



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**INTERRELACIÓN ENTRE DIFERENTES MECANISMOS  
DE PLASTICIDAD EN SINAPSIS IDENTIFICADAS**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGA**

**P R E S E N T A:**

**MICHELLE ALEJANDRA SÁNCHEZ RIVERA**



**DIRECTOR DE TESIS:  
DRA CITLALI TRUETA SEGOVIA  
2016**

**Ciudad Universitaria, CDMX**



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.

1. Datos del alumno

Sánchez

Rivera

Michelle Alejandra

54241679

Universidad Nacional Autónoma de

México

Facultad de Ciencias

Biología

410023161

2. Datos del tutor

Dra

Citlali

Trueta

Segovia

3. Datos del sinodal 1

Dr

Arturo

Hernández

Cruz

4. Datos del sinodal 2

M en C

Julio Alejandro

Prieto

Sagredo

5. Datos del sinodal 3

Dr

José de Jesús

García

Colunga

6. Datos del sinodal 4

Dr

Francisco Salvador

Mercado

Aca

7. Datos del trabajo escrito

Interrelación entre diferentes mecanismos de plasticidad en sinapsis identificadas

59 p

2016

# **TABLA DE CONTENIDO**

<b>INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES .....</b>	<b>4</b>
SINAPSIS .....	4
LA SINAPSIS QUÍMICA .....	4
EL CICLO DE LAS VESÍCULAS SINÁPTICAS .....	7
TEORÍA CUÁNTICA DE LIBERACIÓN DE NEUROTRANSMISOR .....	9
LOS POTENCIALES SINÁPTICOS .....	9
PLASTICIDAD SINÁPTICA A CORTO PLAZO .....	11
<i>Facilitación Sináptica</i> .....	12
<i>Depresión Sináptica</i> .....	13
<i>Modelo Teórico de Plasticidad Sináptica a Corto Plazo</i> .....	13
SISTEMA NERVIOSO DE LA SANGUIJUELA .....	15
<i>Sinapsis P-AP</i> .....	16
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....</b>	<b>19</b>
<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>20</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>21</b>
OBJETIVO GENERAL .....	21
OBJETIVOS PARTICULARES .....	21
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>21</b>
PREPARACIÓN .....	21
REGISTRO INTRACELULAR .....	22
ELEVACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE $Ca^{2+}$ EXTRACELULAR .....	24
MEDICIÓN DE LOS FENÓMENOS DE PLASTICIDAD SINÁPTICA .....	24
ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	25
SIMULACIONES COMPUTACIONALES .....	25
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>26</b>
LA SINAPSIS P-AP EXHIBE PLASTICIDAD SINÁPTICA A CORTO PLAZO .....	26
EL TIPO DE PLASTICIDAD QUE SE PRODUCE EN RESPUESTA A IMPULSOS PAREADOS DEPENDE DEL INTERVALO ENTRE LOS IMPULSOS PRESINÁPTICOS .....	26
LA MAGNITUD DE LA DEPRESIÓN ANTE IMPULSOS PAREADOS DEPENDE DE LA CANTIDAD DE NEUROTRANSMISOR LIBERADO INICIALMENTE .....	30
LA DEPRESIÓN ANTE IMPULSOS PAREADOS ES CAUSADA TAMBIÉN POR UN MECANISMO QUE DEPENDE DEL TIEMPO TRANSCURRIDO DESDE EL ESTÍMULO ANTERIOR .....	34
AUMENTAR LA PROBABILIDAD DE LIBERACIÓN ALTERA LA MAGNITUD DE ALGUNOS FENÓMENOS DE PLASTICIDAD SINÁPTICA .....	38
EL MODELO TEÓRICO DE PLASTICIDAD A CORTO PLAZO NO PREDICE LA DEPRESIÓN ANTE IMPULSOS PAREADOS OBSERVADA EXPERIMENTALMENTE .....	41
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>47</b>
<b>CONCLUSIÓN .....</b>	<b>54</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>55</b>

# **INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES**

## **Sinapsis**

Mucha de la comunicación entre neuronas se lleva a cabo en las sinapsis, que son sitios altamente especializados de contacto funcional entre dos neuronas (Purves et al., 2012) o entre una neurona y alguna otra célula excitable como por ejemplo, musculares o secretoras (Hennig, 2013). Según su mecanismo de transmisión, se distinguen dos tipos de sinapsis: eléctricas y químicas.

En las sinapsis eléctricas la corriente fluye a través de uniones comunicantes que permiten la continuidad entre el citoplasma de ambas células. En las sinapsis químicas, que es el tipo de sinapsis que se estudiará en este trabajo, participa un intermediario químico llamado neurotransmisor, el cual es liberado por la neurona presináptica cuando se genera un potencial de acción. Posteriormente el neurotransmisor es captado por receptores en la neurona postsináptica, en donde se genera una respuesta que se observa como un cambio en la excitabilidad de la membrana.

## **La Sinapsis Química**

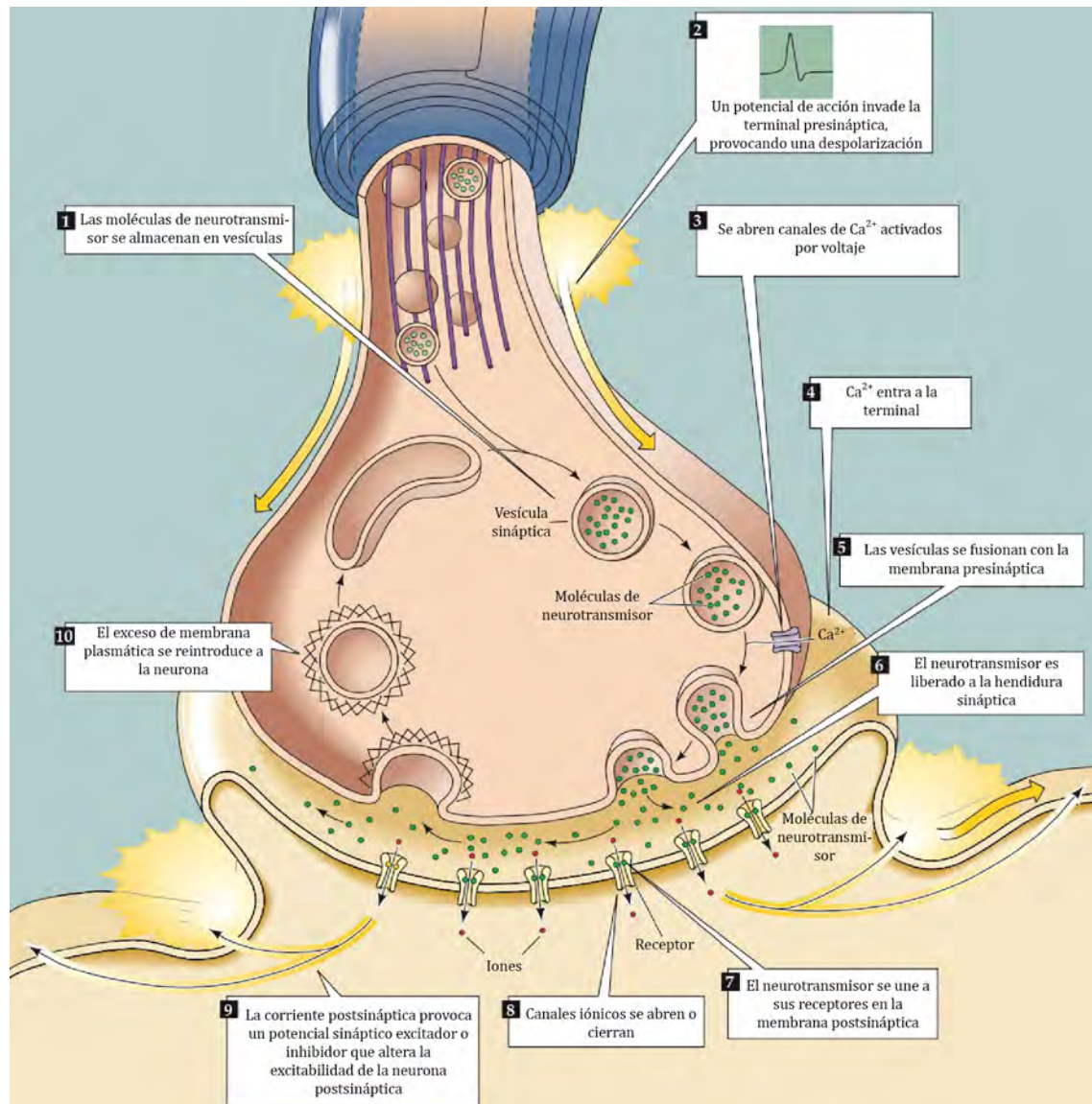
La mayor parte de la comunicación interneuronal ocurre por medio de sinapsis químicas (Zucker et al., 2004). La característica fundamental de las sinapsis químicas es la participación de algún neurotransmisor. Las moléculas de neurotransmisor se

encuentran almacenadas en vesículas ancladas en sitios especializados llamados zonas activas en el interior de la terminal presináptica. En estos sitios se encuentran también todas las proteínas que participan en el proceso de liberación (Hennig, 2013). En la Figura 1 se muestran de manera esquemática los principales acontecimientos que conforman la transmisión sináptica.

La liberación de neurotransmisor por parte de la neurona presináptica es iniciada por la llegada de un potencial de acción a la terminal. La despolarización provoca la apertura de canales de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) activados por voltaje que se encuentran estrechamente co-localizados con las zonas activas. Consecuentemente, ocurre una elevación local, transitoria y pronunciada en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular que permite la fusión de las vesículas sinápticas con la membrana plasmática.

Una vez que el contenido de las vesículas es liberado, las moléculas de neurotransmisor difunden a través de la hendidura sináptica y se unen a receptores específicos en la membrana de la neurona postsináptica. Los receptores pueden ser ionotrópicos, lo que quiere decir que son por sí mismos canales iónicos, o metabotrópicos, lo que indica que están acoplados a los canales por medio de proteínas G (Waxham, 2004). De cualquier forma, la unión a su ligando tiene como consecuencia la apertura o cierre de canales iónicos y por lo tanto, un cambio en el flujo de iones a través de la membrana plasmática. El cambio en el potencial de membrana que se genera a partir del movimiento de iones se llama potencial sináptico y puede ser una despolarización o una hiperpolarización, dependiendo de la carga de los iones en movimiento y la dirección en la que se mueven. De esta manera,

los potenciales sinápticos individuales alteran la excitabilidad de la membrana postsináptica y por lo tanto, la probabilidad de que se genere un potencial de acción.



**Figura 1.**

Eventos que conforman la transmisión sináptica de tipo químico. Modificada de Purves, 2012.

## **El Ciclo de las Vesículas Sinápticas**

Usualmente, sólo una pequeña fracción de las vesículas de la zona activa se encuentran cerca de la membrana plasmática y están preparadas para la fusión (Murthy & DeCamilli, 2003); se dice que éstas conforman la poza liberable. Las vesículas restantes conforman la poza de reserva y reemplazan a aquellas que se fusionan durante el proceso de liberación de neurotransmisor (Birks & McIntosh, 1961), reabasteciendo a la poza liberable en un proceso con una constante de tiempo del orden de segundos (entre 1 y 8 dependiendo de la preparación; Betz, 1970; Südhof, 2004; Rizzoli & Betz, 2005).

Los precursores de las vesículas sinápticas se producen en el retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi, que se encuentran en el soma neuronal (Van Breemen et al., 1958). Debido a la gran distancia entre el soma y la terminal presináptica, el transporte de nuevas vesículas no permitiría reabastecer ninguna poza vesicular lo suficientemente rápido durante períodos prolongados de actividad. Sin embargo, en la terminal existe un mecanismo local de formación de vesículas sinápticas a partir de la membrana de aquellas que ya vaciaron su contenido (Heuser & Reese, 1973).

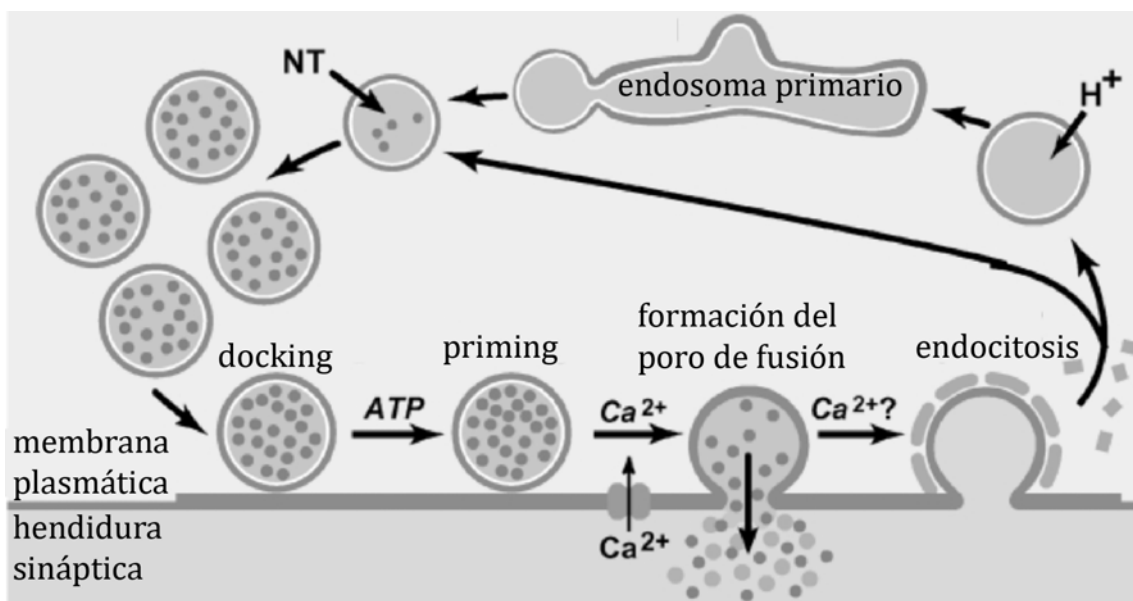
Al fusionarse, las vesículas sinápticas aumentan la superficie de la membrana plasmática. Posteriormente, el exceso de membrana es reintroducido a la célula en donde eventualmente se utiliza para formar nuevas vesículas sinápticas que se llenan con neurotransmisor y se almacenan en la poza de reserva. Generalmente, la reintroducción de la membrana al interior de la neurona ocurre por medio de un



proceso de endocitosis mediado por clatrina, aunque también puede ocurrir reciclaje de manera local (Südhof, 2004), aunque este último mecanismo se encuentra aún muy poco estudiado.

