented in the motor cortex, where LTP has been blocked in animals previously trained in a motor-dependent task (Rioult-Pedotti *et al.*, 2007), as well as in the insular cortex, where LTP has been blocked in animals previously trained in a conditioned taste aversion task (Rodríguez-Durán *et al.*, 2011). These studies, together with our present results, suggest that previous relevant stimulation to a given pathway, in which potentiation is not strictly evident, initiates metaplastic events that modify its subsequent ability to produce synaptic plasticity.

The molecular identity underlying metaplasticity has not been firmly established. A series of experiments performed in the visual cortex had shown that dark rearing can modify the thresholds for the induction of LTP and LTD in visual cortical neurons in part by an experience-dependent switch in NMDA receptor subunit composition which produces different calcium currents (Philpot *et al.*, 2003; Quinlan *et al.*, 2004). The current evidence suggests that several calcium-dependent sensors could regulate receptor trafficking to increase or decrease the accumulation of glutamate receptors at synaptic sites (Nelson & Turrigiano, 2008). The metaplastic effect observed in the present study was blocked by infusion of NT-3 ± K252a, suggesting that NT-3 is importantly implicated in the response of the MF pathway to subsequent synaptic plasticity through the activation of its Trk receptors. In this regard, it has been observed that overexpression of TrkC enhances hippocampal synaptic activity and LTP at the Schaffer collateral-commissural pathway and leads to significant increases in the level of hippocampal expression of NMDA receptor subunits (Sahun *et al.*, 2007), activation of which is a key trigger for metaplastic changes that inhibit subsequent induction of synaptic plasticity (Abraham, 2008). Furthermore, NT-3 enhances α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA)/kainate receptor-mediated fast monosynaptic EPSP elicited in motoneurons, and this action requires the availability of functional NMDA receptors (Arvanov *et al.*, 2000; Arvanian *et al.*, 2004). Glutamate AMPA and NMDA receptors have been considered as regulators of the response of a pathway to subsequent synaptic plasticity and have been previously suggested to underlie the homeostatic mechanisms that allow synaptic integration (Abraham, 2008).

NT-3 modifies the pattern of synaptic reorganization induced by hippocampal MF HFS

Structural plasticity as a result of activity has been proposed to support synaptic consolidation (Lynch *et al.*, 2007). Therefore, the modulation of such structural modifications in response to previous activity needs to be taken into consideration. Our results show that *in vivo* infusion of NT-3 prior to HFS application at the MF-CA3 pathway modifies the synaptic reorganization pattern observed after HFS, presenting a pronounced reorganization at the CA3 SOSP with an enhanced bilateral appearance. As mentioned above, bilateral reorganization of this nature has also been observed after injections of kainic acid (Davenport *et al.*, 1990; Sundstrom *et al.*, 1993), following HFS at the MF pathway (Escobar *et al.*, 1997) and after intrahippocampal microinfusion of BDNF (Gomez-Palacio-Schjetnan

& Escobar, 2008). Our electron microscopy results corroborate an increase in MF synaptic terminals in the SO of NT-3-infused adult rats with morphological characteristics similar to those found in the SL. This suggests that NT-3, followed by HFS, initiates a homeostatic redistribution of synapses. Although it has been proposed that structural reorganization of synapses could be produced as a consequence of homeostatic plasticity, the dynamics of structural modifications related to homeostatic plasticity have been scarcely investigated (Butz *et al.*, 2009). Reports of increases in structural plasticity as a result of previous activity coincide with our present study. Harms *et al.* (2008) reported an increase in spine size while occluding LTP after previous stimulation. In addition, chronic infusion of NT-3 induced MF sprouting accompanied by down-regulation of TrkA and TrkB receptors (Xu *et al.*, 2002). Interestingly, NT-3 regulates the subsequent BDNF-dependent increase in frequency and amplitude of miniature excitatory postsynaptic currents (mEPSCs) in cultured hippocampal neurons (Paul *et al.*, 2001). Moreover, it has been reported that reciprocal interactions between neurotrophins, especially between BDNF and NT-3, play an important role in the activity-dependent maturation of cortical systems (McAllister *et al.*, 1997; Yamamoto & Hanamura, 2005), and reciprocally increases each other's mRNA cortical levels (Xiong *et al.*, 2002; Patz & Wahle, 2004). Furthermore, NT-3 infusion decreased BDNF mRNA and protein expression in intact sensory nerves (Karchewski *et al.*, 2002), as well as in the hippocampus (Ullal *et al.*, 2007).

In summary, our results show that microinfusion of NT-3 elicits functional modifications in synaptic efficacy at the DG-CA3 hippocampal projection of anesthetized adult rats; these functional changes are accompanied by a presynaptic structural reorganization at the hippocampal MF pathway 7 days after neurotrophin application. These findings support the idea that NT-3 plays an important role as a synaptic modulator of activity-dependent synaptic plasticity in the MF-CA3 pathway. Furthermore, our results show that NT-3 microinfusion modifies the functional and morphological synaptic plasticity induced by HFS at the MF synapse *in vivo*. These results are in accordance with the idea that NT-3 actions modify the ability to present subsequent plasticity, a homeostatic mechanism thought to be essential for the synaptic integration among prolonged temporal domains in the adult mammalian brain.

Supporting Information

Additional supporting information can be found in the online version of this article:

Fig. S1. Effects of acute NT-3 infusion applied 1 h prior to delivery of high-frequency stimulation on MF-CA3 responses *in vivo*.

Fig. S2. NMDA receptor-independency of the MF-LTP induced by HFS.

Acknowledgements

This research was supported by PAPIIT IN212013-3 and CONACYT 60851. This work is part of the first author's thesis for the PhD Program in Biomedical Sciences at Universidad Nacional Autónoma de México.

Abbreviations

AMPA, α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid; BDNF, brain-derived neurotrophic factor; CA3, cornu ammonis 3; CNS, central nervous system; CPP, (RS)-3-(2-carboxypiperazin-4-yl)-propyl-1-phosphonic acid; DCG-IV, 2-(2,3-dicarboxy-cyclopropyl) glycine; DG, dentate gyrus; EPSP,

excitatory postsynaptic potential; GABA, γ -aminobutyric acid; HFS, high-frequency stimulation; LTD, long-term depression; LTP, long-term potentiation; mEPSC, miniature excitatory postsynaptic currents; MF, mossy fiber; mGluRs, metabotropic glutamate receptors; NMDA, *N*-methyl-D-aspartate; NT-3, neurotrophin-3; PBS, phosphate-buffered saline; SL, stratum lucidum; SO, stratum oriens; SP, stratum pyramidale.

References

- Abbott, L.F. & Nelson, S.B. (2000) Synaptic plasticity: taming the beast. *Nat. Neurosci.*, **3**(Suppl), 1178–1183.
- Abraham, W.C. (2008) Metaplasticity: tuning synapses and networks for plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.*, **9**, 387.
- Amaral, D.G. & Dent, J.A. (1981) Development of the mossy fibers of the dentate gyrus: I. A light and electron microscopic study of the mossy fibers and their expansions. *J. Comp. Neurol.*, **195**, 51–86.
- Archer, D.P. & Roth, S.H. (2007) Low concentrations of pentobarbital enhance excitability of rat hippocampal neurons. *Anesth. Analg.*, **105**, 993–997.
- Archer, D.P., Samanani, N. & Roth, S.H. (2001) Small-dose pentobarbital enhances synaptic transmission in rat hippocampus. *Anesth. Analg.*, **93**, 1521–1525.
- Arvanian, V.L., Bowers, W.J., Petruska, J.C., Motin, V., Manuzon, H., Narrow, W.C., Federoff, H.J. & Mendell, L.M. (2004) Viral delivery of NR2D subunits reduces Mg²⁺ block of NMDA receptor and restores NT-3-induced potentiation of AMPA/kainate responses in maturing rat motoneurons. *J. Neurophysiol.*, **92**, 2394–2404.
- Arvanov, V.L., Seebach, B.S. & Mendell, L.M. (2000) NT-3 evokes an LTP-like facilitation of AMPA/kainate receptor-mediated synaptic transmission in the neonatal rat spinal cord. *J. Neurophysiol.*, **84**, 752–758.
- Auerbach, J.M. & Segal, M. (1994) A novel cholinergic induction of long-term potentiation in rat hippocampus. *J. Neurophysiol.*, **72**, 2034–2040.
- Barra-Rodríguez, F.J., Rivera, D.T., Jaffe, D.B. & Martínez, J.L. Jr. (2000) Protein synthesis inhibition blocks the induction of mossy fiber long-term potentiation *in vivo*. *J. Neurosci.*, **20**, 8528–8532.
- Bashir, Z.I., Bortolotto, Z.A., Davies, C.H., Berretta, N., Irving, A.J., Seal, A.J., Henley, J.M., Jane, D.E., Watkins, J.C. & Collingridge, G.L. (1993) Induction of LTP in the hippocampus needs synaptic activation of glutamate metabotropic receptors. *Nature*, **363**, 347–350.
- Berg, M.M., Sternberg, D.W., Parada, L.F. & Chao, M.V. (1992) K-252a inhibits nerve growth factor-induced trk proto-oncogene tyrosine phosphorylation and kinase activity. *J. Biol. Chem.*, **267**, 13–16.
- Bliss, T.V., Lancaster, B. & Wheal, H.V. (1983) Long-term potentiation in commissural and Schaffer projections to hippocampal CA1 cells: an *in vivo* study in the rat. *J. Physiol.*, **341**, 617–626.
- Bramham, C.R., Southard, T., Sarvey, J.M., Herkenham, M. & Brady, L.S. (1996) Unilateral LTP triggers bilateral increases in hippocampal neurotrophin and trk receptor mRNA expression in behaving rats: evidence for interhemispheric communication. *J. Comp. Neurol.*, **368**, 371–382.
- Butz, M., Worgatter, F. & van Ooyen, A. (2009) Activity-dependent structural plasticity. *Brain Res. Rev.*, **60**, 287–305.
- Calixto, E., Thiels, E., Klann, E. & Barriomeuvo, G. (2003) Early maintenance of hippocampal mossy fiber long-term potentiation depends on protein and RNA synthesis and presynaptic granule cell integrity. *J. Neurosci.*, **23**, 4842–4849.
- Castillo, D.V., Figueroa-Guzmán, Y. & Escobar, M.L. (2006) Brain-derived neurotrophic factor enhances conditioned taste aversion retention. *Brain Res.*, **1067**, 250–255.
- Christie, B.R. & Abraham, W.C. (1994) Differential regulation of paired-pulse plasticity following LTP in the dentate gyrus. *NeuroReport*, **5**, 385–388.
- Davenport, C.J., Brown, W.J. & Bahb, T.L. (1990) Sprouting of GABAergic and mossy fiber axons in dentate gyrus following intrahippocampal kainate in the rat. *Exp. Neurol.*, **109**, 180–190.
- Davis, G.W. (2006) Homeostatic control of neural activity: from phenomenology to molecular design. *Annu. Rev. Neurosci.*, **29**, 307–323.
- Derrick, B.E. & Martínez, J.L. Jr. (1994) Opioid receptor activation is one factor underlying the frequency dependence of mossy fiber LTP induction. *J. Neurosci.*, **14**, 4359–4367.
- Derrick, B.E., Weinberger, S.B. & Martínez, J.L. Jr. (1991) Opioid receptors are involved in an NMDA receptor-independent mechanism of LTP induction at hippocampal mossy fiber-CA3 synapses. *Brain Res. Bull.*, **27**, 219–223.