Una vez que las vesículas, ya con neurotransmisor dentro de ellas, se encuentran en la poza de reserva deben ocurrir algunas modificaciones antes de poder pasar a la poza liberable. En primer lugar deben ser movilizadas y ancladas a la zona activa, proceso llamado “docking”, que implica su asociación al citoesqueleto y otras vesículas; y posteriormente deben ser preparadas durante un proceso llamado “priming” que les confiere la habilidad de formar el poro de fusión con la membrana plasmática en respuesta a la elevación en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Durante todo este ciclo, que se encuentra representado esquemáticamente en la Figura 2, participan cientos de proteínas, muchas de las cuales tienen funciones aún desconocidas o mecanismos de acción no completamente comprendidos (Südhof, 2004).



**Figura 2.**

El ciclo de las vesículas sinápticas. Modificada de Südhof, 2004.

## **Teoría Cuántica de Liberación de Neurotransmisor**

En una terminal sináptica, las vesículas contienen una cantidad fija de moléculas de neurotransmisor, por lo que se dice que cada vesícula contiene un “cuanto”. La liberación del contenido de una sola vesícula es la señal más pequeña que puede ser transmitida a la neurona postsináptica. Esto puede ocurrir de manera espontánea, aún cuando no se ha producido un potencial de acción, y generar un potencial sináptico miniatura (Fatt y Katz, 1952). Los potenciales sinápticos que son producto de algún estímulo son resultado de la suma de los potenciales miniatura que producen múltiples cuantos que son liberados a la vez (Del Castillo & Katz, 1954).

Si en una terminal sináptica, hay una población de  $n$  vesículas capaces de liberar su contenido en respuesta a un impulso, y  $p$  es la probabilidad promedio de que esto ocurra, entonces el número de cuantos que se libera en respuesta a un impulso está dado por  $m = np$  (Del Castillo & Katz, 1954).

## **Los Potenciales Sinápticos**

Un potencial sináptico es un cambio en el potencial de membrana de la neurona postsináptica en respuesta a la unión de un neurotransmisor con los receptores postsinápticos. Este cambio puede ser despolarizante o hiperpolarizante dependiendo del tipo de iones que fluyen a través de los canales transmembranales que se abren en respuesta a la unión del neurotransmisor con su receptor. En específico, depende de la relación entre el potencial de reposo de la membrana postsináptica y el potencial de equilibrio de los iones en movimiento (Hodgkin &

Huxley, 1951): si el potencial de equilibrio iónico es más positivo que el potencial de reposo, la corriente iónica (ya sea entrante o saliente) provocará una despolarización, y si el potencial de equilibrio iónico es más negativo que el potencial de reposo, se producirá una hiperpolarización.

Si un potencial sináptico es despolarizante, se denomina potencial sináptico excitador, ya que acerca el potencial de membrana al umbral de disparo, aumentando la excitabilidad de la neurona. Por el contrario, si el potencial sináptico es hiperpolarizante, tiene un efecto contrario y se llama potencial sináptico inhibitorio. La magnitud de la respuesta postsináptica está determinada por la cantidad liberada de neurotransmisor, así como por el número de canales en la membrana postsináptica y el estado en el que éstos se encuentran (Waxham, 2004).

Cuando un potencial sináptico, ya sea excitador o inhibitorio, se produce antes de que otro potencial sináptico, producido en el mismo sitio, se haya terminado, se suman temporalmente, resultando en un potencial sináptico cuya amplitud es una combinación del efecto de los potenciales sinápticos individuales. Además, si se producen potenciales sinápticos simultáneos en diferentes sitios de la misma neurona, al propagarse y coincidir en el axón primario de la neurona se suman espacialmente, dando también como resultado un PS cuya amplitud es la suma de los PS individuales. El cambio total en el potencial de membrana, resultante de la suma espacial y temporal de todos los PS producidos en un momento dado determinan si se genera o no un potencial de acción en la neurona postsináptica y por lo tanto, si la información proveniente de las neuronas presinápticas se propagará.

## **Plasticidad Sináptica a Corto Plazo**

No todos los potenciales de acción generan respuestas postsinápticas de la misma amplitud. Existe una variedad de mecanismos que regulan de manera dinámica la fuerza de la sinapsis dependiendo de la actividad reciente, fenómeno que se conoce como plasticidad sináptica (Dittman et al., 2000). Muchos de estos mecanismos pueden actuar al mismo tiempo y la combinación de sus efectos produce patrones de actividad postsináptica muy variados. El resultado depende de la cantidad de impulsos que llegan a la terminal presináptica y el espaciamiento temporal entre ellos, así como de las características de cada sinapsis (Zucker & Regehr, 2002). En algunas sinapsis predominan los mecanismos que fortalecen la sinapsis mientras que en otras predominan los que las debilitan. Además los distintos mecanismos tienen cursos temporales también muy diferentes: algunos duran sólo unos cuantos milisegundos, mientras que otros se pueden mantener durante varios minutos. La diversidad de respuestas que puede producir la actividad presináptica tiene implicaciones importantes en la capacidad de cómputo de las neuronas y la complejidad de la información que se puede transmitir en el sistema nervioso (Abbott & Regehr, 2004).

Algunos mecanismos de plasticidad actúan en la neurona presináptica, mientras que otros ejercen su efecto sobre la neurona postsináptica. Es decir, los cambios en la amplitud de los potenciales sinápticos pueden ser resultado de cambios en la cantidad de neurotransmisor que libera la neurona presináptica o de cambios en la respuesta de la neurona postsináptica a una cierta cantidad de neurotransmisor. En este trabajo, nos enfocaremos en dos mecanismos que actúan en la terminal presináptica y cuyo efecto se puede observar durante cientos de milisegundos.

## Facilitación Sináptica

El tipo de plasticidad que se observa cuando la amplitud de un potencial sináptico aumenta con respecto al anterior, se denomina facilitación sináptica. El mecanismo que produce este tipo de plasticidad está asociado con la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la terminal presináptica durante la despolarización de su membrana, proceso indispensable para que ocurra la movilización y fusión de las vesículas que contienen el neurotransmisor. El exceso de  $\text{Ca}^{2+}$  no es removido inmediatamente, por lo que si se produce un segundo impulso antes de que se haya completado la recaptura del ion, el  $\text{Ca}^{2+}$  que entra a la terminal se suma a la fracción de  $\text{Ca}^{2+}$  que aún se encuentra en la terminal (Katz & Miledi, 1968).

Debido a que una mayor concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  favorece la fusión vesicular, en términos de la teoría cuántica mencionada anteriormente este mecanismo actúa sobre la probabilidad de liberación  $p$ , aumentándola con cada impulso. A esta explicación para el fenómeno de facilitación sináptica se le conoce como la Hipótesis del Calcio Residual (Katz y Miledi, 1968). Como la fusión de una vesícula sináptica requiere de la acción cooperativa de más de un ion  $\text{Ca}^{2+}$ , la relación entre el incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  y la probabilidad de liberación no es lineal, sino que sigue una función potencial con un exponente entre 3 y 4 (Dodge & Rahamimoff, 1967)

## **Depresión Sináptica**

Después de períodos de actividad elevada, se puede observar otro tipo de plasticidad llamado depresión sináptica, que consiste en la reducción de la amplitud de los potenciales sinápticos respecto a la de los anteriores. Para explicar este fenómeno se formuló la Hipótesis del Agotamiento Vesicular (Del Castillo & Katz, 1954; Betz, 1970 ), que considera que el mecanismo que produce la depresión es la disminución en el número de vesículas disponibles en la terminal debido a los altos niveles de liberación previa. En términos de la teoría cuántica, este mecanismo actúa sobre  $n$ , el tamaño de la población vesicular que puede liberar su contenido.

La depresión se hace evidente cuando la frecuencia de estimulación es alta, ya que el tiempo en el que la poza liberable se reabastece completamente es mucho más largo que el intervalo entre los impulsos presinápticos. Una vez que se detiene la estimulación, las pozas liberables y de reserva se recuperan por medio del ciclo de reciclaje vesicular y la depresión se desvanece de forma exponencial.

## **Modelo Teórico de Plasticidad Sináptica a Corto Plazo**

Para modelar la cantidad de neurotransmisor liberada en una terminal presináptica, se puede partir de la Teoría Cuántica de Liberación de Neurotransmisor, considerando a sus componentes como variables dinámicas, es decir, de la forma  $m(t) = n(t) \cdot p(t)$ , en donde  $m(t)$ , el número de vesículas que se fusionan, es proporcional a la cantidad de neurotransmisor liberado y también a la amplitud del potencial sináptico observado en la neurona postsináptica.

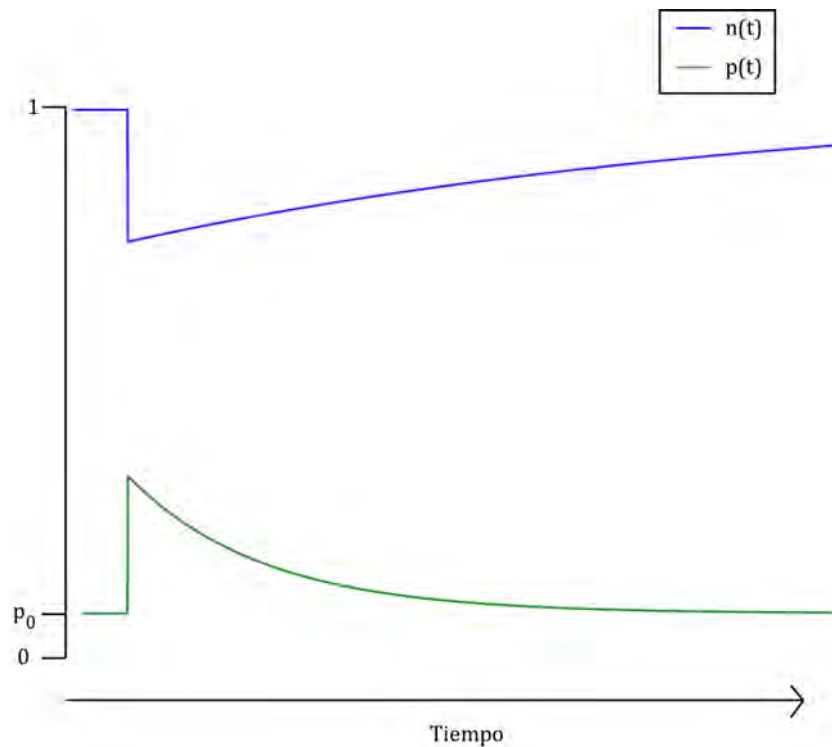
Como  $n(t)$  y  $p(t)$  se modulan de manera dependiente de la actividad previa, por medio de los mecanismos mencionados anteriormente, se pueden modelar de la siguiente manera (Hennig, 2013):

$$\frac{dn(t)}{dt} = \frac{1 - n(t)}{\tau_r} - \sum_j \delta(t - t_j) \cdot p(t) \cdot n(t)$$

$$\frac{dp(t)}{dt} = \frac{p_0 - p(t)}{\tau_f} + \sum_j \delta(t - t_j) \cdot a_f \cdot (1 - p(t))$$

donde  $n(t)$  es la ocupación de la poza liberable,  $\tau_r$  es la constante de reabastecimiento de la poza liberable,  $p_0$  es la probabilidad basal de liberación,  $\tau_f$  es la constante de recuperación de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $a_f$  es la cantidad de facilitación por potencial de acción y  $t_j$  son los tiempos en los que ocurre un potencial de acción. Además  $n(t), p(t) \in [0,1]$ ,  $\tau_f \ll \tau_r$ , y para que el modelo exhiba facilitación  $p_0 \ll 1$ .

A este sistema de dos ecuaciones diferenciales le llamaremos Modelo Teórico de Plasticidad Sináptica a Corto Plazo (MPSCT) y su solución se muestra en la Figura 3 para un solo potencial de acción.



**Figura 3.**

Cambios en el tamaño de la poza liberable  $n(t)$  y la probabilidad de liberación  $p(t)$  ante la llegada de un potencial de acción a la terminal a lo largo del tiempo según el MPSCP.

## Sistema Nervioso de la Sanguijuela

Las sanguijuelas son anélidos pertenecientes a la clase Hirudinea. Están conformadas por 32 segmentos metaméricos inervados por un ganglio cefálico, 21 ganglios segmentales y un ganglio caudal, los cuales forman una cadena a lo largo de la parte ventral del animal. Los ganglios están conectados entre sí por proyecciones nerviosas llamados nervios conectivos e inervan a las estructuras segmentales por medio de raíces que surgen de cada lado de los ganglios (Payton, 1981; Figura 3). Cada ganglio segmental contiene alrededor de 400 neuronas. Desde que Retzius realizó las



primeras observaciones del ganglio de la sanguijuela en 1891, muchas de estas neuronas se han estudiado por sus propiedades morfológicas y electrofisiológicas (Le Marrec-Croq, 2013).

Los ganglios del sistema nervioso de la sanguijuela son ideales para estudiar a las neuronas de manera individual, ya que los somas neuronales son de gran tamaño y fácil acceso, además de que los ganglios exhiben una morfología estereotípica, es decir, son extremadamente parecidos unos a otros no sólo dentro del mismo animal, sino también entre diferentes especímenes (Payton, 1981)

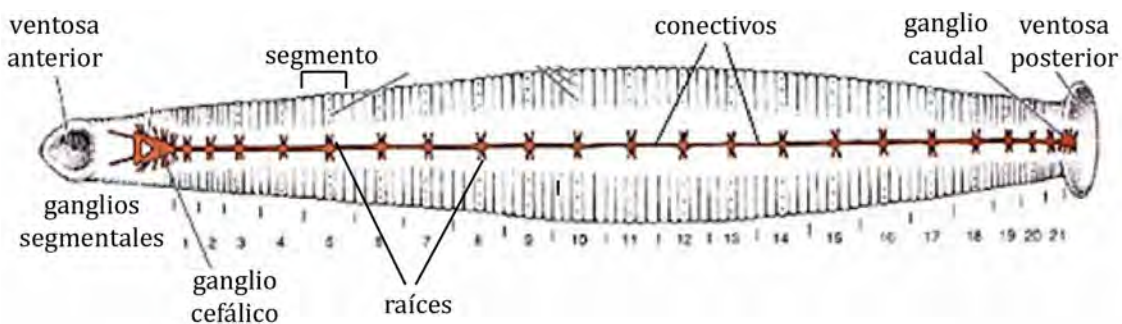
### **Sinapsis P-AP**

En este trabajo se estudiará específicamente la sinapsis formada entre las neuronas mecanosensoriales sensibles a presión (P) y las neuronas llamadas pagoda anterior (AP). En cada ganglio hay cuatro neuronas P y dos AP, cuya ubicación se muestra en la Figura 4. Las neuronas P se encuentran en la región posterior del ganglio, dos se ubican lateralmente y dos en la zona medial. Las neuronas AP se encuentran lateralmente en la región anterior del ganglio. Cada neurona P hace sinapsis monosinápticas, glutamatérgicas y de tipo excitador con ambas neuronas AP (Wu, 2002).

Las neuronas P responden a ligeras deformaciones de la piel. Las dos neuronas P que se sitúan medialmente reciben información de la superficie dorsal de la sanguijuela y generan PS de mayor amplitud en la neurona AP que las dos que se sitúan lateralmente y reciben información de la superficie ventral del animal. Además

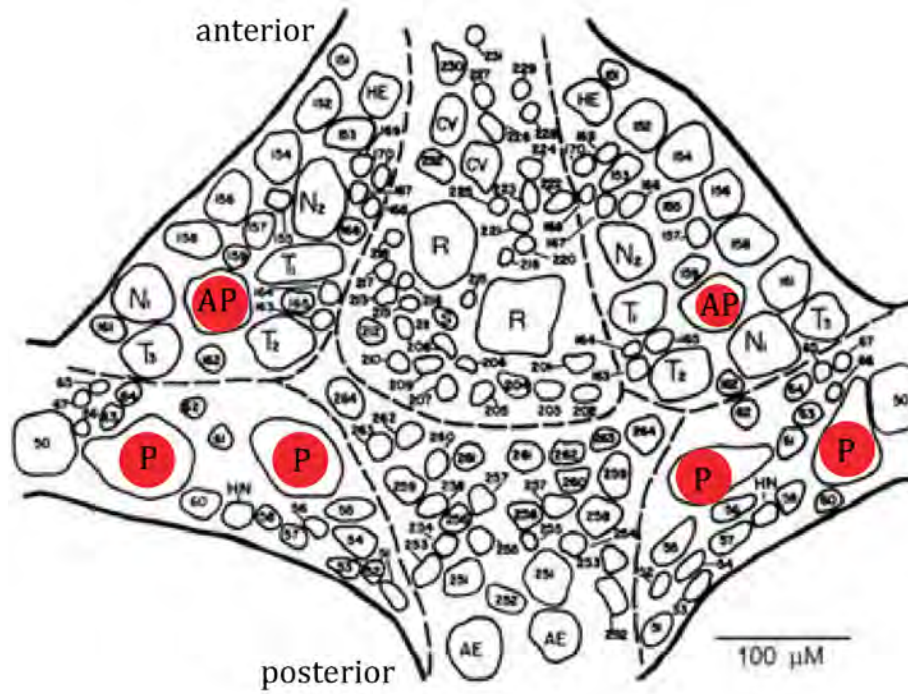
las neuronas P también producen PS mayores en las neuronas AP contralaterales que en las ipsilaterales (Shan & Zhang, 2001). Además de su función como neuronas mecanosensoriales, las neuronas P están involucradas en comportamientos que exhiben capacidad de aprendizaje y memoria en la sanguijuela (Wu, 2002).

La función de la neurona AP (“Pagoda Anterior”) es desconocida, pero se cree que puede funcionar como una neurona sensorial secundaria, que integra información de distintas neuronas sensoriales primarias (como las T, P y N) para modular la fuerza de las contracciones musculares (Shan & Zhang, 2001). Su nombre proviene de la forma de sus potenciales de acción al registrarse en el soma, ya que éste y el axón primario tienen una baja densidad de canales de sodio sensibles a voltaje, por lo que los potenciales de acción se propagan de manera pasiva y llegan al soma atenuados, con la forma del techo de una pagoda.



**Figura 4.**

Sistema nervioso de la sanguijuela. Modificada de Kuffler y Nicholls, 1976.



**Figura 5.**

Ubicación de las neuronas P y AP en el ganglio de la sanguijuela. Modificada de <https://nbio302.wikispaces.com/Leech+Labs>.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

En preparaciones en las que la probabilidad de liberación es baja, ante la llegada de un impulso a la terminal presináptica sólo se libera una pequeña fracción de las vesículas disponibles, lo que impide que un solo impulso agote la poza vesicular. En este tipo de sinapsis, cuando se estimula de forma repetitiva durante un tiempo prolongado, en un inicio hay un período de facilitación sináptica, seguido por un período de depresión que corresponde al agotamiento de la poza vesicular. Sin embargo, en algunas preparaciones de este tipo como la placa neuromuscular de la rana y el hemi-diafragma de la rata, se observa depresión sináptica sin que la estimulación sea prolongada, sino después de un solo impulso previo. A este tipo de depresión sináptica se le conoce como depresión ante impulsos pareados y fue reportada por primera vez en mamíferos por Eccles, Katz y Kuffler en 1941 y posteriormente en anfibios por Lundberg y Quilisch en 1953 (Betz, 1970). Adicionalmente, se ha mostrado que en la placa neuromuscular, durante la estimulación a bajas frecuencias, la sensibilidad de la membrana postsináptica al neurotransmisor no se ve afectada, lo que indica que el mecanismo que produce este tipo de depresión es puramente presináptico (Otsuka et al., 1962) y posiblemente se relacione con la manera en la que el neurotransmisor se almacena y libera de la terminal. A pesar de que la depresión ante impulsos pareados ha sido estudiada en varias preparaciones, a la fecha no se ha descrito el mecanismo que la produce. Dado que en estas preparaciones la estimulación con pulsos pareados separados por un intervalo corto produce facilitación, pero impulsos separados por intervalos largos

producen depresión, es posible que el fenómeno de plasticidad sináptica dependa del tiempo entre los impulsos y no de la cantidad de vesículas utilizadas.

## **HIPÓTESIS**

Si el tipo de plasticidad producido ante pares de impulsos depende del tiempo que transcurre entre ellos, impulsos separados por intervalos cortos siempre producirán facilitación e impulsos separados por intervalos largos siempre producirán depresión sináptica, independientemente de la liberación previa.

Si la depresión ante impulsos pareados es producida por agotamiento vesicular, aumentar la liberación previa provocará mayor depresión.

Si la plasticidad sináptica a corto plazo es causada únicamente por calcio residual y agotamiento vesicular, el Modelo Teórico de Plasticidad Sináptica a Corto Plazo reproducirá los resultados experimentales.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Estudiar los mecanismos que producen la depresión ante impulsos pareados.

### **Objetivos Particulares**

- Determinar si existe algún mecanismo de depresión sináptica adicional al agotamiento vesicular.
- Explorar de qué manera interactúan los distintos mecanismos de depresión entre ellos y con otros mecanismos de plasticidad sináptica ya conocidos.
- Determinar si el MPSCP reproduce los fenómenos de plasticidad sináptica observados experimentalmente.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Preparación**

Los experimentos se realizaron en la sinapsis P-AP de ganglios del sistema nervioso de sanguijuelas *Hirudo medicinalis* adultas. Cada uno de los ganglios se aisló bajo un microscopio estereoscópico, conservando al animal bañado en una solución Ringer para sanguijuela (NaCl 120 mM; KCl 4 mM ; CaCl<sub>2</sub> 2 mM ; tris-maleato 10 mM) con un pH de 7.4. Una vez extraído un ganglio, se colocó en una caja de Petri de 35 mm de diámetro con la superficie recubierta con Sylgard que contenía 1 mL de

solución Ringer que además contenía glucosa en una concentración de 11 mM. El ganglio se sujetó a la superficie de la caja con alfileres que se colocaron a través de las raíces y conectivos.

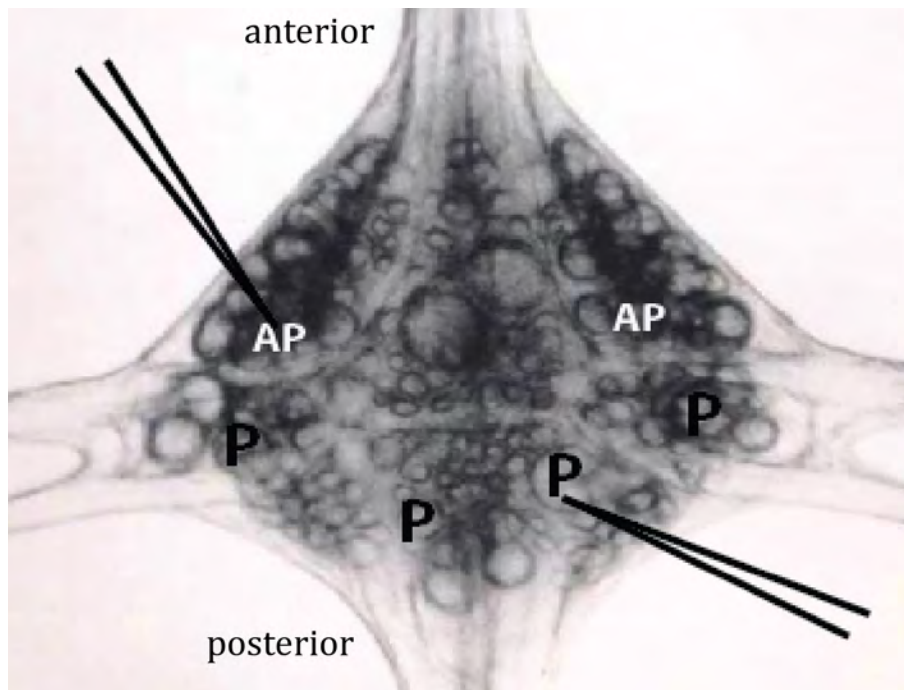
## **Registro intracelular**

Para estimular y registrar la actividad eléctrica de las neuronas, se utilizaron microelectrodos llenos de cloruro de potasio (KCl) 3M, con resistencias de entre 17 y 28 M $\Omega$ . Éstos se fabricaron a partir de tubos capilares de borosilicato de pared delgada, con un diámetro externo de 1 mm, y un diámetro interno de 0.75 mm, y con un filamento interno (Federick Haer y Co), utilizando un estirador de pipetas Sutter P-97. Para llevar a cabo el registro, se utilizó un amplificador Axoclamp 2A (Axon Instruments) en modo de balance de puente.

En cada uno de los experimentos se utilizó una neurona P medial y la neurona AP contralateral a ella (Figura 5). Las neuronas P se estimularon inyectando dos, tres o cuatro pulsos separados por diferentes intervalos de tiempo, utilizando un estimulador Digitimer D4030. Entre una repetición y otra transcurrieron 2 minutos para permitir la completa recuperación de la poza liberable, garantizando que la amplitud del primer potencial sináptico (PS) fuera similar en cada corrida de un experimento. Debido a que en la neurona AP ocurre actividad espontánea continuamente (Shan y Zhang, 2001), para poder registrar los PS producidos en ella, se le inyectó corriente hiperpolarizante manteniendo un potencial de membrana de -

80 mV. La neurona P se mantuvo con un potencial de membrana de aproximadamente -50 mV sin necesidad de inyectar corriente.

Los registros fueron digitalizados por medio de un convertidor analógico-digital Digidata 1320 (Axon Instruments) utilizando el programa pCLAMP9 (Axon Instruments) y se almacenaron en una computadora PC.



**Figura 6.**

Arreglo experimental en el ganglio de la sanguijuela . Modificada de:

<http://neuronbank.org/wiki/index.php/Hirudo>



## **Elevación de la concentración de Ca<sup>2+</sup> extracelular**

Para aumentar la concentración extracelular de Ca<sup>2+</sup> se utilizó una solución de CaCl 1M, la cual se agregó con una micropipeta a la solución contenida en la caja de Petri en la cantidad requerida para elevar la concentración de Ca<sup>2+</sup> al valor deseado. Previo a la realización de los experimentos cuyos resultados se reportan en este trabajo, se verificó que el efecto de la elevación de la concentración de Ca<sup>2+</sup> en la solución fuera reversible. Esto se hizo con la ayuda de un sistema de perfusión que permite cambiar la totalidad de la solución contenida en la caja de Petri; sin embargo, este método no se utilizó en los experimentos ya que es difícil mantener un registro estable durante las perfusiones necesarias.

## **Medición de los fenómenos de plasticidad sináptica**

Para asignar una magnitud a los fenómenos de plasticidad sináptica observados en estos experimentos, se utilizó un Índice de Plasticidad (IP), el cual se calcula como:

$$IP = \frac{A_n}{A_1},$$

en donde  $A_n$  es la amplitud de cualquier PS obtenido en un experimento y  $A_1$  es la amplitud del primer PS obtenido en ese mismo experimento.

Definido de esta forma, un PS con un  $IP > 1$  tiene una amplitud mayor al primer PS, es decir, presenta facilitación sináptica. Por otro lado, un PS con un  $IP < 1$  tiene una amplitud menor al primer PS, es decir, presenta depresión sináptica.

## **Análisis estadístico**

Los resultados que se presentan de forma gráfica, muestran la media  $\pm$  el error estándar estimados a partir de muestras cuyo tamaño se especificará para cada experimento. El tamaño de la muestra se refiere al número de preparaciones en las que se realizó dicho experimento. Para comparar las medias se utilizó una “t” de Student pareada y previamente se analizó la normalidad y la homogeneidad de varianza usando una prueba Shapiro-Wilk (ya que las muestras son pequeñas) y un análisis de Levene respectivamente. Los ajustes de curvas se realizaron en MatLab, al igual que el cálculo de la bondad de ajuste.

## **Simulaciones computacionales**

El sistema de ecuaciones diferenciales correspondiente al MPSCP se resolvió numéricamente utilizando un método de paso fijo implementado en el lenguaje de programación Julia. Para comprobar el correcto funcionamiento del programa se replicaron los resultados reportados por Hennig (2013).