- Derrick, B.E., Rodríguez, S.B., Lieberman, D.N. & Martínez, J.L. Jr. (1992) Mu opioid receptors are associated with the induction of hippocampal mossy fiber long-term potentiation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **263**, 725–733.
- Diogenes, M.J., Costenla, A.R., Lopes, L.V., Jeronimo-Santos, A., Sousa, V.C., Fontinha, B.M., Ribeiro, J.A. & Sebastião, A.M. (2011) Enhancement of LTP in aged rats is dependent on endogenous BDNF. *Neuropharmacology*, **36**, 1823–1836.
- Escobar, M.L., Barea-Rodríguez, E.J., Derrick, B.E., Reyes, J.A. & Martínez, J.L. Jr. (1997) Opioid receptor modulation of mossy fiber synaptogenesis: independence from long-term potentiation. *Brain Res.*, **751**, 330–335.
- Escobar, M.L., Alcocer, I. & Bermúdez-Rattoni, F. (2002) *In vivo* effects of intracortical administration of NMDA and metabotropic glutamate receptors antagonists on neocortical long-term potentiation and conditioned taste aversion. *Behav. Brain Res.*, **129**, 101–106.
- Escobar, M.L., Figueroa-Guzmán, Y. & Gómez-Palacio-Schjetman, A. (2003) *In vivo* insular cortex LTP induced by brain-derived neurotrophic factor. *Brain Res.*, **991**, 274–279.
- Faulkner, R.L., Jang, M.H., Liu, X.B., Duan, X., Sailor, K.A., Kim, J.Y., Ge, S., Jones, E.G., Ming, G.L., Song, H. & Cheng, H.J. (2008) Development of hippocampal mossy fiber synaptic outputs by new neurons in the adult brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 14157–14162.
- Fujii, S., Saito, K., Miyakawa, H., Ito, K. & Kato, H. (1991) Reversal of long-term potentiation (depression) induced by tetanus stimulation of the input to CA1 neurons of guinea pig hippocampal slices. *Brain Res.*, **555**, 112–122.
- Galimberti, L., Gogofa, N., Alberi, S., Santos, A.F., Müller, D. & Caroni, P. (2006) Long-term rearrangements of hippocampal mossy fiber terminal connectivity in the adult regulated by experience. *Neuron*, **50**, 749–763.
- Gao, X.B. & van den Pol, A.N. (1999) Neurotrophin-3 potentiates excitatory GABAergic synaptic transmission in cultured developing hypothalamic neurons of the rat. *J. Physiol.*, **518**, 81–95.
- Gómez-Palacio-Schjetman, A. & Escobar, M.L. (2008) *In vivo* BDNF modulation of adult functional and morphological synaptic plasticity at hippocampal mossy fibers. *Neurosci. Lett.*, **445**, 62–67.
- Harms, K.J., Rioult-Pedotti, M.S., Carter, D.R. & Dumaevsky, A. (2008) Transient spine expansion and learning-induced plasticity in layer 1 primary motor cortex. *J. Neurosci.*, **28**, 5686–5690.
- Harris, E.W. & Cotman, C.W. (1986) Long-term potentiation of guinea pig mossy fiber responses is not blocked by *N*-methyl *D*-aspartate antagonists. *Neurosci. Lett.*, **70**, 132–137.
- Harrison, J.M., Allen, R.G., Pellegrino, M.J., Williams, J.T. & Manzoni, O.J. (2002) Chronic morphine treatment alters endogenous opioid control of hippocampal mossy fiber synaptic transmission. *J. Neurophysiol.*, **87**, 2464–2470.
- Henze, D.A., Urban, N.N. & Barronuevo, G. (2000) The multifarious hippocampal mossy fiber pathway: a review. *Neuroscience*, **98**, 407–427.
- Huang, Y.Y., Colino, A., Selig, D.K. & Malenka, R.C. (1992) The influence of prior synaptic activity on the induction of long-term potentiation. *Science*, **255**, 730–733.
- Ip, N.Y., Maisonpierre, P., Alderson, R., Friedman, B., Furth, M.E., Panayiotatos, N., Squinto, S., Yancopoulos, G.D. & Lindsay, R.M. (1991) The neurotrophins and CNTF: specificity of action towards PNS and CNS neurons. *J. Physiol. (Paris)*, **85**, 123–130.
- Ip, N.Y., Stitt, T.N., Tapley, P., Klein, R., Glass, D.J., Fandl, J., Greene, L.A., Barbacid, M. & Yancopoulos, G.D. (1993) Similarities and differences in the way neurotrophins interact with the Trk receptors in neuronal and nonneuronal cells. *Neuron*, **10**, 137–149.
- Isaac, J.T., Buchanan, K.A., Muller, R.U. & Mellor, J.R. (2009) Hippocampal place cell firing patterns can induce long-term synaptic plasticity *in vitro*. *J. Neurosci.*, **29**, 6840–6850.
- Ito, I. & Sugiyama, H. (1991) Roles of glutamate receptors in long-term potentiation at hippocampal mossy fiber synapses. *NeuroReport*, **2**, 333–336.
- Jacobi, S., Soriano, J., Segal, M. & Moses, E. (2009) BDNF and NT-3 increase excitatory input connectivity in rat hippocampal cultures. *Eur. J. Neurosci.*, **30**, 998–1010.
- Je, H.S., Zhou, J., Yang, F. & Lu, B. (2005) Distinct mechanisms for neurotrophin-3-induced acute and long-term synaptic potentiation. *J. Neurosci.*, **25**, 11719–11729.
- Je, H.S., Yang, F., Zhou, J. & Lu, B. (2006) Neurotrophin 3 induces structural and functional modification of synapses through distinct molecular mechanisms. *J. Cell Biol.*, **175**, 1029–1042.
- Je, S.H., Ji, Y., Wang, Y., Yang, F., Wu, W. & Lu, B. (2010) Presynaptic protein synthesis required for NT-3-induced long-term synaptic modulation. *Mol. Brain*, **4**, 1.
- Jiang, B., Akaneya, Y., Ohshima, M., Ichisaka, S., Hata, Y. & Tsumoto, T. (2001) Brain-derived neurotrophic factor induces long-lasting potentiation of synaptic transmission in visual cortex *in vivo* in young rats, but not in the adult. *Eur. J. Neurosci.*, **14**, 1219–1228.
- Jin, W. & Chavkin, C. (1999) Mu opioids enhance mossy fiber synaptic transmission indirectly by reducing GABAB receptor activation. *Brain Res.*, **821**, 286–293.
- Kang, H. & Schuman, E.M. (1995) Long-lasting neurotrophin-induced enhancement of synaptic transmission in the adult hippocampus. *Science*, **267**, 1658–1662.
- Kang, H. & Schuman, E.M. (2000) Intracellular Ca^{2+} signaling is required for neurotrophin-induced potentiation in the adult rat hippocampus. *Neurosci. Lett.*, **282**, 141–144.
- Karchewski, L.A., Gratto, K.A., Wetmore, C. & Verge, V.M. (2002) Dynamic patterns of BDNF expression in injured sensory neurons: differential modulation by NGF and NT-3. *Eur. J. Neurosci.*, **16**, 1449–1462.
- Kase, H., Iwahashi, K. & Matsuda, Y. (1986) K-252a, a potent inhibitor of protein kinase C from microbial origin. *J. Antibiot. (Tokyo)*, **39**, 1059–1065.
- Kim, H.G., Wang, T., Olafsson, P. & Lu, B. (1994) Neurotrophin 3 potentiates neuronal activity and inhibits gamma-aminobutyrate synaptic transmission in cortical neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 12341–12345.
- Klein, R., Conway, D., Parada, L.F. & Barbacid, M. (1990) The trkB tyrosine protein kinase gene codes for a second neurogenic receptor that lacks the catalytic kinase domain. *Cell*, **61**, 647–656.
- Kolarow, R., Brigadski, T. & Lessmann, V. (2007) Postsynaptic secretion of BDNF and NT-3 from hippocampal neurons depends on calcium calmodulin kinase II signaling and proceeds via delayed fusion pore opening. *J. Neurosci.*, **27**, 10350–10364.
- Kwon, H.B. & Castillo, P.E. (2008) Long-term potentiation selectively expressed by NMDA receptors at hippocampal mossy fiber synapses. *Neuron*, **57**, 108–120.
- Lamballe, F., Klein, R. & Barbacid, M. (1991) trkC, a new member of the trk family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. *Cell*, **66**, 967–979.
- Lamballe, F., Smeyne, R.J. & Barbacid, M. (1994) Developmental expression of trkC, the neurotrophin-3 receptor, in the mammalian nervous system. *J. Neurosci.*, **14**, 14–28.
- Lauterborn, J.C., Isackson, P.J. & Gall, C.M. (1994) Cellular localization of NGF and NT-3 mRNAs in postnatal rat forebrain. *Mol. Cell. Neurosci.*, **5**, 46–62.
- Lee, F.S. & Chao, M.V. (2001) Activation of Trk neurotrophin receptors in the absence of neurotrophins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 3555–3560.
- Lohof, A.M., Ip, N.Y. & Poo, M.M. (1993) Potentiation of developing neuromuscular synapses by the neurotrophins NT-3 and BDNF. *Nature*, **363**, 350–353.
- Lu, B. (2004) Acute and long-term synaptic modulation by neurotrophins. *Prog. Brain Res.*, **146**, 137–150.
- Lynch, G., Rex, C.S. & Gall, C.M. (2007) LTP consolidation: substrates, explanatory power, and functional significance. *Neuropharmacology*, **52**, 12–23.
- Maisonpierre, P.C., Belluscio, L., Friedman, B., Alderson, R.F., Wiegand, S.J., Furth, M.E., Lindsay, R.M. & Yancopoulos, G.D. (1990) NT-3, BDNF, and NGF in the developing rat nervous system: parallel as well as reciprocal patterns of expression. *Neuron*, **5**, 501–509.
- Malenka, R.C. & Bear, M.F. (2004) LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron*, **44**, 5–21.
- Martínez, A., Alcántara, S., Borrell, V., Del Río, J.A., Blasí, J., Otal, R., Campos, N., Boronat, A., Barbacid, M., Silos-Santiago, I. & Soriano, E. (1998) TrkB and TrkC signaling are required for maturation and synaptogenesis of hippocampal connections. *J. Neurosci.*, **18**, 7336–7350.
- Martínez, C.O., Do, V.H. & Derrick, B.E. (2011) Endogenous opioid peptides contribute to associative LTP in the hippocampal CA3 region. *Neurobiol. Learn. Mem.*, **96**, 207–217.
- McAllister, A.K., Lo, D.C. & Katz, L.C. (1995) Neurotrophins regulate dendritic growth in developing visual cortex. *Neuron*, **15**, 791–803.
- McAllister, A.K., Katz, L.C. & Lo, D.C. (1997) Opposing roles for endogenous BDNF and NT-3 in regulating cortical dendritic growth. *Neuron*, **18**, 767–778.
- Mellor, J. & Nicoll, R.A. (2001) Hippocampal mossy fiber LTP is independent of postsynaptic calcium. *Nat. Neurosci.*, **4**, 125–126.
- Messaoudi, E., Bardsen, K., Srebro, B. & Bramham, C.R. (1998) Acute intrahippocampal infusion of BDNF induces lasting potentiation of synaptic transmission in the rat dentate gyrus. *J. Neurophysiol.*, **79**, 496–499.

- Messouadi, E., Ying, S.W., Kamlerma, T., Croll, S.D., & Bramham, C.R. (2002) Brain-derived neurotrophic factor triggers transcription-dependent, late phase long-term potentiation *in vivo*. *J. Neurosci.*, **22**, 7453–7461.
- Nuvakode, S., Sajkumar, S., & Frey, J.J. (2007) Synergistic requirements for the induction of dopaminergic D1/D5-receptor-mediated LTP in hippocampal slices of rat CA1 *in vitro*. *Neuropharmacology*, **52**, 1547–1554.
- Nelson, S.B. & Turrigiano, G.G. (2008) Strength through diversity. *Neuron*, **60**, 477–482.
- Nicoll, R.A. & Schmitz, D. (2005) Synaptic plasticity at hippocampal mossy fiber synapses. *Nat. Rev. Neurosci.*, **6**, 863–876.
- Ojal, R., Martinez, A., & Soriano, E. (2005) Lack of TrkB and TrkC signaling alters the synaptogenesis and maturation of mossy fiber terminals in the hippocampus. *Cell Tissue Res.*, **319**, 349–358.
- Ou, L.C. & Geam, P.W. (2006) Regulation of amygdala-dependent learning by brain-derived neurotrophic factor is mediated by extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol-3-kinase. *Neuropsychopharmacology*, **31**, 287–296.
- Patterson, S.L., Grever, L.M., Schwartzkroin, P.A., & Bothwell, M. (1992) Neurotrophin expression in rat hippocampal slices: a stimulus paradigm inducing LTP in CA1 evokes increases in BDNF and NT-3 mRNAs. *Neuron*, **9**, 1081–1088.
- Patz, S. & Wible, P. (2004) Neurotrophins induce short-term and long-term changes of cortical neurotrophin expression. *Eur. J. Neurosci.*, **20**, 701–708.
- Paul, J., Gottmann, K., & Lessmann, V. (2001) NT-3 regulates BDNF-induced modulation of synaptic transmission in cultured hippocampal neurons. *NeuroReport*, **12**, 2635–2639.
- Paxinos, G. & Watson, C. (2007) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, Orlando.
- Perez-Otano, I. & Ehlers, M.D. (2005) Homeostatic plasticity and NMDA receptor trafficking. *Trends Neurosci.*, **28**, 229–238.
- Philpot, B.D., Espinosa, J.S., & Bear, M.F. (2003) Evidence for altered NMDA receptor function as a basis for metaplasticity in visual cortex. *J. Neurosci.*, **23**, 5583–5588.
- Queiroz, C.M. & Mello, L.E. (2007) Synaptic plasticity of the CA3 commissural projection in epileptic rats: an *in vivo* electrophysiological study. *Eur. J. Neurosci.*, **25**, 3071–3079.
- Quinlan, E.M., Lebel, D., Brosh, I., & Barkai, E. (2004) A molecular mechanism for stabilization of learning-induced synaptic modifications. *Neuron*, **41**, 185–192.
- Ramirez-Amaya, V., Escobar, M.L., Chao, V., & Bermudez-Rattoni, F. (1999) Synaptogenesis of mossy fibers induced by spatial water maze overtraining. *Hippocampus*, **9**, 631–636.
- Ramirez-Amaya, V., Balderas, I., Sandoval, J., Escobar, M.L., & Bermudez-Rattoni, F. (2001) Spatial long-term memory is related to mossy fiber synaptogenesis. *J. Neurosci.*, **21**, 7340–7348.
- Rebola, N., Luján, R., Cunha, R.A., & Muller, C. (2008) Adenosine A2A receptors are essential for long-term potentiation of NMDA-EPSCs at hippocampal mossy fiber synapses. *Neuron*, **57**, 121–134.
- Reichardt, L.F. (2006) Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **361**, 1545–1564.
- Rekart, J.L., Sandoval, C.J., Bermudez-Rattoni, F., & Rautenberg, A. (2007) Remodelling of hippocampal mossy fibers is selectively induced seven days after the acquisition of a spatial but not a cued reference memory task. *Learn. Mem.*, **14**, 416–421.
- Rioult-Pedotti, M.S., Donoghue, J.P., & Dumezsky, A. (2007) Plasticity of the synaptic modification range. *J. Neurophysiol.*, **98**, 3688–3695.
- Rodríguez-Durán, L.F., Castillo, D.V., Mieguel-González, M., & Escobar, M.L. (2011) Conditioned taste aversion modifies persistently the subsequent induction of neocortical long-term potentiation *in vivo*. *Neurobiol. Learn. Memory*, **95**, 510–526.
- Ryden, M. & Ibanez, C.F. (1996) Binding of neurotrophin-3 to p75LNGFR, TrkA, and TrkB mediated by a single functional epitope distinct from that recognized by trkC. *J. Biol. Chem.*, **271**, 5623–5627.
- Sahun, I., Delgado-García, J.M., Armador-Arjona, A., Grall, A., Alberch, J., Diessen, M., & Gruart, A. (2007) Dissociation between CA3-CA1 synaptic plasticity and associative learning in TgNTRK3 transgenic mice. *J. Neurosci.*, **27**, 2253–2260.
- Sandell, J.H., Martin, S.C., & Heinrich, G. (1994) The development of neurotrophin receptor Trk immunoreactivity in the retina of the zebrafish (*Bracon hydalis terio*). *Brain Res. Dev. Brain Res.*, **81**, 192–200.
- Scharfman, H.E. (2007) The CA3 “backprojection” to the dentate gyrus. *Prog. Brain Res.*, **163**, 627–637.
- Scharfman, H.E., Goodman, J.H., Sollas, A.L., & Croll, S.D. (2002) Spontaneous limbic seizures after intrahippocampal infusion of brain-derived neurotrophic factor. *Exp. Neurol.*, **174**, 201–214.
- Schjotman, A.G. & Escobar, M.L. (2012) *In vivo* BDNF modulation of hippocampal mossy fiber plasticity induced by high frequency stimulation. *Hippocampus*, **22**, 1–8.
- Shimazu, K., Zhao, M., Sakata, K., Akbarian, S., Bates, B., Jaenisch, R., & Lu, B. (2006) NT-3 facilitates hippocampal plasticity and learning and memory by regulating neurogenesis. *Learn. Memory*, **13**, 307–315.
- Son, H., Madefain, V., & Carpenter, D.O. (1996) The translocation and involvement of protein kinase C in mossy fiber-CA3 long-term potentiation in hippocampus of the rat brain. *Brain Res.*, **739**, 282–292.
- Squinto, S.P., Stitt, T.N., Aldrich, T.H., Davis, S., Bianco, S.M., Radziejewski, C., Glass, D.J., Masiakowski, P., Furth, M.E., Valenzuela, D.M., DiStefano, P.S., & Yancopoulos, G.D. (1991) trkB encodes a functional receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 but not nerve growth factor. *Cell*, **65**, 885–893.
- Sundstrom, L.E., Mitchell, J., & Wheel, H.V. (1993) Bilateral reorganization of mossy fibers in the rat hippocampus after a unilateral intracerebroventricular kainic acid injection. *Brain Res.*, **609**, 321–326.
- Tanura, M., Koyama, R., Ikegaya, Y., Matsuki, N., & Yamada, M.K. (2006) K252a, an inhibitor of Trk, disturbs pathfinding of hippocampal mossy fibers. *NeuroReport*, **17**, 481–486.
- Terrian, D.M., Ways, D.K., & Ganmon, R.L. (1991) A presynaptic role for protein kinase C in hippocampal mossy fiber synaptic transmission. *Hippocampus*, **1**, 303–314.
- Tessanou, L., Tsoulfas, P., Martin-Zanca, D., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., & Parada, L.F. (1993) trkC, a receptor for neurotrophin-3, is widely expressed in the developing nervous system and in non-neuronal tissues. *Development*, **118**, 463–475.
- Thompson, K.J., Orfila, J.E., Achunta, P., & Martinez, J.L., Jr. (2003) Gene expression associated with *in vivo* induction of early phase-long-term potentiation (LTP) in the hippocampal mossy fiber-Cornu Ammonis (CA) 3 pathway. *Cell. Mol. Biol. (Nasty-je-ground)*, **49**, 1281–1287.
- Thompson, K.J., Mata, M.L., Orfila, J.E., Barea-Rodriguez, E.J., & Martinez, J.L., Jr. (2005) Metabotropic glutamate receptor antagonist AIDA blocks induction of mossy fiber-CA3 LTP *in vivo*. *J. Neurophysiol.*, **93**, 2668–2673.
- Ullal, G.R., Michalski, B., Xu, B., Rucisce, R.J., & Fahnestock, M. (2007) NT-3 modulates BDNF and proBDNF levels in naive and kindled rat hippocampus. *Neurochem. Int.*, **50**, 866–871.
- Wang, T., Xie, K., & Lu, B. (1995) Neurotrophins promote maturation of developing neuromuscular synapses. *J. Neurosci.*, **15**, 4796–4805.
- Wieraszko, A., Li, G., Kordecki, E., Hogan, M.V., & Ehrlich, Y.H. (1993) Long-term potentiation in the hippocampus induced by platelet-activating factor. *Neuron*, **10**, 553–557.
- Xu, B., Futamura, T., Jourd'heuil, H., Zhou, H., Takei, N., Diverse-Pierluissi, M., Plevy, S., & Nawa, H. (2002) Neurotrophins induce BDNF expression through the glutamate receptor pathway in neocortical neurons. *Neuropharmacology*, **42**, 903–912.
- Xu, B., Michalski, B., Rucisce, R.J., & Fahnestock, M. (2002) Continuous infusion of neurotrophin-3 triggers sprouting, decreases the levels of TrkA and TrkC, and inhibits epigenesis and activity-dependent axonal growth in adult rats. *Neuroscience*, **115**, 1295–1308.
- Yamamoto, N., & Hamamura, K. (2005) Formation of the thalamocortical projection regulated differentially by BDNF- and NT-3-mediated signaling. *Rev. Neurosci.*, **16**, 223–231.
- Zhang, H.T., Li, L.Y., Zou, X.L., Song, X.B., Hu, Y.L., Feng, Z.T., & Wang, T.T. (2007) Immunohistochemical distribution of NGF, BDNF, NT-3, and NT-4 in adult rhesus monkey brains. *J. Histochem. Cytochem.*, **55**, 1–19.

Supplementary material

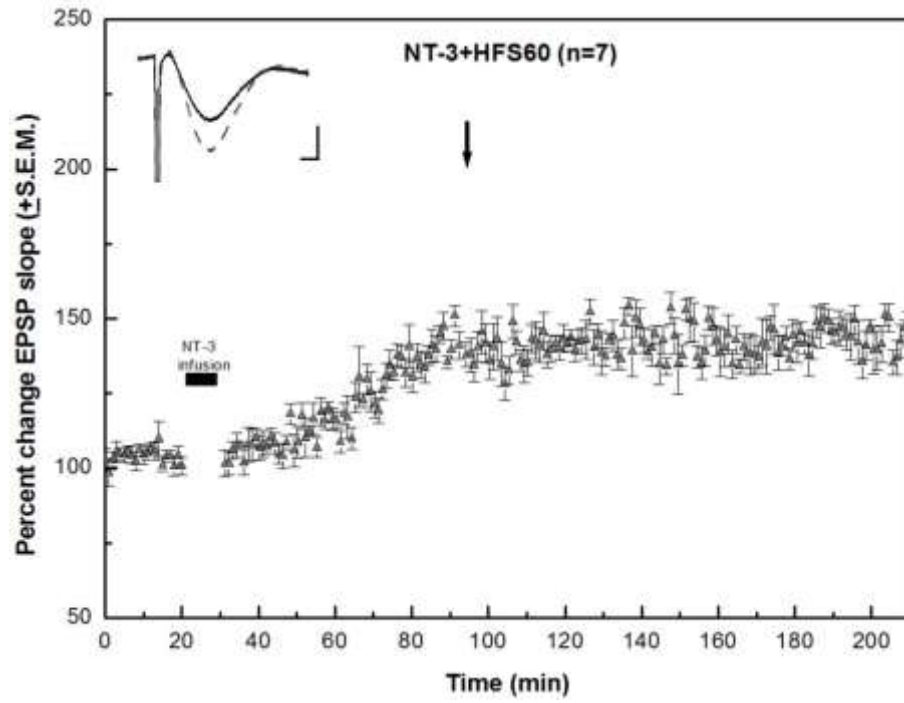
One additional group was processed in order to analyze the interaction between NT-3 and HFS once NT-3 potentiation has been established. For this purpose electrophysiological recordings at the MF pathway were performed in anesthetized animals as previously described in the present document. NT-3+HFS60 group (n=7) underwent surgery, had electrodes implanted and received HFS 60 min after intrahippocampal microinfusion of NT-3 (2 μ g/2 μ l/0.2 μ l/min; Alomone Labs., Jerusalem; Jiang *et al.*, 2001; Messaoudi *et al.*, 2002; Escobar *et al.*, 2003; Ou & Gean, 2006; Gomez-Palacio-Schjetnan & Escobar, 2008).

The CA3 EPSP consisted of potentials of 0.39 \pm 0.03 mV (mean \pm S.E.M.) elicited with 40 μ A current pulses of 0.1-0.25 ms duration. These responses initiate at 1.8 to 3 ms post-stimulation and presented its valley at 8 ms with an average slope of 0.14 \pm 0.011 (mean \pm S.E.M.) in agreement with previous studies (Derrick *et al.*, 1991; Escobar *et al.*, 1997, Schjetnan and Escobar 2012). NT-3 produced an enhancement in the CA3 field EPSP slope values that started approximately 20 min after neurotrophin infusion, reaching a stable plateau at 1hr. Application of HFS 60 min after NT-3 microinfusion, showed that once NT-3-LTP at the MF pathway has been established it is not affected in the same proportion as it is when HFS is applied at early potentiation states (Figure S1). Repeated-measures ANOVA for after tetanus slope increases revealed significant differences among groups NT-3+HFS60, NT-3+HFS and NT-3 groups $F_{2, 22} = 27.47$; $P < 0.001$. Post-hoc analysis with Fisher's test showed significant differences between NT-3+HFS60 and NT-3+HFS groups ($p < 0.001$), but not between NT-3+HFS60 and NT-3 groups. At 2 h post-infusion, the percent changes (\pm S.E.M.) in the EPSP slope for the NT-3+HFS60, NT-3+HFS, and NT-3 groups were 139.89 \pm 1.01, 99.01 \pm 0.28, and 141.37 \pm 0.39, respectively. NT-3 induced potentiation was not associated with afterdischarges or other overt epileptiform activity as assessed by the continuously recorded hippocampal EEG.

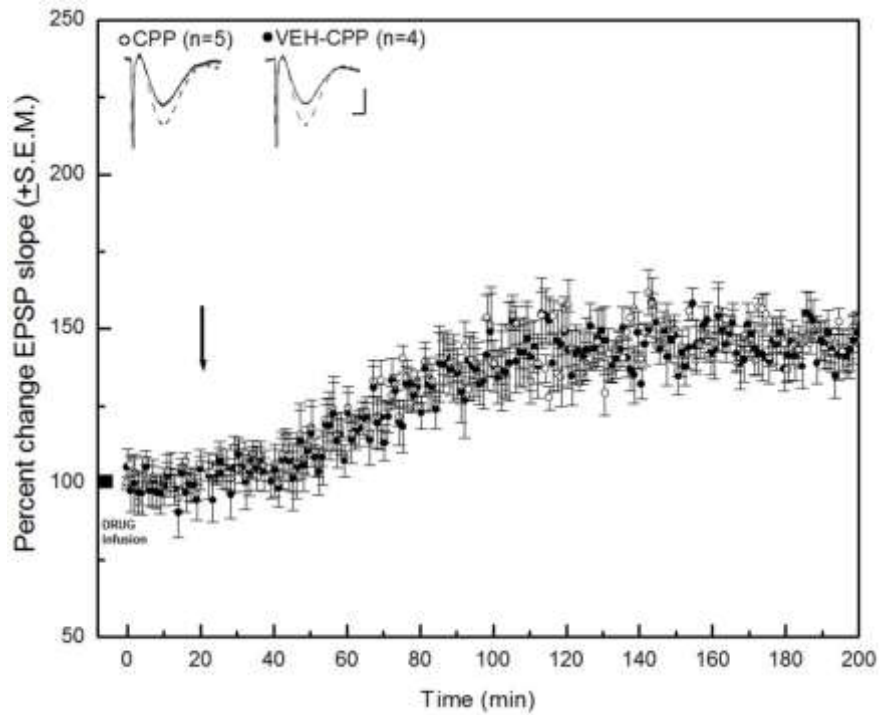
In order to verify the NMDA receptor-independency of the MF-LTP induced by the protocol of stimulation used in the present study (3 trains 100Hz/1s/20s intertrain), two additional groups were processed. For this purpose electrophysiological recordings at the MF pathway were performed in anesthetized animals as previously described in the present document. CPP group (n=5) and VEH-CPP group (n=4) underwent surgery, had electrodes implanted and 30 min before the HFS application (3 trains 100Hz/1s/20s intertrain) received intrahippocampal microinfusion of the competitive NMDA receptor antagonist (RS)-3-(2-carboxipiperazin-4-y1)-propyl-1-phosphonic acid (CPP) (3 nmol/ μ l; 0.2 μ l/min; Tocris, Ellisville, MO) or its vehicle (Escobar *et al.*, 2002; Martínez *et al.*, 2011; Barea-Rodriguez *et al.*, 2000).

The CA3 EPSP consisted of potentials of 0.38 \pm 0.07 mV (mean \pm S.E.M.) elicited with 40 μ A current pulses of 0.1-0.25 ms duration. These responses initiate at 1.8 to 3 ms post-stimulation and presented its valley at 8 ms with an average slope of 0.15 \pm 0.003 (mean \pm S.E.M.) in agreement with previous studies (Derrick *et al.*,

1991; Escobar et al., 1997, Schjetnan and Escobar 2012). Repeated-measures ANOVA for after tetanus slope increases showed no significant differences between groups $F_{1,7} = 3.71$; $P < 0.252$. Post-hoc analysis with Fisher's test did not reveal significant differences between CPP and VEH-CPP groups. At 2 h post-infusion, the percent changes (\pm S.E.M.) in the EPSP slope for CPP and VEH-CPP groups were 139.88 ± 2.97 and 138.12 ± 3.23 , respectively. The potentiation induced by HFS was not associated with after discharges or other overt epileptiform activity as assessed by the continuously recorded hippocampal EEG. These results corroborate the NMDA receptor independency of this form of MF-LTP in agreement with previous studies (Harris & Cotman, 1986; Derrick et al., 1991; Derrick et al., 1992; Escobar et al., 1997; BareaRodríguez et al., 2000; Harrison et al., 2002; Thompson et al., 2003).