## **Resultados**

### **La sinapsis P-AP exhibe plasticidad sináptica a corto plazo**

Un potencial de acción producido en la neurona presináptica P, produjo un potencial sináptico (PS) en la neurona postsináptica AP, el cual en estos registros tuvo una amplitud de  $4.72 \pm 0.26$  mV, un tiempo al pico de  $24.55 \pm 1.89$  ms y una duración media (el tiempo transcurrido desde que inicia el PS hasta que la amplitud decae al 50% de su valor máximo) de  $120.17 \pm 17.24$  ms. En los casos en los que se estimuló a la neurona presináptica con más de un impulso, los potenciales de acción generados subsecuentemente produjeron potenciales sinápticos con una amplitud diferente a la del primero y por lo tanto, tuvieron un Índice de Plasticidad (*IP*) diferente de 1. Esto indica que en esta sinapsis existen mecanismos de plasticidad sináptica a corto plazo, ya que sus efectos se pueden observar en la escala de tiempo correspondiente a cientos de milisegundos.

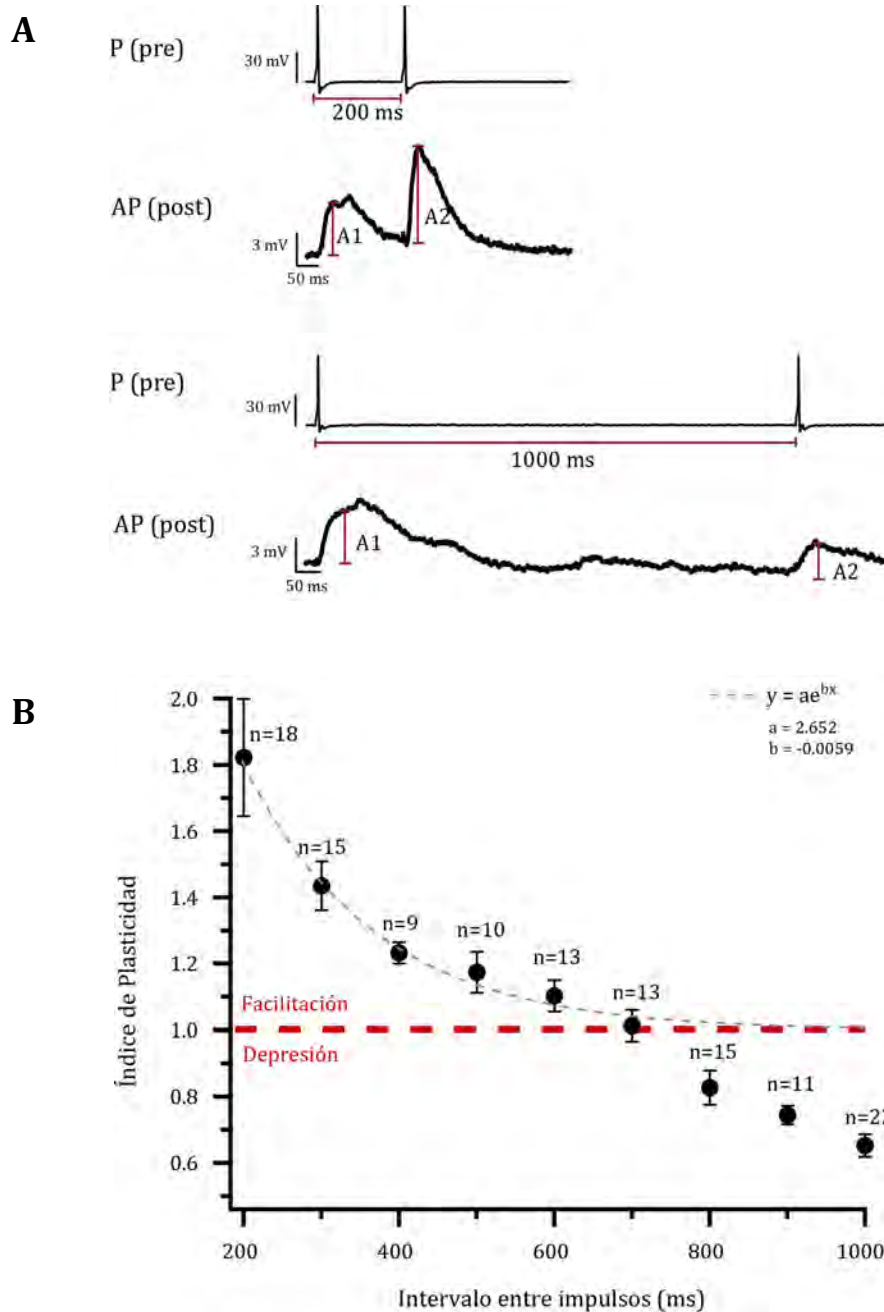
### **El tipo de plasticidad que se produce en respuesta a impulsos pareados depende del intervalo entre los impulsos presinápticos**

Cuando se estimuló a la neurona presináptica con dos impulsos, el tipo de plasticidad que se observó en el segundo PS estuvo determinado por el intervalo que transcurrió entre los impulsos presinápticos (Figura 6A). Cuando los impulsos presinápticos estuvieron separados por un intervalo corto (menor a 700 ms), se produjo un aumento en la amplitud del segundo PS con respecto a la del primero, es

decir, hubo facilitación sináptica. Para pares de impulsos separados por un intervalo de 200 ms se obtuvo en promedio un índice de plasticidad  $IP = 1.82 \pm 0.18$ , es decir, el segundo PS tuvo una amplitud 82% mayor que la del primero. La facilitación sináptica que se produjo en respuesta a un par de impulsos separados por un intervalo corto se extinguió progresivamente conforme se aumentó el intervalo entre los impulsos (Figura 6B). El decaimiento de la facilitación se ajusta a una función exponencial con una constante de tiempo de 170 ms, con una bondad de ajuste del 99.2%. Este resultado es similar al obtenido por Mallart y Martin (1967) para la facilitación en la placa neuromuscular de la rana, y a los obtenidos posteriormente en diversas preparaciones (Zucker & Regehr, 2002). La magnitud y curso temporal de la facilitación observada en la sinapsis P-AP es consistente con la hipótesis del calcio residual y sugiere que éste es el mecanismo que la produce. Además, el hecho de que ocurra facilitación con impulsos pareados indica que un impulso no produce agotamiento vesicular en la terminal presináptica.

Cuando el intervalo entre los impulsos fue de 700 ms el segundo PS tuvo la misma amplitud que el primero ( $IP = 1.01 \pm 0.05$ ). Si consideramos que un solo impulso no agota la poza liberable de vesículas, esto indica que después de este tiempo la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular ha regresado a su valor basal, y por lo tanto la probabilidad de liberación es la misma que en el primer impulso. Sin embargo, cuando los impulsos presinápticos estuvieron separados por un intervalo mayor a 800 ms, la amplitud del segundo PS disminuyó con respecto a la del primero, es decir, hubo depresión sináptica. Para pares de impulsos separados por un intervalo de 1000 ms se obtuvo en promedio un índice de plasticidad  $IP = 0.65 \pm 0.03$ , es decir, la

amplitud del segundo PS fue 35% menor que la del primero. Esto indica que existe un mecanismo de depresión sináptica que se activa con la llegada de un solo impulso a la terminal presináptica pero tiene un efecto más lento que la facilitación por calcio residual.



**Figura 7. Los impulsos pareados producen diferentes tipos de plasticidad dependiendo del intervalo entre ellos.**

A. Registros intracelulares del potencial de membrana de la neurona P presináptica y AP postsináptica estimulando a la presináptica con pares de impulsos separados por 200 (trazos superiores) o 1000 (trazos inferiores) ms. Impulsos separados por 200 ms produjeron un incremento en la amplitud del segundo PS con respecto al primero (facilitación sináptica). Impulsos separados por 1000 ms produjeron una disminución en la amplitud del segundo PS con respecto al primero (depresión sináptica).

B. Índice de Plasticidad  $\frac{A2}{A1}$  (media  $\pm$  ES) para pares de PS separados por diferentes intervalos.

$\frac{A2}{A1} > 1$  indica facilitación;  $\frac{A2}{A1} < 1$  indica depresión. La facilitación se extinguió progresiva y exponencialmente al aumentar el intervalo entre los impulsos. Intervalos de 800 ms o más produjeron depresión.

## **La magnitud de la depresión ante impulsos pareados depende de la cantidad de neurotransmisor liberado inicialmente**

Dado que la depresión sináptica generalmente se explica en términos de agotamiento vesicular, se exploró la posibilidad de que para pares de impulsos separados por intervalos largos, la disminución en la amplitud del segundo PS fuera consecuencia de una reducción en el número de vesículas disponibles. Si así fuera, entonces la magnitud de la depresión aumentaría con la cantidad de neurotransmisor liberada inicialmente.

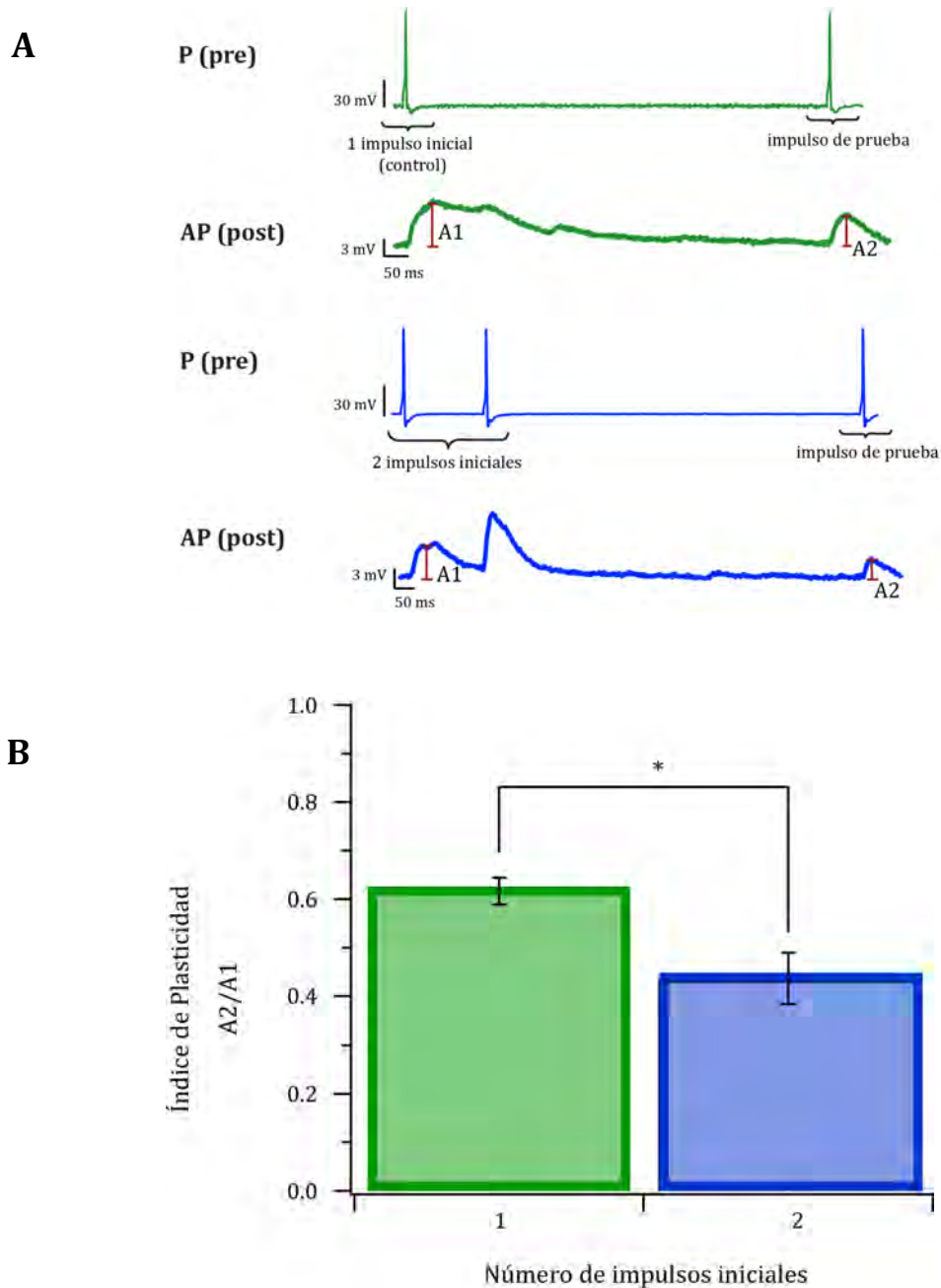
Para comprobarlo, se estimuló a la neurona presináptica con uno (control) o con dos impulsos iniciales (separados por 200 ms), seguidos por un impulso de prueba 1000 ms después del último impulso, como se muestra en la Figura 7A. En ambos casos, el PS producido por el impulso de prueba (cuya amplitud se representa como A2) exhibió depresión por haberse generado después de un intervalo largo. Sin embargo, cuando la estimulación inicial consistió en dos impulsos, la depresión observada en A2 ( $IP = 0.44 \pm 0.05$ ) fue mayor que en el caso control ( $IP = 0.62 \pm 0.03$ ) (Figura 7B). Este resultado es consistente con los resultados obtenidos en la placa neuromuscular de la rana por Betz (1970), donde la depresión en respuesta a uno, dos o tres impulsos iniciales fue progresivamente mayor.

Otra manera de provocar una mayor liberación inicial de neurotransmisor es aumentar la probabilidad de liberación por medio de un incremento en la concentración extracelular de  $Ca^{2+}$ . Los PS producidos en la solución con una concentración de  $Ca^{2+}$  de 10 mM en el baño tuvieron mayor amplitud que los generados con la concentración de calcio fisiológica ( $3.74 \pm 0.26$  mV para la

concentración fisiológica y  $7.05 \pm 0.57$  mV para la concentración aumentada). Al estimular a la neurona presináptica con dos impulsos separados por 1000 ms aumentó también la depresión en el segundo PS, es decir, el índice de plasticidad fue menor en la concentración aumentada de calcio (IP =  $0.70 \pm 0.06$  para la concentración fisiológica e IP =  $0.50 \pm 0.04$  para la concentración aumentada) (Figura 8). Estos resultados también concuerdan con los obtenidos por Betz (1970) para concentraciones elevadas de  $\text{Ca}^{2+}$ , pero difieren de los obtenidos por Bellingham y Walmsley (1999) y Waldeck, et al. (2000) quienes no hallaron correlación entre la cantidad de neurotransmisor liberada inicialmente y la depresión producida posteriormente.