Supplementary figure 1



Supplementary figure 2

Supplementary figure caption

Figure S1. Effects of acute NT-3 infusion applied one hour prior to delivery of high-frequency stimulation on MF-CA3 responses in vivo. Plot of mossy fiber evoked responses from animals that received NT-3, 60 min before delivery of HFS (arrow). The top of the graph shows representative traces of MF fiber field potentials obtained immediately before NT-3 microinfusion (full line), and 100 min after (dotted line) HFS. Scale bar: 5ms and 0.15 mV. Arrows indicate HFS delivery (3 trains 100Hz/1s/20s intertrain). Bar indicate the infusion period.

Figure S2. NMDA receptor-independency of the MF-LTP induced by HFS. Plot of mossy fiber evoked responses from animals that received the competitive NMDA receptor antagonist (CPP, open circles) or its vehicle (VEH-CPP, filled circles) 30 min before delivery of HFS. The top of the graph shows representative traces of MF field potentials obtained immediately before (full line) and 170 min after (dotted line) HFS. Scale bar: 5ms and 0.15 mV. Arrows indicate HFS delivery (3 trains 100Hz/1s/20s intertrain). Bar indicate the infusion period.

15. ANEXO II

El anexo II es la revisión que trata sobre la participación de la Neurotrofina-3 en la plasticidad sináptica. El documento está en preparación y será enviado próximamente a publicación.

La neurotrofina-3 y la plasticidad sináptica

Laura E. Ramos-Languren y Martha L. Escobar

Resumen. A partir del descubrimiento del factor de crecimiento neuronal (NGF) en principio de la década de 1950 y del factor neurotrópico derivado del cerebro (BDNF) en 1982, se acumularon numerosas evidencias sobre la participación de estas proteínas en diversos procesos de diferenciación y proliferación celular, supervivencia, crecimiento, migración y formación de sinapsis. A principios de 1990 se identificaron nuevos miembros de esta familia de proteínas denominadas neurotrofinas, la neurotrofina-3 (NT-3) y la neurotrofina 4/5 (NT-4/5), de las cuales también se inició una serie de investigaciones en torno a ellas y su relación con el desarrollo, la fisiología, la plasticidad sináptica y la patología del sistema nervioso. Actualmente se sabe que las neurotrofinas modulan de manera importante las capacidades funcionales de poblaciones neuronales, tanto en el sistema nervioso central, como periférico. En particular la NT-3 se ha relacionado de forma importante en el desarrollo, la supervivencia y la diferenciación neuronal, asimismo se ha demostrado que modula la transmisión sináptica y la excitabilidad neuronal. La presente revisión se centra en presentar evidencias acerca del papel que desempeña la NT-3 en la plasticidad sináptica, así como en los mecanismos celulares que desencadena para llevar a cabo sus acciones, brindando un panorama general en torno a lo que reporta la literatura respecto a esta neurotrofina y su participación en la funcionalidad del sistema nervioso.

Introducción

El tratar de dilucidar los mecanismos mediante los cuales el sistema nervioso central (SNC) almacena información por periodos prolongados, ha representado un reto para las neurociencias en los últimos años. Entre los hallazgos más importantes en este sentido, se encuentran las recientes investigaciones que involucran al grupo de proteínas denominadas neurotrofinas, en la plasticidad sináptica de larga duración en el sistema nervioso adulto (Huang y Reichardt, 2001, Lu et al., 2005; Reichardt, 2006). En el SNC las neurotrofinas se encuentran expresadas predominantemente en la neocorteza y el hipocampo. Actualmente se sabe que sus niveles de secreción son regulados por la actividad sináptica y que ejercen sus acciones en la eficiencia de la comunicación de las sinapsis tanto en las células presinápticas como en las postsinápticas (Lu et al. 2005; Kolarow et al. 2007). La investigación realizada durante las dos décadas pasadas ha revelado que las neurotrofinas regulan casi todo los aspectos del desarrollo de circuitos neuronales y su funcionamiento, incluyendo proliferación y diferenciación, crecimiento axonal y dendrítico, así como la plasticidad sináptica (Park y Poo 2013).

Las neurotrofinas y sus receptores

Las neurotrofinas son una familia de proteínas que inicialmente fueron identificadas como factores de supervivencia en neuronas simpáticas y sensoriales, así como en la inducción del crecimiento de fibras neurales. Actualmente se considera que pueden modular diversos procesos como el desarrollo, la supervivencia y la plasticidad sináptica tanto en el Sistema Nervioso Central, como en el Periférico (SNP) (Lu, 2003; Reichardt 2006). Dentro de esta familia se ha identificado al factor de crecimiento nervioso (Nerve growth factor, NGF), el factor neurotrópico derivado del cerebro (Brain derived neurotrophic factor, BDNF), la neurotrofina-3 (NT-3), la neurotrofina 4/5 (NT-4/5), la neurotrofina-6 (NT-6) y la neurotrofina-7

(NT-7), las dos últimas identificadas recientemente (Nilsson et al., 1998; Götz et al., 2002). Se ha descrito que varias de estas proteínas presentan una elevada homología en su secuencia polipeptídica entre ellas y que esta secuencia está altamente conservada en diferentes especies (Longhlin y Fallon, 1993).

Después del descubrimiento de las primeras neurotrofinas se propusieron algunos criterios para poder considerar a una molécula como neurotrofina, entre ellos están: (1) que la molécula esté disponible en cantidades subsaturantes o limitantes, (2) que actúen a nivel presináptico mediante su interacción con receptores, (3) deben estar presentes a nivel de las terminales nerviosas, (4) producir una acción inmediata de activación de la fosforilación en tirosinas y (5) debe inducir el transporte retroaxonal de vesículas endocíticas transportándose en ellas la propia neurotrofina con su receptor hasta el soma donde modulen la expresión génica promoviendo la supervivencia y la diferenciación neuronal (Oppenheim, 1989).

En la actualidad se sabe que las neurotrofinas pueden ser transportadas de forma anterógrada (Collin et al., 2001) como retrógrada (Kohara et al., 2001). Son transportadas en gránulos secretorios, su secreción en el SNC es regulada fundamentalmente por la actividad sináptica (Hartmann et al., 2001; Aicardi et al., 2004; Kolarow et al., 2007) aunque también se ha postulado su secreción constitutiva (Blochl y Thoenen, 1996; Farhadi, et al., 2000; Lessman et al., 2003). Las neurotrofinas son sintetizadas originalmente como proteínas precursoras denominadas proneurotrofinas (con un peso aproximado de 30kDa), estas moléculas experimentan sucesivos cortes hidrolíticos hasta lograr la forma madura de la proteína (que tienen un peso aproximado de 14kDa), las enzimas encargadas de realizar estos cortes son llamadas prohormonas convertasas (Chao y Bothwell, 2002). Una vez en su forma madura las neurotrofinas forman homodímeros unidos de forma no covalente, se ha reportado que la dimerización es esencial para que puedan ejercer sus acciones, ya que permite que la proteína sea menos soluble y más estable (Binder, 2007).

Hoy en día se conocen dos tipos de receptores para las neurotrofinas. El primer tipo de receptor es glicoprotéico de baja afinidad ($K_d = 10^{-9}$ M) con las neurotrofinas maduras, perteneciente a la familia de receptores TNFR (tumour necrosis factor receptor) denominado p75^{NTR} (Neurotrophin receptor of 75 kDa) que interactúa con todas las neurotrofinas con una afinidad muy similar (Frade y Barde, 1998). El segundo tipo de receptores también son glicoprotéicos codificados por los genes *trk*; miembros de la familia de los receptores de tirosinasa (Trk). Los receptores Trk presentan una alta afinidad con las neurotrofinas maduras ($K_d = 10^{-11}$ M). Las glicoproteínas de estos receptores son específicas para cada una de las neurotrofinas, actualmente se reconocen tres tipos de receptores Trk, siendo TrkA, al cual se une preferentemente NGF, TrkB, al que se ligan BDNF y NT4/5 y TrkC, que tiene sitios de unión para NT-3, aunque se sabe que esta neurotrofina también puede ejercer acciones a través de los otros dos tipos de receptores Trk pero con menor afinidad (Clary y Reichardt 1994; Dechant et al., 1994; Strohmaier et al., 1996). Se ha descrito que el receptor p75 puede funcionar como un correceptor al formar una estructura heterodimérica con el receptor Trk generando cambios en las constantes de afinidad hacia las neurotrofinas (Chao y Lee 2004). Estudios recientes han mostrado que las proneurotrofinas al interactuar con los receptores p75 ejercen efectos opuestos a los que realizan las neurotrofinas en su forma madura, lo cual sugiere la importancia que tiene la segmentación proteolítica de las proneurotrofinas para dirigir los mecanismos de acción de las neurotrofinas (Lu et al., 2005).

La unión de las neurotrofinas con sus receptores induce una dimerización de estos últimos, lo que genera la autofosforilación en múltiples residuos intracelulares de tirosina dando lugar a la unión con proteínas blanco para estos receptores. Dentro de las proteínas

iniciales activadas están la fosfolipasa C (PLC), la proteína p85 (que corresponde a la subunidad no catalítica de la fosfatidilinositol-3-cinasa, PI-3K) y Shc (una secuencia que contiene un dominio homólogo a SH-2). La activación de dichas proteínas blanco puede generar la activación de tres vías de señalización intracelular (figura 1): (1) la vía de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs), (2) la vía de PLC y (3) la vía PI-3K-Akt (o proteína cinasa B), estas vías convergen en la fosforilación (sitio Ser 133) del factor de transcripción CREB (proteína de unión al elemento responsivo a AMP cíclico) (Patapoutian y Reichardt, 2001).

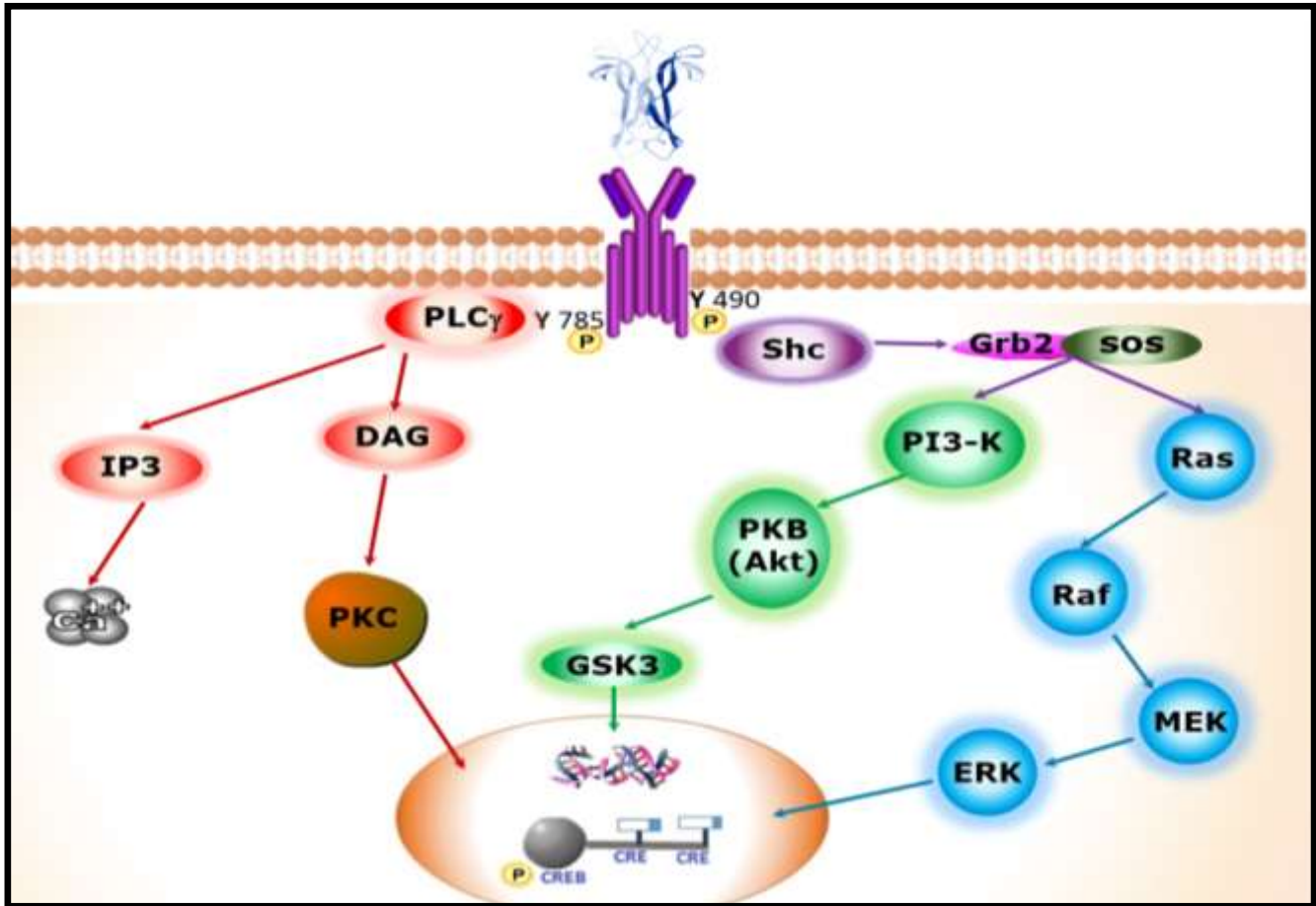


Figura 1. Vías de señalización activadas por las neurotrofinas. Los receptores Trk controlan tres vías de señalización. 1) La fosforilación de Ras inicia la activación de la vía de MAP cinasas, lo que promueve procesos como la diferenciación y el crecimiento neuronal. 2) La activación de PI-3K iniciada por Ras que fosforila a PKB y ésta a GSK3 promoviendo la supervivencia y el crecimiento neuronal. 3) La activación de la vía PLC γ se inicia por la fosforilación de un residuo de tirosina⁷⁸⁵ y tiene como resultado el incremento de calcio intracelular que activa a proteínas cinasas (como PKC y CaMK) relacionadas con la plasticidad sináptica (Modificado de Reichardt, 2006).