En conjunto, estos resultados muestran que una mayor liberación de neurotransmisor durante la estimulación inicial produce más depresión después de un intervalo largo, lo que indica que la depresión ante impulsos pareados en esta sinapsis es provocada, al menos en parte, por agotamiento vesicular.

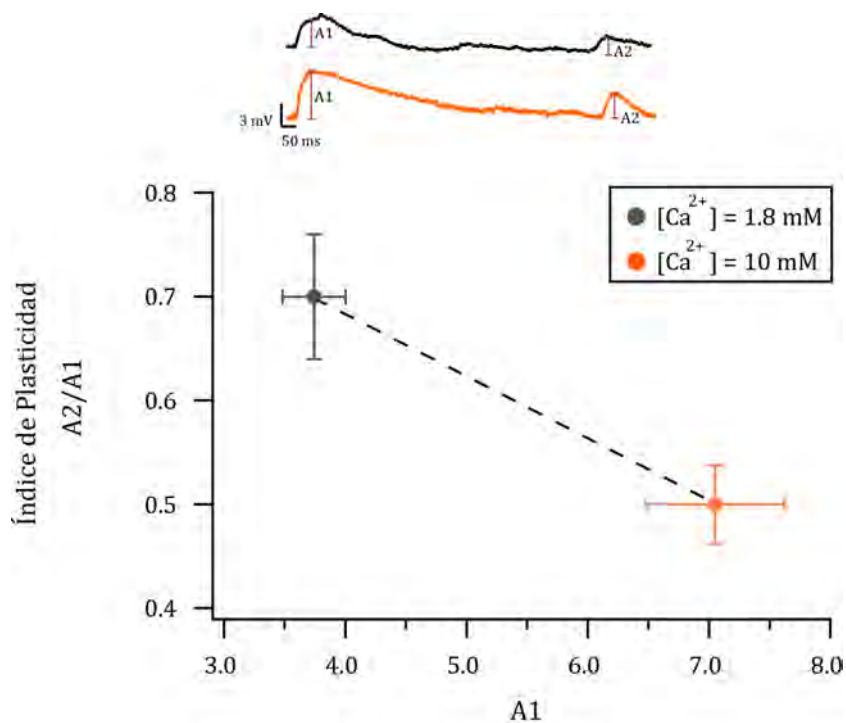




**Figura 8. La magnitud de la depresión ante impulsos pareados depende de la cantidad de neurotransmisor liberada previamente.**

A. Registros del potencial de membrana de la neurona P presináptica y AP postsináptica estimulando a la presináptica con uno (verde) o con dos (azul) impulsos iniciales y un impulsos de prueba 1000 ms después. Cuando se estimuló con dos impulsos iniciales, éstos estuvieron separados por 200 ms. En ambos casos A2 exhibió depresión.

B. Índice de Plasticidad  $\frac{A2}{A1}$  (media +/- ES) para el PS producido por el impulsos de prueba. Cuando la estimulación inicial consistió en dos impulsos la depresión en el segundo PS fue mayor (se observa como una disminución en el IP). El asterisco representa una diferencia significativa. n=8



**Figura 9. Aumentar la liberación inicial de neurotransmisor por medio de la elevación de la concentración extracelular de Ca<sup>2+</sup> también provoca un aumento en la magnitud de la depresión ante impulsos pareados.**

Índice de plasticidad A2/A1 (eje Y) graficado contra la amplitud del primer potencial sináptico A1 (eje X), para pares de PS separados por un intervalo largo (1000 ms) en presencia de una solución extracelular con una concentración de Ca<sup>2+</sup> fisiológica (negro) y con una concentración aumentada a 10 mM (naranja). En la concentración elevada de Ca<sup>2+</sup> se observaron amplitudes mayores para el primer PS y más depresión en el segundo PS (se observa como una disminución en el IP) que en la concentración fisiológica. Ambas condiciones se probaron en el mismo par de células (n=6). En el inserto se muestra un registro del potencial de membrana de la neurona AP postsináptica en donde se muestran los dos PS separados por un intervalo de 1000 ms para ambas condiciones.

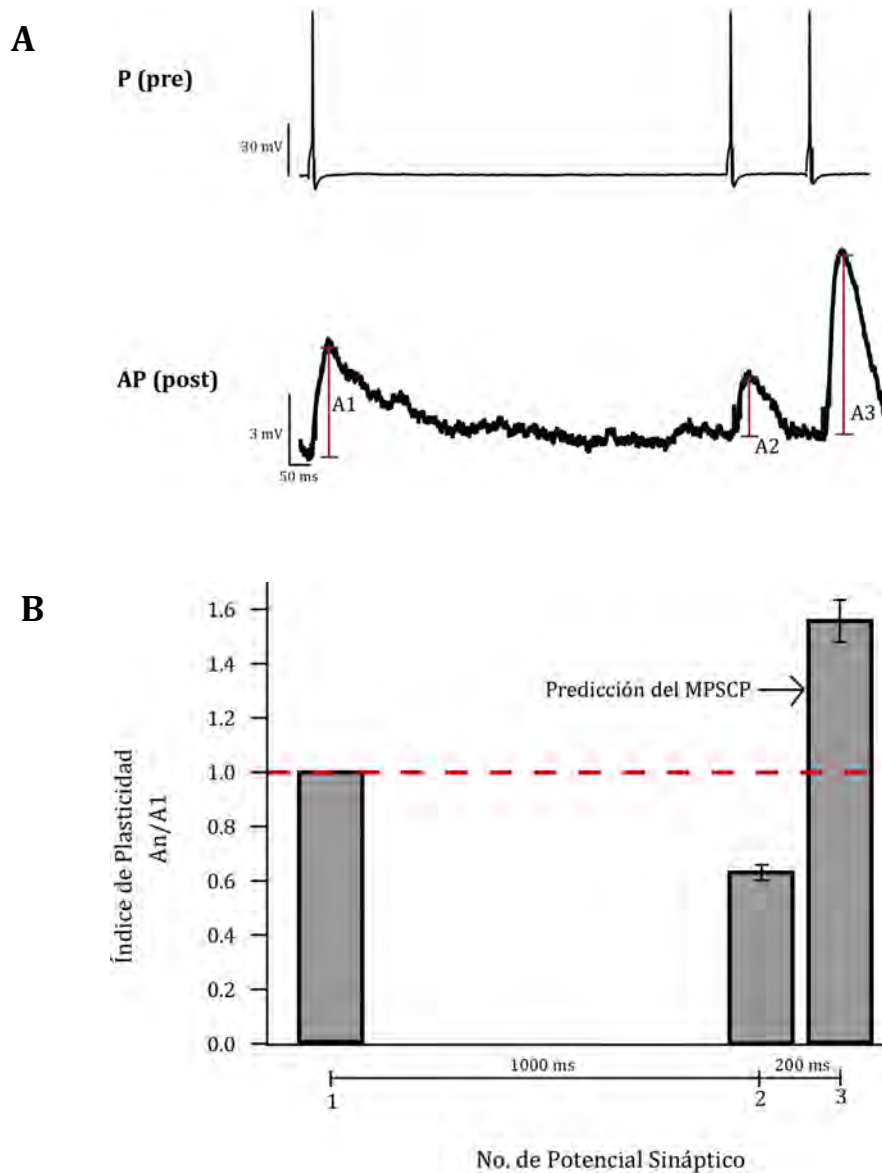
## **La depresión ante impulsos pareados es causada también por un mecanismo que depende del tiempo transcurrido desde el estímulo anterior**

Para determinar si el agotamiento vesicular es el único mecanismo que produce la depresión ante impulsos separados por un intervalo largo, se estimuló a la neurona presináptica con dos impulsos separados por 1000 ms y un tercer impulso 200 ms después del segundo (Figura 9A). Nuevamente, el segundo PS exhibió depresión ( $IP = 0.66 \pm 0.02$ ) ya que se produjo después de un intervalo largo. En el tercer PS se registró una amplitud mayor a los PS sinápticos anteriores, es decir, ocurrió facilitación sináptica ( $IP = 1.59 \pm 0.08$ ) (Figura 9B).

Utilizando el MPSCP se simuló este protocolo de estimulación imponiendo la condición de que después del intervalo largo la poza se encontrara a un 66% de su capacidad, de forma que reprodujera la depresión observada experimentalmente en el segundo PS. Como resultado de esta simulación, el tercer PS exhibió un  $IP = 1.32$  indicando que el modelo predice que a pesar de la reducción en el tamaño de la poza, el incremento en la probabilidad permite producir facilitación en el tercer PS. Sin embargo, la facilitación que se registró experimentalmente fue mayor que la que predijo el modelo y por lo tanto corresponde a una poza que después del intervalo largo se encontrara a más de 66% de su capacidad. Simulando diferentes valores para el porcentaje de ocupación de la poza se encontró que para producir la facilitación observada en el tercer PS, la poza debería encontrarse a un 82% de su capacidad. Esto quiere decir que en respuesta al segundo impulso se fusionaron menos vesículas de

las esperadas según la Teoría Cuántica y sugiere que hay un mecanismo de depresión adicional al agotamiento vesicular, cuyo efecto se observa cuando el intervalo entre los impulsos es largo y que con la llegada de un nuevo estímulo, permite nuevamente la liberación.

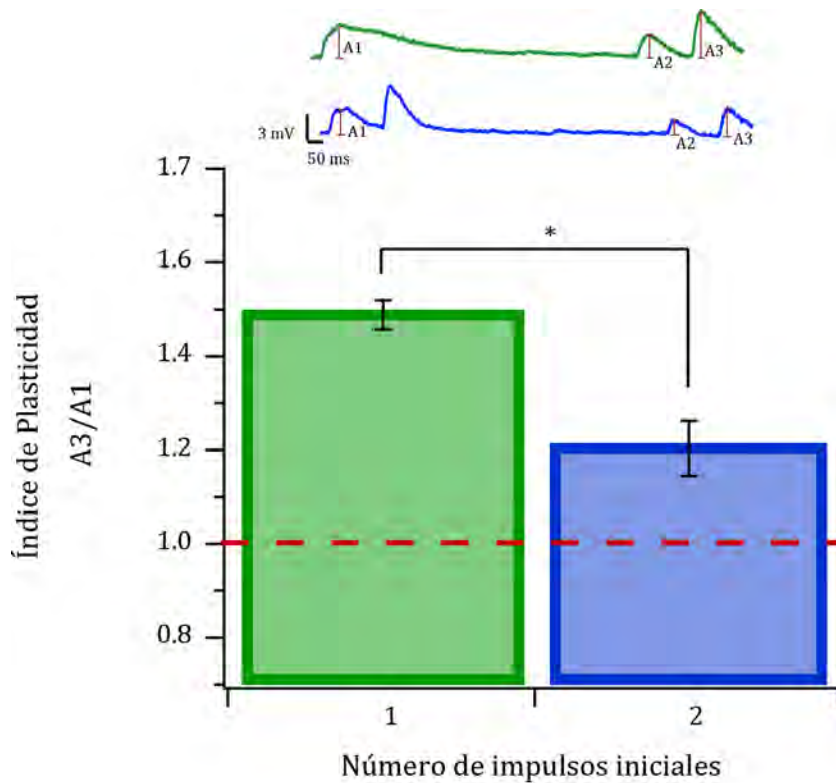
Para determinar si la facilitación en el último PS (producido después del PS sináptico que exhibió depresión) también se ve afectada por el agotamiento vesicular, se repitió el experimento, ahora con dos impulsos iniciales. Bajo estas condiciones, el último PS exhibió menos facilitación que cuando se estimuló con un solo impulso inicial ( $IP = 1.51 \pm 0.09$  para un impulso inicial e  $IP = 1.21 \pm 0.05$  para dos impulsos iniciales) (Figura 10). Esto indica que aunque el agotamiento vesicular no es el único mecanismo de depresión, sí influye en la magnitud de los fenómenos de plasticidad.



**Figura 10. Después de la depresión ante impulsos pareados es posible provocar PS que exhiben mayor facilitación.**

A. Registros del potencial de membrana de la neurona P presináptica y AP postsináptica estimulando la presináptica con un par de impulsos separados por un intervalo largo (1000 ms) seguidos por un tercer impulso producido después de un intervalo corto (200 ms). El segundo PS exhibió depresión y el tercer PS exhibió facilitación y su amplitud fue incluso mayor que la del primer PS.

B. Índice de plasticidad  $\frac{A_n}{A_1}$  (media +/- ES)  $n=1, 2, 3$  para los PS. El segundo PS, producido después de un intervalo largo, exhibe depresión. El tercer PS exhibe facilitación.  $n=34$ . La flecha indica la facilitación que predijo la simulación realizada usando el MPSCP.



**Figura 11. La facilitación producida posteriormente a la depresión depende de la liberación inicial de neurotransmisor.**

Índice de Plasticidad  $\frac{A3}{A1}$  (media +/- ES) para el PS producido 200 ms después de un PS que mostró depresión. Cuando la estimulación inicial consistió en dos impulsos la facilitación en A3 fue menor (se observa como una disminución en el IP) que cuando se estimuló con un solo impulso inicial. Los dos tipos de estimulación fueron realizados en el mismo par de células. El asterisco representa una diferencia significativa. En el inserto se muestran registros del potencial de membrana de la neurona AP postsináptica para los protocolos de estimulación con uno (verde) y dos (azul) impulsos iniciales. n=8.

## **Aumentar la probabilidad de liberación altera la magnitud de algunos fenómenos de plasticidad sináptica**

Para explorar el papel de la probabilidad de liberación en los fenómenos de facilitación y depresión sináptica, se compararon resultados obtenidos en una solución extracelular fisiológica (control) y en una solución en la que la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  se incrementó a 10 mM. El protocolo de estimulación para este experimento consistió en dos impulsos separados por un intervalo de 200 ms seguidos por otro par de impulsos igual, producidos 1000 ms después (Figura 11A). Las diferencias observadas al aumentar la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  se muestran en la Figura 11B y se describen a continuación.

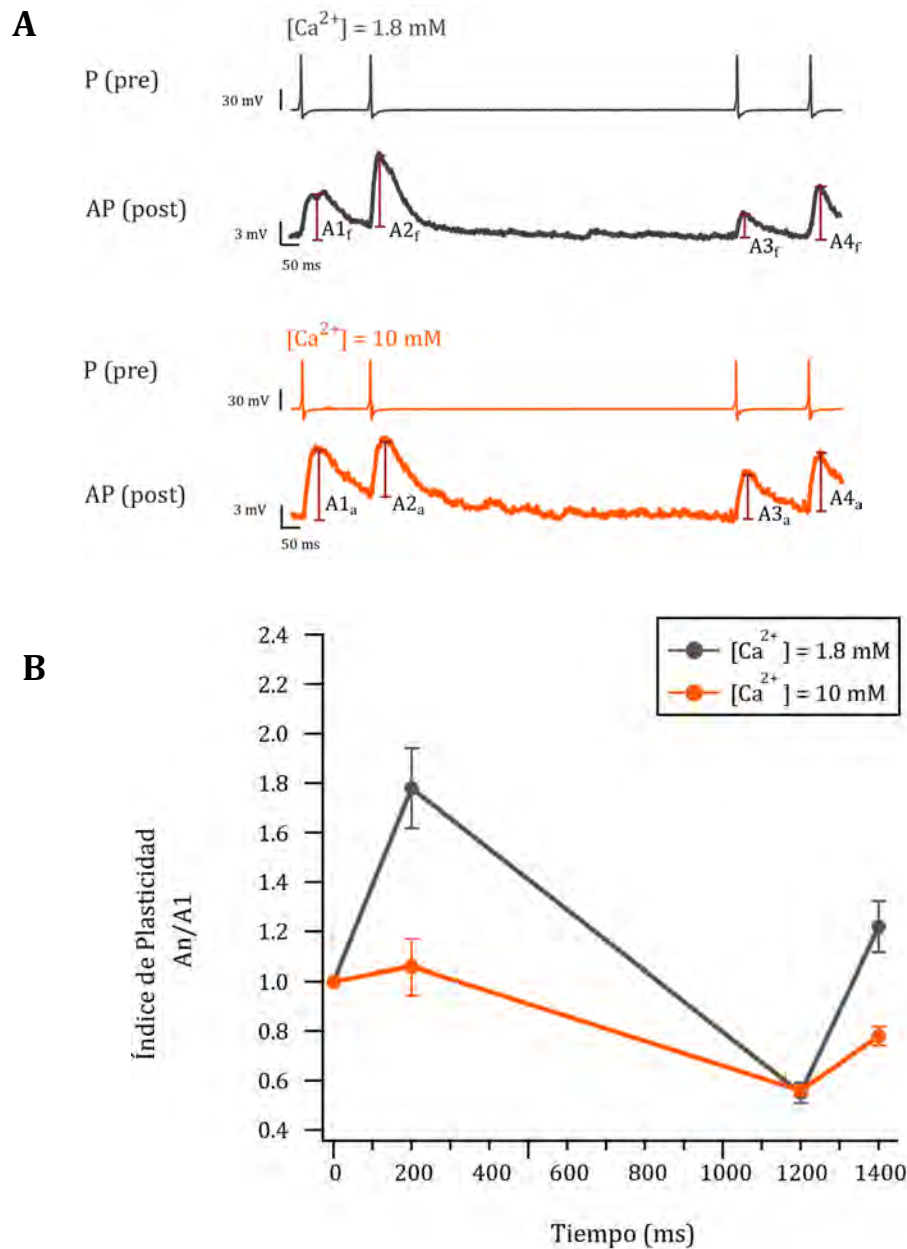
En la concentración fisiológica, el segundo PS ( $A2_f$ ) exhibió facilitación ( $\frac{A2_f}{A1_f} = 1.78 \pm 0.16$ ) ya que se produjo después de un intervalo corto. El tercero ( $A3_f$ ), producido después de un intervalo largo, mostró depresión ( $\frac{A3_f}{A1_f} = 0.55 \pm 0.04$ ) y finalmente, el cuarto ( $A4_f$ ), producido después de un intervalo corto, nuevamente mostró facilitación ( $\frac{A4_f}{A1_f} = 1.22 \pm 0.10$ ). Nuevamente, la facilitación después de un PS que mostró depresión indica que la depresión observada en el tercer PS no fue producida únicamente por una disminución en el número de vesículas disponibles, sino que participó un mecanismo adicional como el que se propuso anteriormente, dependiente del tiempo, cuyo efecto se suma al del agotamiento vesicular.

En la concentración elevada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular la amplitud del primer PS ( $A1_a$ ) fue de casi el doble que la del primer PS en condiciones fisiológicas ( $A1_f$ ). Además, a

diferencia de la condición fisiológica, en la concentración elevada de  $\text{Ca}^{2+}$  el segundo PS ( $A_{2a}$ ), producido 200 ms después del primero no exhibió facilitación ( $\frac{A_{2a}}{A_{1a}} = 1.06 \pm 0.11$ ). Esto podría explicarse si hubiera una probabilidad de liberación máxima impuesta por el mismo mecanismo de liberación dependiente de calcio o puede ser consecuencia del aumento en la liberación durante el impulso inicial, que deja una cantidad menor de vesículas disponibles en la terminal, con lo que, a pesar del incremento en la probabilidad, la liberación posterior no puede ser mayor.

Para la concentración aumentada de  $\text{Ca}^{2+}$ , la depresión en el PS producido después del intervalo largo fue similar a la que se observó en condiciones fisiológicas ( $\frac{A_{3f}}{A_{1f}} = 0.55 \pm 0.04$ ,  $\frac{A_{3a}}{A_{1a}} = 0.56 \pm 0.02$ ). Sin embargo, en esta condición no se observó facilitación en el cuarto PS con respecto al primer PS ( $\frac{A_{4a}}{A_{1a}} = 0.78 \pm 0.04$ ). Esto muestra que debido al incremento en la liberación previa no se pudo mantener el nivel de liberación inicial, a pesar de que la probabilidad de liberación era alta, lo que indica que ha ocurrido agotamiento vesicular y que para esta condición, éste es el principal mecanismo que produce depresión. Sin embargo, el cuarto PS sí presentó facilitación con respecto al PS inmediato anterior ( $\frac{A_{4a}}{A_{3a}} = 1.39 \pm 0.11$ ), lo que pone en evidencia que cuando se produjo la depresión después del intervalo largo había más vesículas disponibles de las que se fusionaron en respuesta a ese impulso. Esto indica que aún en una condición en donde predomina el agotamiento vesicular, es posible observar el efecto de un mecanismo adicional de depresión sináptica.





**Figura 12. La magnitud de algunos fenómenos de plasticidad sináptica a corto plazo depende la concentración de calcio.**

A. Registros del potencial de membrana de la neurona P presináptica y AP postsináptica estimulando la presináptica con un par de impulsos separados por 200 ms seguidos por un par igual, producido 1000 ms después del par anterior, en concentración de Ca<sup>2+</sup> fisiológica (gris) y aumentada (naranja). Los PS obtenidos en la concentración fisiológica se denotan con el subíndice “f”, y los obtenidos en la concentración aumentada se denotan con el subíndice “a”.

B. Índice de plasticidad  $\frac{A_n}{A_1}$  (media +/- ES)  $n=1, 2, 3, 4$  para los PS de cada condición. Debido al aumento en la probabilidad inicial de liberación A1<sub>a</sub> tiene un valor de aproximadamente el doble de A1<sub>f</sub>, como se muestra en el panel A, pero no se ve en esta gráfica debido a la normalización con respecto a A1. Entre las dos condiciones se observaron diferencias en la magnitud de la facilitación sináptica producida en respuesta a pares de impulsos separados por intervalos cortos.  $n=5$ .

## **El Modelo Teórico de Plasticidad a Corto Plazo no predice la depresión ante impulsos pareados observada experimentalmente.**

Una vez que implementamos el MTPSCP utilizando los parámetros utilizados por Hennig (2013) y que obtuvimos los mismos resultados publicados por este autor, se hicieron pequeñas modificaciones hasta hallar el conjunto de parámetros con el que el modelo se ajustó mejor a los datos experimentales. Los parámetros que utilizamos fueron:  $\tau_r = 1$ ,  $\tau_f = 0.2$ ,  $a_f = 0.4$ ,  $p_0 = 0.1$ . Con estos parámetros el MTPSCP reprodujo los cambios en la amplitud del segundo PS obtenidos experimentalmente para pares de impulsos presinápticos separados por intervalos menores o iguales a 700 ms. El modelo predice que conforme el intervalo entre los impulsos aumenta, la facilitación decrece como una función exponencial y que el segundo PS tiene una amplitud igual a la del primero si se produce un segundo después de éste, lo que muestra que después de este tiempo tanto la probabilidad de liberación como la poza vesicular han recuperado sus condiciones iniciales. Sin embargo, con los mismos parámetros, el MTPSCP no reprodujo la depresión que se produjo experimentalmente ante pares de impulsos separados por intervalos de 800 ms o más. (Figura 12). Para tratar de reproducir la depresión producida en respuesta a impulsos separados por intervalos largos, los parámetros relacionados con la depresión fueron llevados a valores extremos, para los cuales el número de vesículas disponibles en el segundo impulso fuera mínimo. Específicamente, se probaron valores muy grandes de  $\tau_r$  para los cuales sí se obtuvo depresión ante intervalos largos. Sin embargo el valor mínimo que alcanzó el IP fue de 0.95 que representa una depresión mucho menor que la que se observa experimentalmente y también predice menor facilitación ante intervalos

cortos. También se probaron valores muy pequeños de  $\tau_f = 0.4$  para los cuales la facilitación se extinguió más rápidamente pero no hubo depresión para ningún intervalo. Ninguno de los conjuntos de parámetros probados logró que el MTPSCP reprodujera los datos experimentales exhibiendo facilitación después de intervalos cortos y una marcada depresión después de intervalos largos. Esto muestra que los mecanismos considerados por el modelo (la utilización y reabastecimiento de la poza vesicular, el cambio en la probabilidad de liberación producido por el calcio residual y su decaimiento) no son suficientes para explicar este tipo de plasticidad, y que existe un mecanismo adicional de plasticidad.

El MTPSCP se utilizó también para simular el protocolo de estimulación con cuatro impulsos mostrado en la sección anterior, en dos diferentes condiciones de probabilidad que imitan las diferentes concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ , y se compararon estas simulaciones con los resultados obtenidos experimentalmente. Para simular el aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  se modificó únicamente el parámetro correspondiente a la probabilidad inicial de liberación, cuyo valor se eligió de forma que reprodujera los datos experimentales para los dos primeros PS del protocolo. El valor de probabilidad que cumplió esta condición fue  $p_0 = 0.285$ .

En ambas condiciones de probabilidad fue posible reproducir la plasticidad observada en el segundo PS, producido 200 ms después del primero. Sin embargo, para el tercer PS, que se produce 1000 ms después que el segundo, hubo discrepancias entre los resultados que arrojó el modelo y los datos experimentales, ya que para ambas condiciones de probabilidad de liberación, la depresión que predijo el modelo ( $IP = 0.95$  para la probabilidad baja e  $IP = 0.87$  para la probabilidad alta) fue

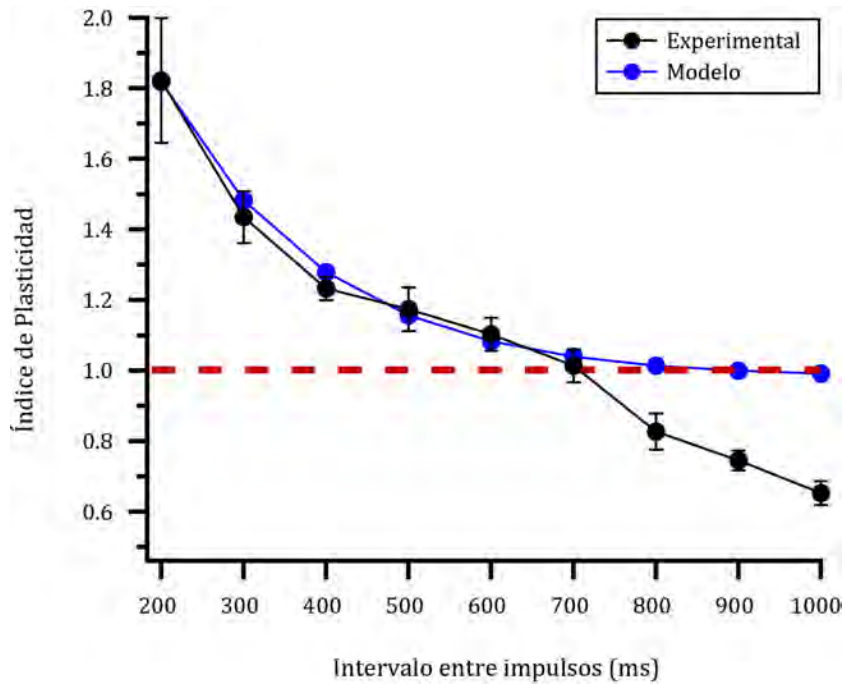
mucho menor que la que mostraron los datos experimentales ( $IP = 0.55 \pm 0.04$  para la probabilidad baja e  $0.56 \pm 0.02$  para la probabilidad alta) (Figura 13A y 13B). Por lo tanto, esta depresión no puede ser explicada únicamente en términos del proceso de agotamiento y reabastecimiento de las vesículas sinápticas considerado por el modelo.

La simulación en la condición de baja probabilidad de liberación indica que transcurridos 1000 ms desde el impulso anterior, tanto la poza vesicular como la probabilidad de liberación han recuperado sus condiciones iniciales, por lo que el PS producido después del intervalo largo tuvo la misma amplitud que el primero, y la facilitación que exhibe el cuarto PS fue igual a la que exhibió el segundo. En cambio, experimentalmente, el segundo par de impulsos no se comportó igual que el primero. El tercer PS presentó depresión, la cual fue producida por un mecanismo adicional al agotamiento vesicular, ya que la facilitación observada en el PS siguiente indica que la poza no se encontraba agotada. La facilitación en el cuarto PS fue menor que la facilitación que se registró en el segundo PS, a pesar de que teóricamente después de 1000 ms la disponibilidad vesicular y la probabilidad de liberación recuperan su valor basal. Esto indica que el mecanismo adicional que produce depresión sináptica no se revierte de forma inmediata con la llegada de nuevos impulsos presinápticos, ya que su efecto se pudo seguir observando en el PS producido después del PS que exhibió depresión.