La neurotrofina-3 y su expresión en el sistema nervioso

La NT-3 fue identificada en 1990 por varios laboratorios simultáneamente (Ernfors et al., 1990; Hohn et al., 1990; Maisonpierre et al., 1990a; Rosenthal et al., 1990), siendo la primera neurotrofina identificada sin necesidad de purificar previamente la proteína nativa. Fue

llamada también HDNF (Hippocampal derived neurotrophic factor, por su alta expresión en el hipocampo) (Ernfors et al., 1990) y NGF-2 (Nerve growth factor-2) (Kaisho et al., 1990). Esta neurotrofina presenta una homología elevada estructural con NGF y BDNF (Thoenen, 1995), es un polipéptido con un peso molecular de 27.2 kDa en su forma dimérica (figura 2), cuya estructura madura consta de 119 aminoácidos y se genera de su precursor pro-NT-3, el cual consta de 258 aminoácidos (Maisonpierre et al 1990b). Ya en su forma madura tiene una identidad en su secuencia de aminoácidos del 57% y 58% con el NGF y BDNF, respectivamente, teniendo una homología aproximada del 48% entre estas tres proteínas. La NT-3 al igual que el NGF y BDNF presentan seis residuos de cisteína altamente conservados. (Maisonpierre et al., 1990b; Hallböök et al., 1993).

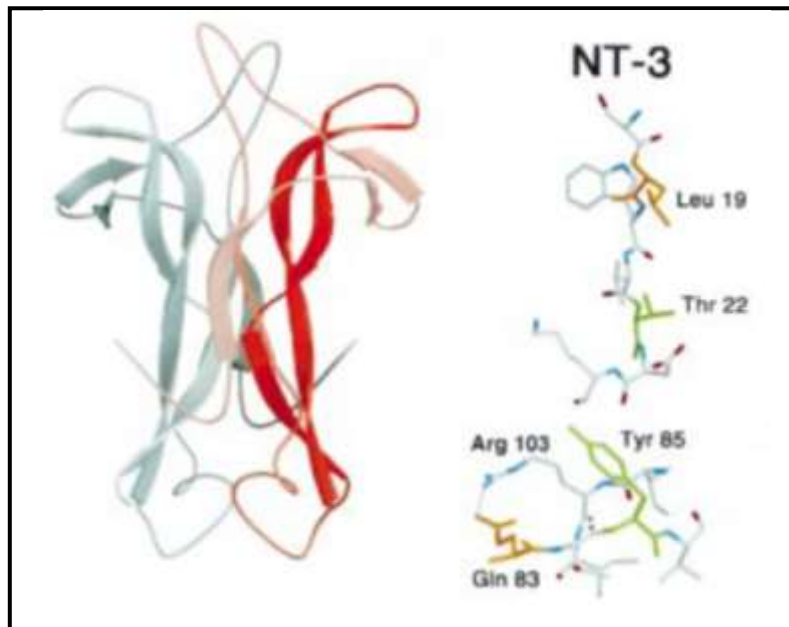


Figura 2. Estructura de la Neurotrofina-3. A la izquierda se muestra la estructura dimérica de la NT-3 obtenida mediante cristalografía de rayos-X. A la derecha se muestran los 4 residuos más importantes para la unión específica con su receptor TrkC: Leu 19, Thr 22, Tyr 85 y Gln 83 (Butte et al., 1998).

La expresión de la NT-3 se presenta en diferentes especies como peces (Caminos et al., 1999), anfibios (Duprey-Diaz et al., 2003); aves (Hallböök et al., 1996) y diferentes especies de mamíferos (rata, ratón, gato, cerdo, mono y humano) (Maisonpierre et al., 1991; Ernfors et al., 1992; Lein et al., 2000; Garcia et al., 2003; Zhang et al., 2007).

Desde su descubrimiento, se describió que la NT-3 se expresaba en diferentes tejidos como la piel, el corazón, el hígado, intestinos, los riñones, el esplenio y el timo. En el sistema nervioso periférico la distribución de NT-3 es más amplia, con una alta presencia en la médula espinal (Maisonpierre et al., 1990a). Respecto al cerebro, durante el desarrollo la expresión de NT-3 es alta comparada con la expresión de otras neurotrofinas. Sin embargo, en días postnatales la expresión de esta proteína disminuye alrededor del 50%, aunque se mantiene en niveles similares respecto al BDNF y NGF en áreas como el hipocampo, el cerebelo y algunas regiones de la neocorteza (Maisonpierre et al., 1990 a y b).

Durante el desarrollo del SNC la expresión de la NT-3 es más prominente en regiones donde hay proliferación, migración y diferenciación de neuronas, en contraste a la expresión del BDNF, el cual tiene una expresión más elevada una vez que la neurogénesis ha ocurrido.

Los niveles en ciertas regiones del SNC son muy similares para estas neurotrofinas, lo cual muestra una relación recíproca entre la NT-3 y el BDNF indicando que pueden actuar en las mismas poblaciones neuronales del SNC y sugiriendo que la NT-3 juega un papel importante en el desarrollo de estas neuronas (quizá durante el establecimiento de los contactos sinápticos) mientras que el BDNF puede actuar más tarde en las mismas neuronas, por ejemplo en procesos de maduración o mantenimiento de los contactos sinápticos (Maisonpierre, et al. 1990b). El patrón de expresión de la NT-3 en el desarrollo del SNC tiene similitudes con el de la nestina, una proteína de los filamentos intermedios cuya expresión es característica en regiones en neurogénesis (Lendahl et al., 1990).

En el cerebro adulto la expresión de la NT-3 se muestra en varias regiones como el cerebelo, las capas II, III, IV y VI de la corteza; y los niveles de expresión más altos se presentan en el giro dentado hipocampal (GD) (Zhang et al., 2007), donde se ha observado que puede modular la neurogénesis, el mantenimiento de un fenómeno de plasticidad sináptica denominado potenciación de largo plazo (LTP, por sus siglas en inglés) y el almacenamiento de información en una tarea de aprendizaje espacial (Shimazu et al., 2006).

En 2004, el grupo de Shetty y colaboradores describieron que en el hipocampo de ratas la expresión de la NT-3 se modificaba respecto a la edad encontrando que las ratas jóvenes tenían niveles promedio de 14 ng/g de tejido húmedo, las ratas adultas un promedio de 17.5 ng/g de tejido húmedo y las ratas seniles de 20.5 ng/g de tejido húmedo, este incremento se ha relacionado con el papel de supervivencia de las neuronas que se le ha atribuido a la NT-3. Los niveles para NT-3 reportados en este estudio son muy similares a los que se reportan para el BDNF, lo cual sugiere que la concentración de estos factores neurotróficos en el hipocampo adulto tiene una relación con procesos plásticos como cambios morfológicos, la LTP, el aprendizaje y la memoria.

Expresión y participación del receptor TrkC en el sistema nervioso

Mediante el análisis con la técnica de Northern blot, Lamballe et al. (1991), mostraron que en tejidos de ratón adulto había abundantes transcritos para el receptor TrkC. Tres años más tarde, a través de la técnica de hibridación *in situ* realizaron un análisis de la expresión del ARNm del receptor observando que en tejidos no neuronales se expresa en áreas como el epitelio olfatorio, las glándulas sublingual y submaxilar, la lengua, la aorta, el diafragma, los folículos capilares y extremidades. Mientras que en el SNC reportaron que la expresión del receptor TrkC coincide con el patrón de expresión espacio-temporal de su ligando la NT-3, resaltando la expresión para ambas proteínas en el hipocampo adulto en niveles altos en el GD (figura 3) y en la capa granular del cerebelo. Asimismo en el sistema adulto se encontraron que en la corteza cerebral tiene una intensa expresión en las capas II, III y VI. En el diencefalo la expresión más marcada se localiza hacia la región centromedial del tálamo y de manera más superficial en la habénula; el núcleo mediodorsal del tálamo aunque muestra altos niveles durante la embriogénesis, no muestra expresión en la etapa adulta. En el hipotálamo, los niveles de expresión más alta se detectan en los núcleos dorso y ventromedial adyacentes al tercer ventrículo, así como en la eminencia media (Lamballe et al., 1994).

De manera similar a la coincidencia en los patrones de expresión espaciales de BDNF y NT-3, sus receptores TrkB y TrkC también manifiestan similitudes en cuanto a la distribución en algunas áreas del SNC, lo cual indica la interacción de estas neurotrofinas con sus respectivos receptores (Klein et al., 1990; Lamballe et al., 1994). Mientras que en el desarrollo la expresión de TrkC correlaciona con la neurogénesis, la diferenciación celular, la

supervivencia y el crecimiento axonal, el mantenimiento de esta proteína a través de la etapa adulta refleja que puede ejercer diferentes acciones en diversas etapas de la ontogenia mediadas a través de la NT-3, más adelante, en esta revisión se presentan evidencias acerca de su participación en el sistema adulto.

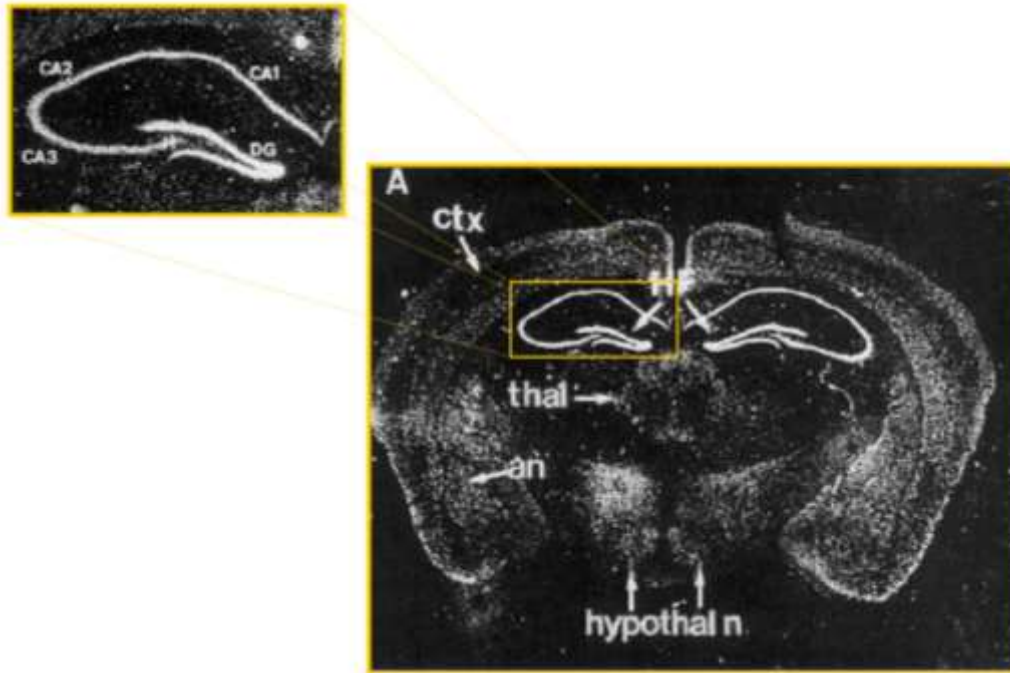


Figura 3. Hibridación *in situ* para el receptor TrkC en el cerebro de ratón adulto. Se muestran una sección coronal a nivel del hipocampo dorsal, se observa su expresión en la corteza (ctx), en el hipocampo (HF), núcleo amigdalino (an), tálamo (thal) e hipotálamo (hypothal n). En el hipocampo (figura superior izquierda), todos los campos de Ammon (CA1-CA3) y el hilus muestran la presencia del receptor, siendo las células granulares del giro dentado las que muestran niveles más altos para TrkC (modificado de Lamballe et al., 1994).

Tanto las neurotrofinas como sus receptores tienen una importante participación en el establecimiento adecuado de las conexiones sinápticas, en este sentido se ha reportado que los receptores endógenos tienen un papel fundamental en la formación y maduración de los contactos que establecen las fibras musgosas hipocampales¹, ya que en ratones transgénicos *trkC*^{-/-} se ha observado una reducción en el número de contactos y de vesículas sinápticas de estas fibras, también han reportado que estos ratones presentan alteraciones en la expresión de proteínas asociadas a la liberación de neurotransmisor, asimismo observaron una disminución en la longitud del estrato lúcido², sugiriendo que el gen que codifica para este receptor tiene un rol en la modulación de la formación de contactos sinápticos (Martínez et al., 1998; Otal et al., 2005).

¹ Fibras musgosas hipocampales: Son los axones provenientes de las células granulares en el giro dentado, que envían sus proyecciones hacia las células piramidales del área CA3 y se han visto relacionadas con aprendizaje de tipo espacial.

² Estrato lúcido: Capa hipocampal en donde se contactan las fibras musgosas con las dendritas apicales de las células piramidales de CA3.