En la condición de alta probabilidad de liberación, tanto en el modelo como en los experimentos, después de la depresión fue posible producir un PS con una amplitud mayor que el anterior; sin embargo, la facilitación obtenida

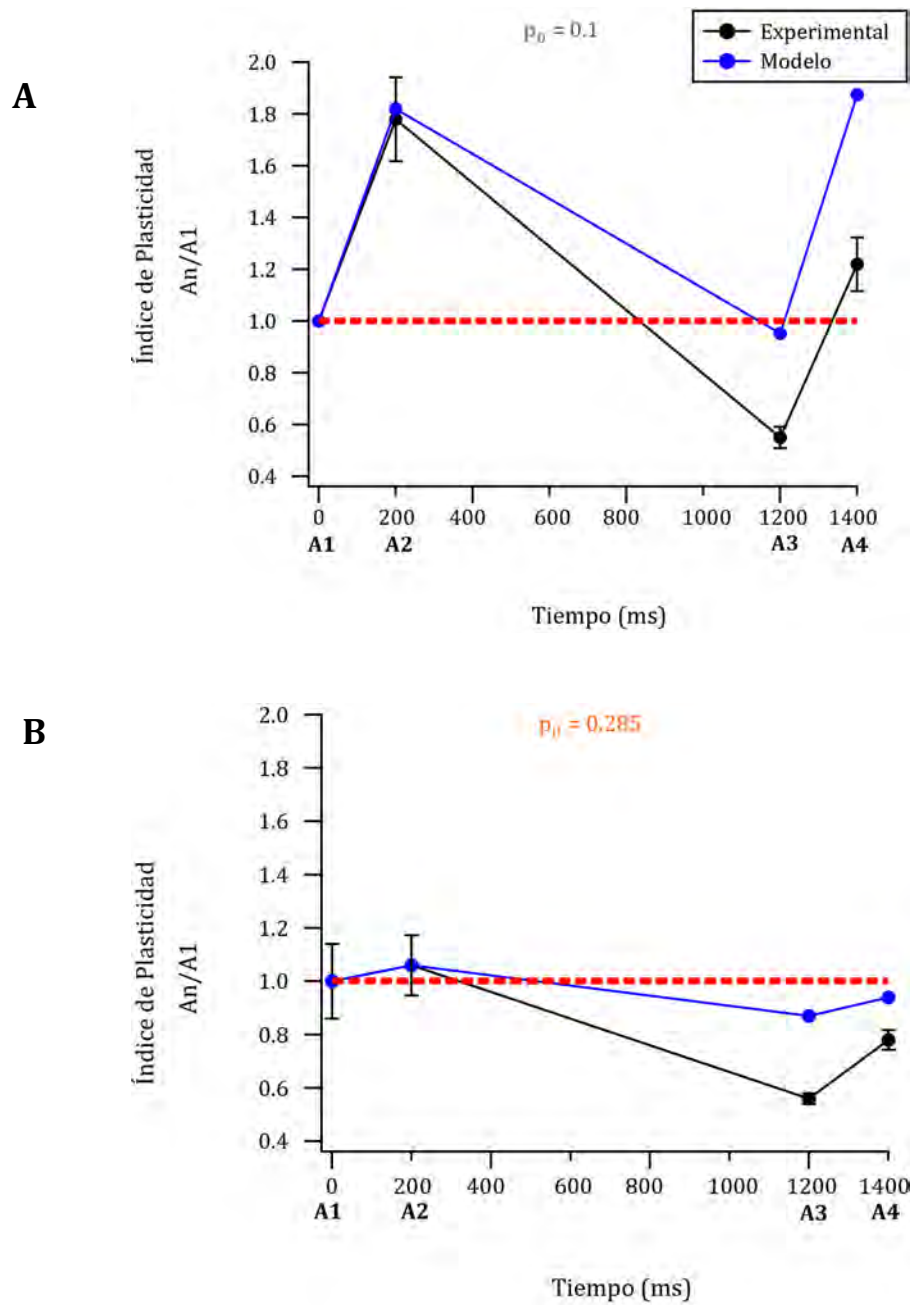
experimentalmente fue mayor que la que predijo el modelo ( $\frac{A4}{A3} = 1.39 \pm 0.11$  en los experimentos y  $\frac{A4}{A3} = 1.08$  en el modelo) a pesar de que en ambos casos el aumento en la probabilidad de liberación producido por la entrada de  $Ca^{2+}$  a la terminal sería el mismo. Esto indica que la depresión observada en la simulación es producida únicamente por agotamiento vesicular, lo que no permite que se incremente mucho la liberación posteriormente, incluso añadiendo calcio residual. Por el contrario, en los experimentos la depresión fue producida por un mecanismo adicional, cuyo efecto se suma al del agotamiento vesicular y del cual se recupera parcialmente con el impulso siguiente.

En conjunto, los resultados aquí presentados, sugieren la existencia de un mecanismo de depresión sináptica diferente al agotamiento vesicular, que después de aproximadamente 800 ms inhabilita algunas vesículas para liberar su contenido, pero cuyo efecto comienza a revertirse con la llegada de otro impulso a la terminal.



**Figura 13. El MTPSCP no reproduce la depresión observada en el segundo PS cuando el intervalo entre dos impulsos es mayor a 700 ms.**

Índice de Plasticidad  $\frac{A_2}{A_1}$  para pares de PS separados por diferentes intervalos, obtenidos experimentalmente (negro) y a partir de simulaciones del MPSCP (azul).  $\frac{A_2}{A_1} > 1$  indica facilitación;  $\frac{A_2}{A_1} < 1$  indica depresión. Para intervalos menores o iguales a 700 ms los resultados experimentales coinciden con los datos que predice el modelo. Para intervalos mayores, el modelo no reproduce la depresión sináptica que se observa experimentalmente. Parámetros:  $\tau_r = 1$ ,  $\tau_f = 0.2$ ,  $a_f = 0.4$ ,  $p_0 = 0.1$



**Figura 14. El MTPSCP no reproduce la magnitud de los fenómenos de depresión y facilitación sináptica observados en el tercer y cuarto PS.**

Índice de Plasticidad  $\frac{A_n}{A_1}$  para pares de PS separados por diferentes intervalos, obtenidos experimentalmente (negro) y a partir de simulaciones del MPSCP (azul).

A. Probabilidad baja de liberación. El modelo no reproduce la depresión observada experimentalmente en el tercer y el cuarto PS.

B. Probabilidad alta de liberación. El modelo predice una depresión menor en el tercer PS que la que se observa experimentalmente, y predice un aumento menor en A4 respecto a A3.

## **DISCUSIÓN**

Los resultados de este trabajo muestran que la depresión ante impulsos pareados es causada por un mecanismo adicional al agotamiento vesicular. Aunque desde hace varios años se ha demostrado que la disminución del tamaño de la poza liberable es un factor insuficiente para explicar este tipo de plasticidad (Betz, 1970; Christensen & Martin, 1970; Bellingham & Walmsley, 1999), no se ha logrado describir con precisión el mecanismo que lo subyace. Proponemos que este mecanismo consiste en una secuencia como la que aparece en la Figura 14; se activa con la llegada de un impulso a la terminal y después de determinado tiempo (800 ms para la preparación estudiada en este trabajo) disminuye la capacidad de las vesículas de liberar su contenido. En el esquema, se representa como una movilización vesicular hacia una región más alejada de la membrana, pero bien podría ser alguna otra secuencia de eventos. Según nuestros resultados, la existencia de este mecanismo se hace evidente cuando se continúa estimulando después de haber producido depresión ante impulsos pareados. En los experimentos en los que se estimuló con 4 impulsos (Figura 11) la facilitación en el cuarto PS permitió determinar que la poza vesicular no estaba agotada en el momento en que se produjo la depresión y confirma la participación de un mecanismo adicional.

La depresión ocurre únicamente en respuesta a impulsos separados por intervalos mayores al tiempo en el que se extingue el efecto del calcio residual (Figura 6). Esto parecería indicar que el mecanismo que produce esta depresión es inhibido por el calcio. Si éste fuera el caso, una concentración aumentada de  $Ca^{2+}$  intracelular



inhibiría este tipo de depresión. Sin embargo, al aumentar la cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  que entra a la terminal durante la estimulación inicial, la magnitud de la depresión fue la misma que en condiciones fisiológicas (Figura 11B). Esto sugiere que este mecanismo no depende del calcio, sino únicamente del tiempo transcurrido desde el último impulso y que este mecanismo está conformado por eventos que se desarrollan lentamente. En esta sinapsis, la depresión ante impulsos pareados se manifiesta cuando el intervalo entre los impulsos es relativamente largo, en comparación con otras preparaciones. Por ejemplo, la máxima depresión se observa con intervalos de 100 ms en la placa neuromuscular de la rana, de 50 ms en el bulbo auditivo de la rata y de 20 ms en el tallo cerebral del pez dorado.

Dentro de las preparaciones en las que se ha observado que ocurre depresión ante impulsos pareados, se distinguen tres tipos. El primero incluye a las neuronas espinosas (Mori et al., 1994) y piramidales (Debanne et al., 1996) de la rata que tienen pocos sitios de liberación y una alta probabilidad de liberación y se caracteriza por no exhibir facilitación para ningún intervalo y exhibir depresión cuando el intervalo entre los impulsos es muy corto. En estas preparaciones se sabe que la depresión es causada por agotamiento vesicular ya que reducir la liberación inicial causa facilitación. El segundo tipo incluye al bulbo auditivo de la rata (Bellingham & Walmsley, 1999) y el tallo cerebral del pez dorado (Waldeck, et al., 2000), y también se distingue por no exhibir facilitación para ningún intervalo y exhibir depresión cuando el intervalo entre los impulsos es muy corto. Sin embargo, en este caso la magnitud de la depresión no depende de la cantidad de neurotransmisor liberada anteriormente. Estas sinapsis tienen la característica de tener muchos sitios de

liberación y una alta probabilidad inicial de liberación. El tercer tipo incluye a la placa neuromuscular de la rana (Betz, 1970) y posiblemente la sinapsis entre las neuronas P y las AP de la sanguijuela, que se utilizó en este trabajo. En ellas ocurre facilitación cuando el intervalo entre los impulsos es corto y depresión cuando el intervalo es largo y la magnitud de la depresión depende de la liberación inicial. Los fenómenos de plasticidad que presentan estas preparaciones corresponden a sinapsis con muchos sitios de liberación y una baja probabilidad inicial de liberación. La diferencia en la plasticidad de los diferentes grupos indica que las características de una sinapsis determinan el tipo de fenómenos de plasticidad que domina en ella.

Las preparaciones del primer y segundo tipo pueden ser útiles para estudiar la depresión ante impulsos pareados sin que sus efectos se vean enmascarados por el mecanismo de facilitación (aunque el mecanismo adicional descrito en este trabajo sólo se observa en la del segundo tipo) y las preparaciones del tercer tipo son adecuadas para estudiar la interacción entre los diferentes mecanismos de plasticidad. De cualquier forma, los resultados de este trabajo validan a la sinapsis P-AP como modelo de estudio para la depresión ante impulsos pareados, que como preparación tiene las ventajas que se expusieron al inicio de este trabajo.

En términos de la hipótesis de la liberación cuántica de neurotransmisor en su forma más simple ( $m=np$ ) y suponiendo que la depresión sea consecuencia de una reducción en  $n$  únicamente, ésta debería ser proporcional a la cantidad de neurotransmisor liberada anteriormente. Sin embargo, aún en las preparaciones en donde se observa una correlación en entre estas dos variables, no se cumple la relación lineal esperada (Betz, 1970; Christensen & Martin, 1970). Una alternativa es

considerar que con la llegada de un impulso presináptico, ocurra no sólo una disminución de  $n$  sino también de  $p$ . Christensen y Martin (1970) mostraron que considerar al agotamiento vesicular como el único mecanismo de depresión lleva a una sobreestimación del parámetro  $p$ , lo que indica que en efecto,  $p$  disminuye durante la depresión. Bellingham y Walmsley (1999) y Waldeck et al. (2000) también proponen un fenómeno de este tipo, ya que en sus experimentos no hubo correlación alguna entre la liberación inicial y la depresión. Ellos proponen que la disminución de  $p$  se debe a una modificación del estado funcional de la maquinaria molecular responsable de la exocitosis, ya que para los PS que exhiben depresión observaron una latencia mayor.

Como moléculas que regulan la movilización y fusión vesicular en función de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  se ha propuesto a la sinapsina (Rosahl et al., 1993) y a la sinaptotagmina (Waldeck et al., 2000). Las sinapsinas son fosfoproteínas altamente conservadas exclusivas del sistema nervioso que regulan la liberación de neurotransmisor controlando el número de vesículas que pueden realizar exocitosis (Greengard, 1993). La fosforilación dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  de las sinapsinas disminuye su afinidad por las vesículas sinápticas y su interacción con los filamentos de actina, lo que permite una mayor movilidad de las vesículas, que pueden entonces pasar a la poza lista para liberar. Rosahl et al. (1993) mostraron que en ratas que expresan bajos niveles de esta proteína aumenta la facilitación y disminuye la depresión en pares de impulsos. El mecanismo de acción de la sinaptotagmina no ha sido aún descrito con detalle pero se sabe que afecta de manera dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  la capacidad de las vesículas de llevar a cabo la fusión con la membrana plasmática, por medio de su

interacción con el complejo SNARE, indispensable para formar el poro de fusión (Südhof, 2004).