El grupo de Delgado-García reportó un estudio que apoya la idea acerca de que las neurotrofinas y sus receptores pueden servir como moduladores de la eficiencia sináptica; de este modo analizaron la sobreexpresión del receptor TrkC (TgNTRK3) en la plasticidad sináptica y la expresión de subunidades de receptores a glutamato. Para ello usaron un paradigma de condicionamiento, donde el estímulo condicionado fue un tono y el incondicionado un shock eléctrico, midieron los potenciales postsinápticos excitatorios (PPSE) de campo en la vía de las colaterales de Schaffer³, encontrando un aumento en la pendiente de éstos durante las sesiones de condicionamiento en la cepa salvaje, este incremento presentó una correlación, respecto a la evolución del aprendizaje; sin embargo los PPSE de la cepa TgNTRK3 pese a que alcanzaron niveles extremadamente altos no tuvieron una correlación con las curvas de aprendizaje. La LTP generada en la cepa TgNTRK3 también fue significativamente de más duradera que en la cepa salvaje. Las modificaciones funcionales fueron acompañadas por cambios en la expresión de las subunidades de los receptores NMDA⁴: NR1 y NR2B, pero no en su sitio de fosforilación (Ser 896 ó Ser 897); además no detectaron cambios para subunidades de otros receptores a glutamato como son los receptores a kainato y AMPA⁵, en conjunto este estudio indica que la interacción NT-3/TrkC puede regular la transmisión y la plasticidad sináptica a través de la modulación de la transmisión glutamatérgica de la conexión de la vía CA-3- CA1 hipocampal (Sahún et al., 2007).

La neurotrofina-3 y su participación en la modulación de la funcionalidad y estructura sináptica

En el sistema nervioso periférico

La funcionalidad del sistema nervioso es crucialmente dependiente de las conexiones sinápticas precisas entre las neuronas que lo constituyen. Incluso después de que el patrón inicial de conectividad es establecido, la fortaleza de las conexiones es modulada pre y postsinápticamente. Esta modulación permite que tanto la presinapsis como la postsinapsis se ajusten a las entradas de información para cambiar la comunicación y la estructura sináptica. Actualmente se conoce que las neurotrofinas pueden modular estos procesos, de modo que en un periodo corto de tiempo (segundos) están asociadas con el fortalecimiento de las sinapsis preexistentes y en el largo plazo (horas o días), sus acciones involucran la formación y mantenimiento de nuevos contactos sinápticos (Lu, 2004).

En cultivos de sinapsis neuromusculares (SNMs) de *Xenopus laevis* se ha descrito que la exposición aguda con BDNF y NT-3 potencia rápidamente la transmisión sináptica, incrementando las corrientes sinápticas espontáneas (CSE); además el tratamiento en periodos prolongados con las mismas neurotrofinas produce cambios significativos en la plasticidad sináptica y la morfología presentando aumentos en la arborización y número de contactos sinápticos, así como un incremento en los niveles de proteínas relacionadas a la

³ Colaterales de Schaffer: Conexión formada por los axones de las células piramidales de la región CA3 hipocampal que hacen contacto con las células piramidales del área CA1.

⁴ NMDA: N-metil-D-aspartato, receptores ionotrópicos a glutamato, permiten la entrada principalmente de calcio, aunque también pueden permitir el paso de potasio y sodio a través de ellos.

⁵ AMPA: (α -amino-3-hidroxy-5-methyl-isoxazole propionic acid), receptores ionotrópicos a glutamato, que permiten la entrada de sodio, contribuyendo a la depolarización de las membranas.

liberación del neurotransmisor (sinapsina y sinaptofisina), estos efectos son dependientes de la interacción de las neurotrofinas con sus receptores de tirosina cinasa (Lohof et al., 1993; Wang et al., 1995; Lu, 2004).

En este tipo de sinapsis (SNMs) también se han descrito algunos rasgos característicos requeridos para que la NT-3 efectúe sus acciones sobre la plasticidad sináptica de corto y de largo plazo, estos son: la endocitosis del complejo receptor (NT-3/TrkC), la activación del sustrato de PI3K (Akt) así como la síntesis de nuevas proteínas (Je et al., 2005). Este mismo grupo un año después (Je et al., 2006), ha reportado que la NT-3 en esta preparación puede activar a través de la interacción con su receptor TrkC dos vías de señalización simultáneamente para lograr diferentes efectos, mostraron por una parte, que para modular la funcionalidad activa la liberación de calcio intracelular, el cual da lugar a la activación de proteínas cinasas, donde destaca la activación de la proteína CaMKIV que fosforila a CREB; por otra parte, la modulación de la formación de nuevos contactos sinápticos esta dada por la activación de la vía de las MAPKs (figura 4). Sin embargo los mecanismos que activa la NT-3 para llevar a cabo sus acciones no han sido totalmente esclarecidos, se ha planteado que puede activar las tres vías activadas por las neurotrofinas, anteriormente descritas; sin embargo, algunos estudios apuntan a una activación predominantemente llevada a cabo mediante la vía de los fosfoinosítidos (Yang et al., 2001; Je et al., 2005; Jin et al., 2005; Li et al., 2008), aunque en otros estudios se muestra que activa vías de señalización distintas (Hu et al., 2004; Esteban et al., 2008); no obstante, es importante tomar en cuenta el tipo de preparación, el proceso con el que se involucra la acción de la neurotrofina, así como el tipo celular.

Como se mencionó en líneas anteriores, se ha propuesto que después de que el patrón inicial de conectividad es establecido, la fortaleza de las conexiones puede seguir siendo modulada. Esta modulación permite que la pre y la postsinapsis se ajusten a las entradas sinápticas para cambiar la talla de los sitios sinápticos y para generar posibles arreglos de la fortaleza sináptica inducidos por diferentes entradas presinápticas. Arvanian et al. (2004) mostraron que el periodo crítico para la modulación de las entradas sinápticas a las motoneuronas (MNs), es controlada por la expresión de una subunidad particular del receptor NMDA (NR2D). Experimentos recientes han mostrado que la NT-3 producida en las sinapsis de las uniones neuromusculares modula la fortaleza de las conexiones entre las células musculares y las MNs (Chen et al., 2002; Arvanian et al., 2006). La ausencia de NT-3 en los axones que inervan a las células musculares ya sea por el corte de los nervios hacia el músculo o por bloqueo genético de la NT-3 causa una reducción en la fortaleza sináptica y la aplicación exógena restaura la pérdida en ambas situaciones (Munson et al., 1999; Chen et al., 2002). En animales seniles, estos efectos ocurren lentamente (1-2 días); sin embargo, durante la primera semana postnatal la aplicación de NT-3 en la médula espinal potencia las entradas de las células musculares provenientes de las MNs en minutos y este efecto permanece al menos varias horas después de que la NT-3 es removida (Arvanov et al., 2000). Esta potenciación rápida requiere de la activación de los receptores NMDA en las MNs, ya que el bloqueo de los receptores por medio de MK801 en las MNs bloquea la potenciación.

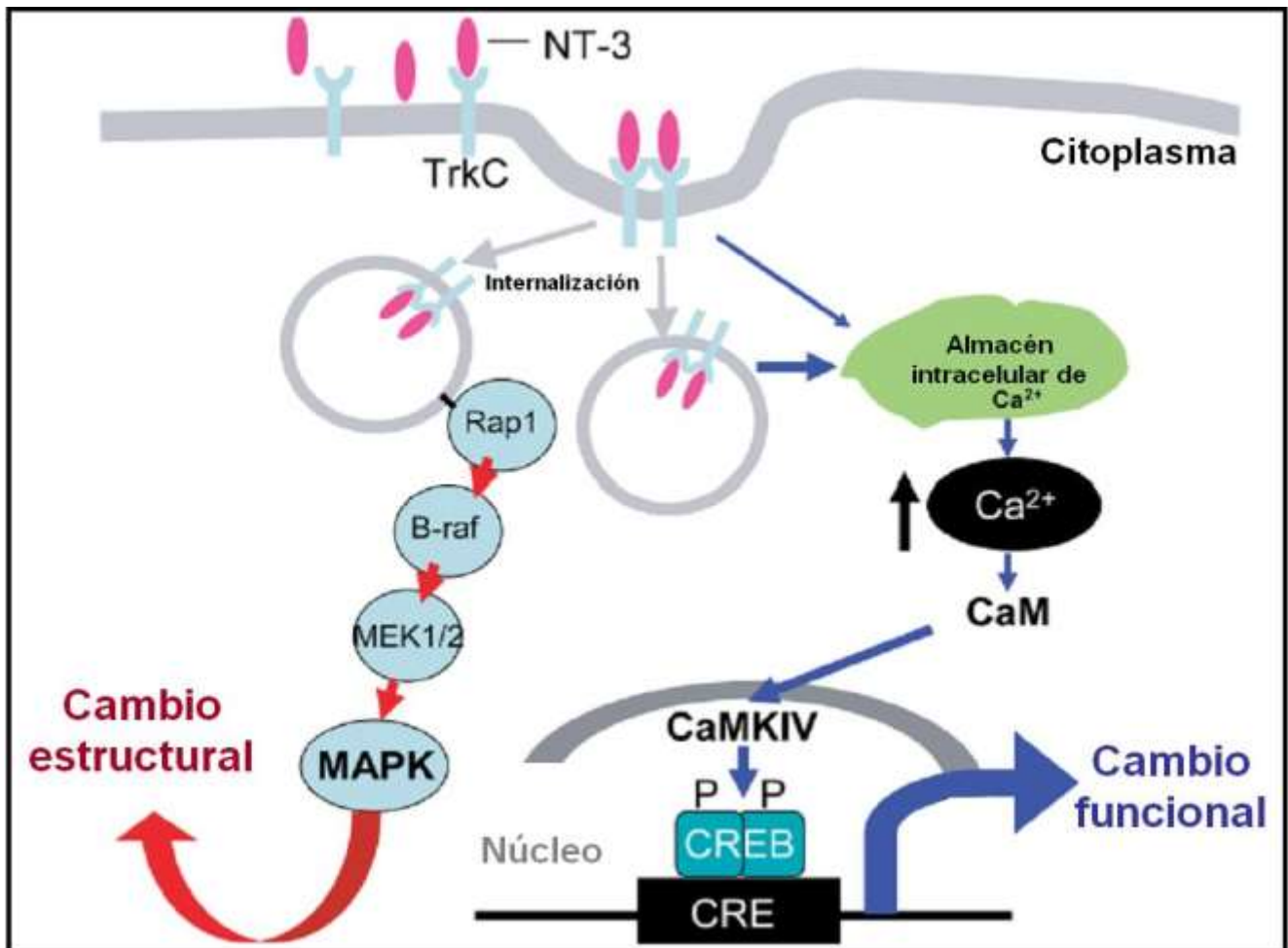


Figura. 4. Modelo propuesto para explicar los mecanismos celulares que subyacen a la modulación de la NT-3 en la estructura y funcionalidad sináptica (Modificado de Je et al., 2006).

En el sistema nervioso central

En el SNC se ha reportado que la actividad neuronal elevada como la inducción de LTP incrementa la expresión de ARNm de NT-3 y de su receptor TrkC en el GD hipocampal, lo que sugiere que esta neurotrofina juega un rol en la plasticidad sináptica en el SNC (Bramham et al., 1996). Un hallazgo de gran relevancia fue descrito por Kang y Schuman en 1995 (a y b) donde mostraron que en rebanadas hipocampales el baño de NT-3 inducía LTP en la vía CA3-CA1. Además encontraron que al infundir NT-3 y posteriormente inducir estimulación de alta frecuencia capaz de generar LTP, esta última no era bloqueada al menos una hora después del tratamiento con la neurotrofina, indicando que los mecanismos que subyacían al incremento de la eficiencia sináptica inducido por la NT-3 pudieran interactuar en las fases más tardías de la LTP, en el área CA1 se ha descrito que los mecanismos responsables de la LTP son dependientes de los receptores NMDA, los cuales como ya se ha descrito pueden ser modulados por las neurotrofinas. En la búsqueda del esclarecimiento de estos mecanismos, los mismos autores señalaron que para la NT-3 ó BDNF generen esta LTP en esta vía hipocampal se requiere de la activación de calcio intracelular, puesto que al bloquear receptores de las pozas de calcio intracelulares, la LTP

generada por neurotrofinas era bloqueada, planteando que el posible mecanismos de interacción entre las neurotrofinas y los receptores NMDA, puede converger en la señalización de calcio intracelular (Kang y Schuman 2000).

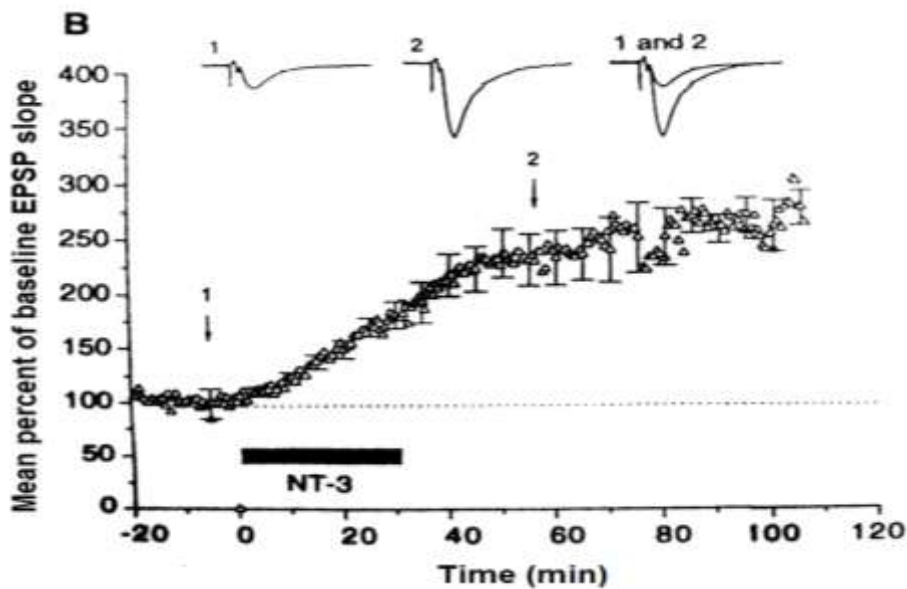


Figura 5. LTP inducida por NT-3. La gráfica muestra el cambio porcentual de la pendiente de los PPSE, inducido por la infusión aguda de NT-3 (barra negra) en la vía CA3-CA1. En la parte superior se observan los trazos representativos de los PPSE para la línea base (1) y para la LTP-NT-3 (2). (Kang y Schuman 1995a).

Como ya se describió, la expresión del gen que codifica para la NT-3 en el cerebro adulto se halla altamente confinado al giro dentado, en esta región Shimazu y colaboradores recientemente encontraron que al realizar una mutación para el gen que codifica para NT-3, la cual se activó hacia la etapa adulta, se generaban déficits para el aprendizaje de una tarea espacial (el laberinto acuático de Morris⁶), lo cual indica la participación de la neurotrofina endógena en la modulación del aprendizaje en la etapa adulta; asimismo encontraron que pese a que se podía inducir LTP en la vía del patrón perforante lateral al giro dentado hipocampal, había un daño en el mantenimiento de la LTP, es decir que esta proteína participa en el largo plazo del fenómeno de LTP. De manera importante resaltan la afectación en la neurogénesis en los ratones mutantes que posiblemente está relacionada con la regulación de la plasticidad sináptica de largo plazo, enfatizando que la NT-3 además de tener una función primordial en la neurogénesis en etapas tempranas del desarrollo, en el sistema adulto sigue modulando este proceso que se ha asociado a la renovación y fortalecimiento de las conexiones sinápticas. Considerando estos resultados, resulta importante señalar que es necesario seguir abordando el papel de la NT-3 sobre los procesos de almacenamiento de la información en el SN.

Una serie de investigaciones ha tratado de analizar la interacción entre las distintas neurotrofinas para lograr una comprensión de dichos procesos plásticos. Dentro de estas

⁶ Laberinto de agua de Morris: Es una tarea de aprendizaje espacial, en la que se introduce al animal dentro de recipiente lleno de agua opaca que tiene una plataforma de escape colocada en una posición constante. El animal puede aprender a relacionar claves espaciales externas con el lugar de la plataforma. Se cuantifica el tiempo en que el animal tarda en encontrar la plataforma de escape. Esta tarea involucra al hipocampo.

investigaciones, destaca la realizada por Patz y Wahle (2006), quienes describieron los cambios en la expresión del ARNm de distintas neurotrofinas en diferentes estadios del desarrollo en la corteza visual y analizaron también el cambio en los patrones de expresión de estas proteínas cuando se realizaban tratamientos con alguna neurotrofina en particular, encontrando que dependiendo de la neurotrofina infundida y de la etapa de desarrollo, la expresión de otras neurotrofinas se modificaba en comparación a los cultivos control, indicando que una característica interesante de las acciones de las neurotrofinas, es que pueden autorregular su producción o la de otras proteínas miembros de esta familia.

En este sentido, en relación a la participación de la NT-3 se ha reportado que el pre-tratamiento con NT-3 regula los efectos del BDNF sobre la transmisión sináptica tanto en las sinapsis excitadoras como inhibitoras de cultivos hipocámpales y se ha observado que el tratamiento con NT-3 puede modular los niveles de expresión del BDNF y el pro-BDNF en el hipocampo de rata adulta (Gottmann y Lessmann 2001; Ullal et al., 2007). Es relevante resaltar que la NT-3 disminuye los niveles basales de BDNF posiblemente para resguardar al sistema de una sobreactivación que pueda resultar dañina para las neuronas. Tras inducir epilepsia de forma experimental, se observan incrementos en los niveles de BDNF, lo que puede contribuir a mantener el fenómeno, es por ello que posiblemente para rescatar al sistema de una excitación constante que puede conducir a la muerte neuronal la NT-3 disminuya los niveles de BDNF para así reducir la epilepsia.

El pre-tratamiento con NT-3 disminuye la inducción de epilepsia experimental probablemente a través de la regulación de los receptores TrkC y TrkA, indicando un papel protector para esta neurotrofina. Se sabe también que puede modular la reorganización sináptica que se induce tras la epileptogénesis en las fibras musgosas y que por si sola también puede incrementar el número de contactos sinápticos de estas fibras, acentuando su rol neurotrópico en un área relacionada a los procesos de aprendizaje y memoria (Xu et al., 2002). El carácter regulador de NT-3 sobre la formación de nuevos contactos sinápticos en el SNC ha sido escasamente descrito (Schwyzer et al., 2002), aunque los estudios reportados en el SNP muestran la potencialidad de esta proteína para regular la morfología sináptica.

La participación de la neurotrofina-3 en la patología

En ratones haploinsuficientes del gen que codifica para NT-3 (NT-3^{+/-}) se ha reportado que manifiestan una actividad disminuida en la epilepsia experimental en la amígdala, muestran también defectos cardiovasculares, disminución en el número de mecanorreceptores y una pérdida considerable de neuronas en el SNP (Chao, 2003). Para la demencia de Alzheimer se ha encontrado que los niveles de NT-3 tienen una disminución en la corteza motora (Schindowski et al., 2008). En cultivos de neuronas corticales se ha visto que la NT-3 induce un efecto protector contra la toxicidad que induce la proteína Abeta, debido a que reduce la actividad de las caspasas 3, 8 y 9; el efecto neuroprotector se correlacionó con un incremento en la fosforilación de la proteína Akt, es decir que NT-3 regula estos efectos mediante la activación de la PI3-K (Lesne, 2005). Por otra parte se ha observado que la NT-3 previene la degeneración de neuronas colinérgicas en el locus coeruleus (Arenas y Persson, 1994).

Respecto a otras patologías se ha descrito una disminución en los niveles de NT-3 en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con trastorno depresivo (Hock et al., 2000). Asimismo en pacientes con hipocondría y esquizofrenia se ha visto disminución de esta proteína (Brondino et al., 2008; Vargas et al., 2008). Finalmente para ratones transgénicos que semejan el

síndrome de Down (el modelo Ts65Dn) se encuentra una alteración en los niveles de expresión de la NT-3.

El grupo de Gómez-Pinilla ha reportado que el ejercicio voluntario puede incrementar los niveles de neurotrofinas, para el caso de la NT-3 dicho incremento puede alcanzar hasta de un 250%, también ha descrito que el ejercicio posterior a una axotomía en la médula espinal puede restaurar la disminución en niveles de neurotrofinas (Gómez-Pinilla et al., 2001; Ying et al., 2003; Ying et al., 2005). Estos estudios apoyan la idea acerca de generación y empleo de tratamientos terapéuticos, los cuales puedan restaurar los niveles de las neurotrofinas que de forma importante modulan numerosos procesos fundamentales de las neuronas. No obstante, se debe explorar más a fondo, para tener una visión y comprensión más claras de los mecanismos de acción de las neurotrofinas tanto en un sistema normal como en la patología.

Conclusiones

El abordar los procesos mnémicos a partir del estudio de las bases celulares que los sustentan, nos brinda una concepción más clara de la génesis del comportamiento de los seres vivos. De manera que, la potencialidad de las neurotrofinas para fortalecer o modular la transmisión sináptica y las modificaciones estructurales derivadas de ésta, representa una valiosa herramienta para diseccionar los eventos celulares implicados en la adquisición y almacenaje de información.

Una de las acciones más relevantes de la NT-3, es su participación en la LTP (Kang y Schuman 1995; Bramham et al., 1996; Shimazu et al., 2006), un fenómeno que representa un importante escaparate para el estudio del repertorio de cambios plásticos que expresan las células del SN y por ello, es uno de los modelos experimentales más utilizados para estudiar fenómenos relacionados con el almacenamiento de información (Malenka y Bear, 2004). Los mecanismos por medio de los cuales la NT-3 ejerce estos efectos en la eficiencia de la comunicación sináptica no han sido del todo descritos, por tanto se requiere de subsecuentes investigaciones que promuevan la descripción puntual y acertada de estos mecanismos.

Debido a que las modificaciones de la estructura sináptica son consideradas como uno de los elementos fundamentales para el mantenimiento de la plasticidad sináptica (Lamprecht y LeDoux, 2004), la capacidad de la NT-3 para ocasionar cambios en la morfología de las sinapsis puede ser uno de los mecanismos clave de esta neurotrofina; por lo cual es de relevante importancia describir más fondo los efectos de esta proteína sobre la modificación de la estructura sináptica. A pesar de que la literatura reportada, a más de dos décadas después de haber descrito a la NT-3, aún no se ha establecido por completo los mecanismos que desencadena, ni se conoce del todo los procesos con los que se relaciona; sin embargo, las investigaciones en torno a sus funciones, reconocen a NT-3 como un mediador molecular importante para el desarrollo de los procesos plásticos, los cuales forman parte del funcionamiento del SN en diferentes etapas del desarrollo.

Referencias

- Aicardi, G., Argilli, E., Cappello, S., Santi, S., Riccio, M., Thoenen, H., & Canossa, M. (2004). Induction of long-term potentiation and depression is reflected by corresponding changes in secretion of endogenous brain-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 15788-15792.
- Arenas, E., & Persson, H. (1994). Neurotrophin-3 prevents the death of adult central noradrenergic neurons in vivo. *Nature*, 367, 368-371.

Arvanian, V. L., Bowers, W. J., Anderson, A., Horner, P. J., Federoff, H. J., & Mendell, L. M. (2006). Combined delivery of neurotrophin-3 and NMDA receptors 2D subunit strengthens synaptic transmission in contused and staggered double hemisectioned spinal cord of neonatal rat. *Exp Neurol*, *197*, 347-352.

Arvanian, V. L., Bowers, W. J., Petruska, J. C., Motin, V., Manuzon, H., Narrow, W. C., Federoff, H. J., & Mendell, L. M. (2004). Viral delivery of NR2D subunits reduces Mg²⁺ block of NMDA receptor and restores NT-3-induced potentiation of AMPA-kainate responses in maturing rat motoneurons. *J Neurophysiol*, *92*, 2394-2404.

Arvanov, V. L., Seebach, B. S., & Mendell, L. M. (2000). NT-3 evokes an LTP-like facilitation of AMPA/kainate receptor-mediated synaptic transmission in the neonatal rat spinal cord. *J Neurophysiol*, *84*, 752-758.

Binder, D. K. (2007). Neurotrophins in the dentate gyrus. *Prog Brain Res*, *163*, 371-397.

Bloch, A., & Thoenen, H. (1996). Localization of cellular storage compartments and sites of constitutive and activity-dependent release of nerve growth factor (NGF) in primary cultures of hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci*, *7*, 173-190.

Bramham, C. R., Southard, T., Sarvey, J. M., Herkenham, M., & Brady, L. S. (1996). Unilateral LTP triggers bilateral increases in hippocampal neurotrophin and trk receptor mRNA expression in behaving rats: evidence for interhemispheric communication. *J Comp Neurol*, *368*, 371-382.

Brondino, N., Lanati, N., Barale, F., Martinelli, V., Politi, P., Geroldi, D., & Emanuele, E. (2008). Decreased NT-3 plasma levels and platelet serotonin content in patients with hypochondriasis. *J Psychosom Res*, *65*, 435-439.

Butte, M. J., Hwang, P. K., Mobley, W. C., & Fletterick, R. J. (1998). Crystal structure of neurotrophin-3 homodimer shows distinct regions are used to bind its receptors. *Biochemistry*, *37*, 16846-16852.

Caminos, E., Becker, E., Martin-Zanca, D., & Vecino, E. (1999). Neurotrophins and their receptors in the tench retina during optic nerve regeneration. *J Comp Neurol*, *404*, 321-331.

Clary, D. O., & Reichardt, L. F. (1994). An alternatively spliced form of the nerve growth factor receptor TrkA confers an enhanced response to neurotrophin 3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *91*, 11133-11137.

Collin, C., Vicario-Abejon, C., Rubio, M. E., Wenthold, R. J., McKay, R. D., & Segal, M. (2001). Neurotrophins act at presynaptic terminals to activate synapses among cultured hippocampal neurons. *Eur J Neurosci*, *13*, 1273-1282.

Chao, M. V. (2003). Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci*, *4*, 299-309.

Chao, M. V., & Bothwell, M. (2002). Neurotrophins: to cleave or not to cleave. *Neuron*, *33*, 9-12.

Chao, M. V., & Lee, F. S. (2004). Neurotrophin survival signaling mechanisms. *J Alzheimers Dis*, *6*, S7-11.

Chen, H. H., Tourtellotte, W. G., & Frank, E. (2002). Muscle spindle-derived neurotrophin 3 regulates synaptic connectivity between muscle sensory and motor neurons. *J Neurosci*, *22*, 3512-3519.

Dechant, G., Rodriguez-Tebar, A., & Barde, Y. A. (1994). Neurotrophin receptors. *Prog Neurobiol*, *42*, 347-352.

Duprey-Diaz, M. V., Blagburn, J. M., & Blanco, R. E. (2003). Neurotrophin-3 and TrkC in the frog visual system: changes after axotomy. *Brain Res*, *982*, 54-63.

Ernfors, P., Wetmore, C., Olson, L., & Persson, H. (1990). Identification of cells in rat brain and peripheral tissues expressing mRNA for members of the nerve growth factor family. *Neuron*, *5*, 511-526.

Ernfors, P., Merlio, J. P., & Persson, H. (1992). Cells Expressing mRNA for Neurotrophins and their Receptors During Embryonic Rat Development. *Eur J Neurosci*, *4*, 1140-1158.

Esteban, P. F., Caprari, P., Yoon, H. Y., Randazzo, P. A., & Tessarollo, L. (2008). In vitro and in vivo analysis of neurotrophin-3 activation of Arf6 and Rac-1. *Methods Enzymol*, *438*, 171-183.

Farhadi, H. F., Mowla, S. J., Petrecca, K., Morris, S. J., Seidah, N. G., & Murphy, R. A. (2000). Neurotrophin-3 sorts to the constitutive secretory pathway of hippocampal neurons and is diverted to the regulated secretory pathway by coexpression with brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci*, *20*, 4059-4068.

Frade, J. M., & Barde, Y. A. (1998). Nerve growth factor: two receptors, multiple functions. *Bioessays*, *20*, 137-145.