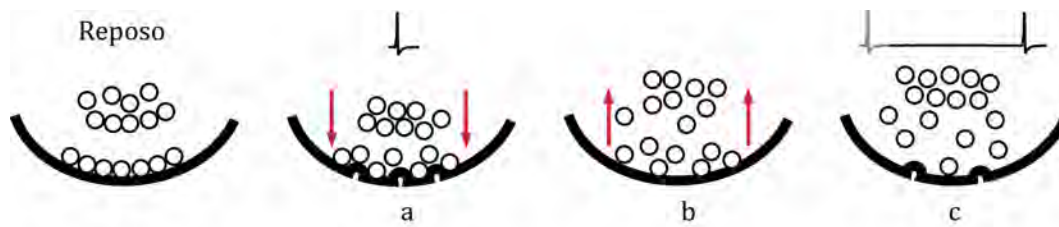
Recientemente, García-Morales et al. (2015) demostraron que agregar ácido lipofosfatídico (LPA), un fosfolípido derivado de la membrana, a la solución extracelular produce depresión sináptica a corto plazo de forma reversible en sinapsis glutamatérgicas, por medio de un mecanismo presináptico. El LPA favorece la fosforilación de la cadena ligera de la miosina (MLC) mediante la activación de la vía intracelular de la fosfolipasa C, lo que reduce la cantidad de vesículas sinápticas ancladas a la zona activa mediante la contracción del citoesqueleto. A pesar de que este mecanismo disminuye el tamaño de la poza liberable, se describe mejor en términos de una reducción en la probabilidad de liberación (García-Morales et al., 2015) la cual tendría un curso temporal más lento que el aumento provocado por calcio residual. Dado que este proceso involucra cascadas de señalización donde participan segundos mensajeros, su curso temporal es lento, lo que concuerda con los resultados del presente trabajo, en los que la depresión se observa cuando el intervalo entre los estímulos es largo. Por ello, proponemos que un mecanismo similar podría ser responsable de la depresión ante pulsos pareados en la sinapsis P-AP. Sin embargo, es necesario continuar investigando si este mecanismo está involucrado en la depresión en esta preparación.

Otro aspecto a considerar fue propuesto originalmente por Betz (1970) quien sugirió que la disminución de  $p$  podría ser de la forma  $\frac{p}{p_0} = \frac{n}{n_0}$ . Para que esto ocurriera sería necesario que existieran diferentes poblaciones de cuantos (aún no se demostraba que cada cuanto se asocia a una vesícula) con diferentes valores de  $p$

asociados. De esta forma, los primeros estímulos liberarían aquellos cuantos con valores de  $p$  altos y entonces se observaría una disminución simultánea de  $n$  y de  $p$ . Actualmente, se sabe que en una terminal existen al menos dos diferentes pozas vesiculares, que en efecto pueden tener diferentes probabilidades de liberación, y que permiten el intercambio vesicular entre ellas (Trommershäuser et al., 2003). Existe evidencia de que diferentes sinapsis tienen diferente número de pozas vesiculares, las cuales pueden variar en la cantidad de vesículas que las componen. Sin embargo, en muy pocas preparaciones se ha podido obtener evidencia directa de la distribución espacial de las pozas, de los marcadores moleculares que diferencian unas de otras, o de la forma específica con la que las vesículas interactúan entre ellas y con el citoesqueleto durante su movilización (Südhof, 2004).

Algunas de estas ideas podrían ser incorporadas al MTPSCP, por ejemplo incluyendo un término de reducción para  $p(t)$ , el cual podría ser proporcional a la reducción en  $n(t)$  o con una constante de tiempo propia y/o incorporando al menos otro compartimento vesicular, en donde las constantes de transición entre un compartimento y otro dependan de la disponibilidad de  $\text{Ca}^{2+}$  en la terminal o de la estimulación. A pesar de que con alguna futura modificación, el modelo lograra reproducir observaciones experimentales, para poder determinar con seguridad y describir con detalle un mecanismo adicional de depresión sináptica, será necesario estudiar a profundidad, desde el punto de vista de la biología celular y molecular, a las terminales sinápticas y los procesos que ocurren entre la estimulación y la liberación de neurotransmisor.

Por último, es importante mencionar que aún no se sabe qué papel desempeña la depresión ante impulsos pareados en la fisiología de las neuronas que la presentan. Al menos en el caso de la sanguijuela, esto puede ser difícil de dilucidar sin conocer la función precisa de la neurona AP, pero dado que ocurre en respuesta a frecuencias bajas de estimulación posiblemente se relacione con el control de respuestas motoras ante estímulos sensoriales intermitentes.



**Figura 15.**

Esquema de la propuesta de mecanismo adicional de depresión sináptica. a) La llegada de un impulso a la terminal provoca fusión y movilización vesicular. b) El mecanismo de depresión inactiva algunas vesículas, ya sea alejándolas de la membrana o inhabilitando su capacidad de fusión. c) Ante la llegada de un segundo impulso, menos vesículas se encuentran listas para liberar su contenido.

## **CONCLUSIÓN**

En este trabajo se mostró la existencia de un mecanismo de depresión sináptica, además del agotamiento vesicular, que se hace evidente a frecuencias bajas de estimulación. Se determinó que en esta sinapsis este mecanismo interactúa con mecanismos de plasticidad sináptica a corto plazo ya conocidos. El efecto de la depresión por agotamiento vesicular se suma al efecto de este mecanismo, el cual a su vez disminuye la facilitación que puede producirse posteriormente.

Se describió de forma general una posible secuencia de eventos que describen a este mecanismo, la cual comienza con la llegada de un impulso a la terminal presináptica provocando fusión de algunas vesículas sinápticas con la membrana plasmática. Posteriormente, se activaría este mecanismo disminuyendo progresivamente la capacidad de fusión de las vesículas que permanecieron en la terminal, por lo que la llegada de un nuevo impulso después de un intervalo largo provocaría la fusión de una menor cantidad de vesículas.

Finalmente, se propusieron posibles modificaciones al MPSCP que lo consideren a este mecanismo, como incorporando un nuevo término en la ecuación que describe a la probabilidad de liberación, o considerando diferentes compartimentos vesiculares.

## **REFERENCIAS**

- Abbott, L. F., and Wade G. Regehr. "Synaptic Computation." *Nature* 431, no. 7010 (October 14, 2004): 796–803. doi:10.1038/nature03010.
- Bellingham, Mark C, and Bruce Walmsley. "A Novel Presynaptic Inhibitory Mechanism Underlies Paired Pulse Depression at a Fast Central Synapse." *Neuron* 23, no. 1 (May 1999): 159–70. doi:10.1016/S0896-6273(00)80762-X.
- Betz, W. J. "Depression of Transmitter Release at the Neuromuscular Junction of the Frog." *The Journal of Physiology* 206, no. 3 (March 1, 1970): 629–44. doi:10.1113/jphysiol.1970.sp009034.
- Birks, R., and F. C. MacIntosh. "Acetylcholine Metabolism of a Sympathetic Ganglion." *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 39, no. 4 (April 1, 1961): 787–827. doi:10.1139/o61-081.
- Byrne, John H. "Postsynaptic Potentials and Synaptic Integration." In *From Molecules to Networks: An Introduction to Cellular and Molecular Neuroscience*, n.d.
- Byrne, John H., and James Lewis Roberts, eds. *From Molecules to Networks: An Introduction to Cellular and Molecular Neuroscience*. Academic, 2004.
- Chi, Ping, Paul Greengard, and Timothy A. Ryan. "Synaptic Vesicle Mobilization Is Regulated by Distinct Synapsin I Phosphorylation Pathways at Different Frequencies." *Neuron* 38, no. 1 (April 10, 2003): 69–78. doi:10.1016/S0896-6273(03)00151-X.



- Christensen, B. N., and A. R. Martin. "Estimates of Probability of Transmitter Release at the Mammalian Neuromuscular Junction." *The Journal of Physiology* 210, no. 4 (November 1970): 933–45.
- Debanne, D., Guérineau, N. C., Gähwiler, B. H., & Thompson, S. M. "Paired-pulse facilitation and depression at unitary synapses in rat hippocampus: quantal fluctuation affects subsequent release". *The Journal of Physiology*, 491(Pt 1), 163–176.
- Del Castillo, J., and B. Katz. "Quantal Components of the End-Plate Potential." *The Journal of Physiology* 124, no. 3 (June 28, 1954): 560–73.
- ———. "Statistical Factors Involved in Neuromuscular Facilitation and Depression." *The Journal of Physiology* 124, no. 3 (June 28, 1954): 574–85.
- Dittman, J. S., Kreitzer, A. C., & Regehr, W. G. "Interplay between facilitation, depression, and residual calcium at three presynaptic terminals." *The Journal of Neuroscience*, 20(4), 1374–1385.
- Dodge, F. A., and R. Rahamimoff. "Co-Operative Action of Calcium Ions in Transmitter Release at the Neuromuscular Junction." *The Journal of Physiology* 193, no. 2 (November 1967): 419–32.
- García-Morales, V., Montero, F., González-Forero, D., Rodríguez-Bey, G., Gómez-Pérez, L., Medialdea-Wandossell, M. J., ... Moreno-López, B. (2015). "Membrane-Derived Phospholipids Control Synaptic Neurotransmission and Plasticity". *PLOS Biol*, 13(5), e1002153. <http://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002153>
- Hennig, Matthias H. "Theoretical Models of Synaptic Short Term Plasticity." *Frontiers in Computational Neuroscience* 7 (2013): 45. doi:10.3389/fncom.2013.00045.

- Heuser, J. E., and T. S. Reese. "Evidence for Recycling of Synaptic Vesicle Membrane during Transmitter Release at the Frog Neuromuscular Junction." *The Journal of Cell Biology* 57, no. 2 (May 1, 1973): 315–44.
- Hodgkin, A. L., and A. F. Huxley. "Currents Carried by Sodium and Potassium Ions through the Membrane of the Giant Axon of Loligo." *The Journal of Physiology* 116, no. 4 (April 28, 1952): 449–72.
- Katz, B., and R. Miledi. "A Study of Synaptic Transmission in the Absence of Nerve Impulses." *The Journal of Physiology* 192, no. 2 (September 1967): 407–36.
- ———. "The Role of Calcium in Neuromuscular Facilitation." *The Journal of Physiology* 195, no. 2 (March 1, 1968): 481–92. doi:10.1113/jphysiol.1968.sp008469.
- Kuffler, Stephen W., and John G. Nicholls. *From Neuron to Brain: A Cellular Approach to the Function of the Nervous System*. Sinauer Associates, 1976.
- Mallart, A., and A. R. Martin. "An Analysis of Facilitation of Transmitter Release at the Neuromuscular Junction of the Frog." *The Journal of Physiology* 193, no. 3 (December 1967): 679–94.
- Marrec-Croq, Le, Francesco Drago, Jacopo Vizioli, Pierre-Eric Sautière, and Christophe Lefebvre. "The Leech Nervous System: A Valuable Model to Study the Microglia Involvement in Regenerative Processes." *Journal of Immunology Research*, *Journal of Immunology Research* 2013, 2013 (June 26, 2013): e274019. doi:10.1155/2013/274019, 10.1155/2013/274019.
- Mori, A., Takahashi, T., Miyashita, Y., & Kasai, H. (1994). "Two distinct glutamatergic synaptic inputs to striatal medium spiny neurones of neonatal rats and paired-pulse depression". *The Journal of Physiology*, 476(2), 217–228.

- Muller, Kenneth J., John G. Nicholls, and Gunther S. Stent, eds. *Neurobiology of the Leech*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2010.
- Murthy, Venkatesh N., and Pietro DeCamilli. "Cell Biology of the Presynaptic Terminal." *Annual Review of Neuroscience* 26, no. 1 (2003): 701–28. doi:10.1146/annurev.neuro.26.041002.131445.
- Otsuka, Masanori, Makoto Endo, and Yoshiaki Nonomura. "Presynaptic Nature of Neuromuscular Depression." *The Japanese Journal of Physiology* 12, no. 6 (1962): 573–84. doi:10.2170/jjphysiol.12.573.
- Payton, Brian. "Structure of the Leech Nervous System." In *Neurobiology of the Leech*, n.d.
- Purves, Dale, Augustine, George J., Fitzpatrick, David, Hall, William C., LaMantia, Anthony-Samuel, McNamara, James O., and Williams, Mark S., eds. *Neuroscience*. Sinauer Associates, 2012.
- Rizzoli, Silvio O., and William J. Betz. "Synaptic Vesicle Pools." *Nature Reviews Neuroscience* 6, no. 1 (January 2005): 57–69. doi:10.1038/nrn1583.
- Rosahl, Thomas W., Martin Geppert, Diane Spillane, Joachim Herz, Robert E. Hammer, Robert C. Malenka, and Thomas C. Südhof. "Short-Term Synaptic Plasticity Is Altered in Mice Lacking Synapsin I." *Cell* 75, no. 4 (November 19, 1993): 661–70. doi:10.1016/0092-8674(93)90487-B.
- Shan, D., and R. J. Zhang. "Frequency Coding of Positional Information by an Identified Neuron, the AP Cell, in the Leech, *Whitmania Pigra*." *Brain Research Bulletin* 56, no. 6 (December 2001): 511–15.

- Südhof, Thomas C. "The Synaptic Vesicle Cycle." *Annual Review of Neuroscience* 27, no. 1 (2004): 509–47. doi:10.1146/annurev.neuro.26.041002.131412.
- Trommershäuser, Julia, Ralf Schneggenburger, Annette Zippelius, and Erwin Neher. "Heterogeneous Presynaptic Release Probabilities: Functional Relevance for Short-Term Plasticity." *Biophysical Journal* 84, no. 3 (March 2003): 1563–79.
- Van Breemen, V. L., E. Anderson, and J. F. Reger. "An Attempt to Determine the Origin of Synaptic Vesicles." *Experimental Cell Research* 14, no. Suppl 5 (1958): 153–67.
- Waldeck, Robert F., Alberto Pereda, and Donald S. Faber. "Properties and Plasticity of Paired-Pulse Depression at a Central Synapse." *The Journal of Neuroscience* 20, no. 14 (July 15, 2000): 5312–20.
- Waxham, M. Neal. "Neurotransmitter Receptors." In *From Molecules to Networks: An Introduction to Cellular and Molecular Neuroscience*, n.d.
- Wu, Eric. "Evidence against the Presence of NMDA Receptors at a Central Glutamatergic Synapse in Leeches." *Invertebrate Neuroscience* 4, no. 3 (April 2002): 157–64. doi:10.1007/s10158-002-0017-6.
- Zucker, Robert S., Kullman, Dimitri M., and Schwarz, Thomas L. "Realease of Neurotransmitter." In *From Molecules to Networks: An Introduction to Cellular and Molecular Neuroscience*, n.d.
- Zucker, Robert S., and Wade G. Regehr. "Short-Term Synaptic Plasticity." *Annual Review of Physiology* 64, no. 1 (2002): 355–405. doi:10.1146/annurev.physiol.64.092501.114547.