Garcia, M., Forster, V., Hicks, D., & Vecino, E. (2003). In vivo expression of neurotrophins and neurotrophin receptors is conserved in adult porcine retina in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, *44*, 4532-4541.

Gomez-Pinilla, F., Ying, Z., Opazo, P., Roy, R. R., & Edgerton, V. R. (2001). Differential regulation by exercise of BDNF and NT-3 in rat spinal cord and skeletal muscle. *Eur J Neurosci*, *13*, 1078-1084.

Götz, R., Köster, R., Winkler, C., Raulf, F., Lottspeich, F., Scharlt, M., Thoenen, M. (2002). Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family. *Nature*, *372*, 266-269.

Hallbook, F., Backstrom, A., Kullander, K., Ebendal, T., & Carri, N. G. (1996). Expression of neurotrophins and trk receptors in the avian retina. *J Comp Neurol*, *364*, 664-676.

Hallbook, F., Ibanez, C. F., Ebendal, T., & Persson, H. (1993). Cellular localization of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNA expression in the early chicken embryo. *Eur J Neurosci*, *5*, 1-14.

Hartmann, M., Heumann, R., & Lessmann, V. (2001). Synaptic secretion of BDNF after high-frequency stimulation of glutamatergic synapses. *Embo J*, *20*, 5887-5897.

Hotak, C., Heese, K., Muller-Spahn, F., Huber, P., Riesen, W., Nitsch, R. M., & Otten, U. (2000). Increased cerebrospinal fluid levels of neurotrophin 3 (NT-3) in elderly patients with major depression. *Mol Psychiatry*, *5*, 510-513.

Hohn, A., Leibrock, J., Bailey, K., & Barde, Y. A. (1990). Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. *Nature*, *344*, 339-341.

Hu, X., Jin, L., & Feng, L. (2004). Erk1/2 but not PI3K pathway is required for neurotrophin 3-induced oligodendrocyte differentiation of post-natal neural stem cells. *J Neurochem*, *90*, 1339-1347.

- Huang, E.J., & Reichardt, L.F. (2001). Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annual Rev Neurosci* 24, 677-736.
- Je, H. S., Yang, F., Zhou, J., & Lu, B. (2006). Neurotrophin 3 induces structural and functional modification of synapses through distinct molecular mechanisms. *J Cell Biol*, 175, 1029-1042.
- Je, H. S., Zhou, J., Yang, F., & Lu, B. (2005). Distinct mechanisms for neurotrophin-3-induced acute and long-term synaptic potentiation. *J Neurosci*, 25, 11719-11729.
- Jin, L., Hu, X., & Feng, L. (2005). NT3 inhibits FGF2-induced neural progenitor cell proliferation via the PI3K/GSK3 pathway. *J Neurochem*, 93, 1251-1261.
- Kaisho, Y., Yoshimura, K., & Nakahama, K. (1990). Cloning and expression of a cDNA encoding a novel human neurotrophic factor. *FEBS Lett*, 266, 187-191.
- Kang, H., & Schuman, E. M. (1995a). Long-lasting neurotrophin-induced enhancement of synaptic transmission in the adult hippocampus. *Science*, 267, 1658-1662.
- Kang, H. J., & Schuman, E. M. (1995b). Neurotrophin-induced modulation of synaptic transmission in the adult hippocampus. *J Physiol Paris*, 89, 11-22.
- Kang, H., & Schuman, E. M. (2000). Intracellular Ca(2+) signaling is required for neurotrophin-induced potentiation in the adult rat hippocampus. *Neurosci Lett*, 282, 141-144.
- Kim, B. G., Dai, H. N., McAtee, M., & Bregman, B. S. (2008). Modulation of dendritic spine remodeling in the motor cortex following spinal cord injury: effects of environmental enrichment and combinatorial treatment with transplants and neurotrophin-3. *J Comp Neurol*, 508, 473-486.
- Klein, R. Martin-Zanca, D. Barbacid, M. Parada, L.F. (1990) Expression of tyrosine kinase receptor gene *trkB* is confined to the murine embryonic and adult nervous system. *Development*, 109, 845-850.
- Kohara, K., Kitamura, A., Morishima, M., & Tsumoto, T. (2001). Activity-dependent transfer of brain-derived neurotrophic factor to postsynaptic neurons. *Science*, 291, 2419-2423.
- Kolarow, R. Brigadski, T. Lessmann, V. (2007). Postsynaptic secretion of BDNF and NT-3 from hippocampal neurons depends on calcium calmodulin kinase II signaling and proceeds via delayed fusion pore opening. *J Neurosci*, 27, 10350-10364.
- Lamballe, F., Klein, R., & Barbacid, M. (1991). *trkC*, a new member of the *trk* family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. *Cell*, 66, 967-979.
- Lamballe, F., Smeyne, R. J., & Barbacid, M. (1994). Developmental expression of *trkC*, the neurotrophin-3 receptor, in the mammalian nervous system. *J Neurosci*, 14, 14-28.
- Lamprecht, R. LeDoux, J. (2004). Structural plasticity and memory. *Nature Rev Neurosci*, 5, 45-53.
- Lein, E. S., Hohn, A., & Shatz, C. J. (2000). Dynamic regulation of BDNF and NT-3 expression during visual system development. *J Comp Neurol*, 420, 1-18.
- Lendahl, U., & McKay, R. D. (1990). The use of cell lines in neurobiology. *Trends Neurosci*, 13, 132-137.
- Lesne, S., Gabriel, C., Nelson, D. A., White, E., Mackenzie, E. T., Vivien, D., & Buisson, A. (2005). Akt-dependent expression of NAIP-1 protects neurons against amyloid- β toxicity. *J Biol Chem*, 280, 24941-24947.
- Lessmann, V., Gottmann, K., & Malsangio, M. (2003). Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Prog Neurobiol*, 69, 341-374.
- Li, Z., Hu, Y., Zhu, Q., & Zhu, J. (2008). Neurotrophin-3 reduces apoptosis induced by 6-OHDA in PC12 cells through Akt signaling pathway. *Int J Dev Neurosci*, 26, 635-640.
- Lohof, A. M., Ip, N. Y., & Poo, M. M. (1993). Potentiation of developing neuromuscular synapses by the neurotrophins NT-3 and BDNF. *Nature*, 363, 350-353.
- Longhlin, SE. Fallon, JH. (1993). Neurotrophic Factors; Academic Press Inc.
- Lu, B. (2003). Pro-region of neurotrophins: role in synaptic modulation. *Neuron*, 39, 735-738.
- Lu, B. (2004). Acute and long-term synaptic modulation by neurotrophins. *Prog Brain Res*, 146, 137-150.
- Lu, B., Pang, P. T., & Woo, N. H. (2005). The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci*, 6, 603-614.
- Maisonpierre, P. C., Belluscio, L., Squinto, S., Ip, N. Y., Furth, M. E., Lindsay, R. M., & Yancopoulos, G. D. (1990a). Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF. *Science*, 247, 1446-1451.
- Maisonpierre, P. C., Belluscio, L., Friedman, B., Alderson, R. F., Wiegand, S. J., Furth, M. E., Lindsay, R. M., & Yancopoulos, G. D. (1990b). NT-3, BDNF, and NGF in the developing rat nervous system: parallel as well as reciprocal patterns of expression. *Neuron*, 5, 501-509.
- Maisonpierre, P. C., Le Beau, M. M., Espinosa, R., 3rd, Ip, N. Y., Belluscio, L., de la Monte, S. M., Squinto, S., Furth, M. E., & Yancopoulos, G. D. (1991). Human and rat brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3: gene structures, distributions, and chromosomal localizations. *Genomics*, 10, 558-568.
- Malenka, R.C., & Bear, M.F., (2004) LTP and LTD: an embarrassment of riches, *Neuron* 44: 5-21.
- Martinez, A., Alcantara, S., Borrell, V., Del Rio, J. A., Blasi, J., Ojal, R., Campos, N., Boronat, A., Barbacid, M., Silos-Santiago, I., & Soriano, E. (1998). *TrkB* and *TrkC* signaling are required for maturation and synaptogenesis of hippocampal connections. *J Neurosci*, 18, 7336-7350.
- Munson, J. B., Johnson, R. D., & Mendell, L. M. (1999). Neurotrophin-3 and maintenance of muscle afferent function. *Prog Brain Res*, 123, 157-163.
- Nilsson, AS. Fainzilber, M. Falk, P. Ibáñez, CF. (1998) Neurotrophin-7 a novel member of the neurotrophin family from the zebrafish. *Fed European Biochem Soc*, 13,285-290.

Oppenheim, R.W. (1989). The neurotrophic theory and naturally occurring motoneuron death. *Trends Neurosci*, 12, 252-255.

Otal, R., Martinez, A., & Soriano, E. (2005). Lack of TrkB and TrkC signaling alters the synaptogenesis and maturation of mossy fiber terminals in the hippocampus. *Cell Tissue Res*, 319, 349-358.

Patapoutian, A., & Reichardt, L. F. (2001). Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr Opin Neurobiol*, 11, 272-280.

Patz, S., & Wahle, P. (2006). Developmental changes of neurotrophin mRNA expression in the layers of rat visual cortex. *Eur J Neurosci*, 24, 2453-2460.

Paul, J., Gottmann, K., & Lessmann, V. (2001). NT-3 regulates BDNF-induced modulation of synaptic transmission in cultured hippocampal neurons. *Neuroreport*, 12, 2635-2639.

Pollonini, G., Gao, V., Rabe, A., Palmieriello, S., Albertini, G., & Alberini, C. M. (2008). Abnormal expression of synaptic proteins and neurotrophin-3 in the Down syndrome mouse model Ts65Dn. *Neuroscience*, 156, 99-106.

Reichardt, L. F. (2006). Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 361, 1545-1564.

Rosenthal, A., Goeddel, D. V., Nguyen, T., Lewis, M., Shih, A., Laramée, G. R., Nikolics, K., & Winslow, J. W. (1990). Primary structure and biological activity of a novel human neurotrophic factor. *Neuron*, 4, 767-773.

Sahun, I., Delgado-Garcia, J. M., Amador-Arjona, A., Giral, A., Alberch, J., Dierssen, M., & Gruart, A. (2007). Dissociation between CA3-CA1 synaptic plasticity and associative learning in TgNTRK3 transgenic mice. *J Neurosci*, 27, 2253-2260.

Schindowski, K., Belarbi, K., & Buee, L. (2008). Neurotrophic factors in Alzheimer's disease: role of axonal transport. *Genes Brain Behav*, 7 Suppl 1, 43-56.

Schwyzler, L., Mateos, J. M., Abegg, M., Rietschin, L., Heeb, L., Thompson, S. M., Luthi, A., Gahwiler, B. H., & McKinney, R. A. (2002). Physiological and morphological plasticity induced by chronic treatment with NT-3 or NT-4/5 in hippocampal slice cultures. *Eur J Neurosci*, 16, 1939-1948.

Shetty, A. K., Rao, M. S., Hattiangady, B., Zaman, V., & Shetty, G. A. (2004). Hippocampal neurotrophin levels after injury: Relationship to the age of the hippocampus at the time of injury. *J Neurosci Res*, 78, 520-532.

Shimazu, K., Zhao, M., Sakata, K., Akbarian, S., Bates, B., Jaenisch, R., & Lu, B. (2006). NT-3 facilitates hippocampal plasticity and learning and memory by regulating neurogenesis. *Learn Mem*, 13, 307-315.

Strohmaier, C., Carter, B.D., Urfer, R., Barde, Y.A., Dechant, G. (1996). A splice variant of the neurotrophin receptor trkB with increased specificity for brain-derived neurotrophic factor. *EMBO J*, 15, 3332-33327.

Thoenen, H. (1995). Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science*, 270, 593-598.

Ullal, G. R., Michalski, B., Xu, B., Racine, R. J., & Fahnstock, M. (2007). NT-3 modulates BDNF and proBDNF levels in naive and kindled rat hippocampus. *Neurochem Int*, 50, 866-871.

Vargas, H. E., Gama, C. S., Andreatza, A. C., Medeiros, D., Stertz, L., Fries, G., Palha, J., Cereser, K. M., Berk, M., Kapczinski, F., & Belmonte-de-Abreu, P. S. (2008). Decreased serum neurotrophin 3 in chronically medicated schizophrenic males. *Neurosci Lett*, 440, 197-201.

Wang, T., Xie, K., & Lu, B. (1995). Neurotrophins promote maturation of developing neuromuscular synapses. *J Neurosci*, 15, 4796-4805.

Xu, B., Michalski, B., Racine, R. J., & Fahnstock, M. (2002). Continuous infusion of neurotrophin-3 triggers sprouting, decreases the levels of TrkA and TrkC, and inhibits epileptogenesis and activity-dependent axonal growth in adult rats. *Neuroscience*, 115, 1295-1308.

Yang, F., He, X., Feng, L., Mizuno, K., Liu, X. W., Russell, J., Xiong, W. C., & Lu, B. (2001). PI-3 kinase and IP3 are both necessary and sufficient to mediate NT3-induced synaptic potentiation. *Nat Neurosci*, 4, 19-28.

Ying, Z., Roy, R. R., Edgerton, V. R., & Gomez-Pinilla, F. (2003). Voluntary exercise increases neurotrophin-3 and its receptor TrkC in the spinal cord. *Brain Res*, 987, 93-99.

Ying, Z., Roy, R. R., Edgerton, V. R., & Gomez-Pinilla, F. (2005). Exercise restores levels of neurotrophins and synaptic plasticity following spinal cord injury. *Exp Neurol*, 193, 411-419.

Zhang, H. T., Li, L. Y., Zou, X. L., Song, X. B., Hu, Y. L., Feng, Z. T., & Wang, T. T. (2007). Immunohistochemical distribution of NGF, BDNF, NT-3, and NT-4 in adult rhesus monkey brains. *J Histochem Cytochem*, 55, 1-19.