



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS

**“COLIBERACION DE GLUTAMATO Y GABA DE BOTONES SINÁPTICOS
AISLADOS DE LAS CÉLULAS GRANULARES DEL HIPOCAMPO”**

T E S I S

Que presenta

JESÚS QUETZALCÓATL BELTRÁN MENDOZA

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE

NEUROBIOLOGIA CELULAR Y MOLECULAR

Director de la Tesis:

DR. RAFAEL GUTIÉRREZ AGUILAR

México, D.F.

Julio, 2015

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada durante el Doctorado.

Al Dr. Rafael Gutiérrez por la dirección de este trabajo, por su paciencia, tiempo y espacio en su laboratorio.

Al Dr Ricardo Félix, Dr. Rafael Gutiérrez y la Dra Ma. Eugenia Mendoza Garrido por su apoyo en la realización de los trámites finales para el examen de grado. A los Drs. Rodolfo Delgado, Daniel Martínez Fong, Jorge Quevedo y Ricardo Félix por su apoyo, revisión y sugerencias al presente trabajo.

A los miembros del laboratorio de aquellos días: Mario Treviño, Emilio J. Galván, M. del Carmen Vivar, Gisela Gómez, Erika Lara, Uriel León, Franco Ortiz, Luis M. Franco, Sebastián Reyes, Beatriz Osorio y Benjamín Muñoz por toda su ayuda, apoyo y amistad.

Al Profesor Norio Akaike y los miembros de su laboratorio: Min-Chul Shin, Masahito Wakita, Tatsuya Matsuura y Satomi Iwata por su apoyo con la preparación "Célula disociada-botón terminal" y por toda su ayuda, hospitalidad y amabilidad.

Al Sr. Alejandro García, a los Ingenieros Neftali Prado y José Antonio Pérez, y al Dr David Elías por su ayuda técnica.

A mis viejos amigos y a mi familia, mi hermana y mi madre, por toda su ayuda, comprensión, apoyo y cariño.

Dedicatoria y agradecimiento

Für Elise

...por toda su ayuda personal y científica, por su tiempo, tolerancia, comprensión y cariño.

ABREVIATURAS

AMPA	ácido α -amino-3-OH-5-metiloxazolato-4-propionico
AMPA R	receptor ionotrópico activado por AMPA
APV	ácido DL-2-amino-5-fosfonopentanoico
CA	cuerno de Ammon
DCG-IV	(2S,1'R,2'R,3'R)-2-(2,3-dicarboxiciclopropil) glicina
EPSC	corriente postsináptica excitadora
EPSP	potencial postsináptico excitador
FM	fibras musgosas
GABA	ácido γ -aminobutírico
GABA _{A,B,C} R	receptor de GABA, tipos A, B, C
GAD	descarboxilasa de ácido glutámico
GD	giro dentado
Glu	glutamato
iGluR	receptor ionotrópico a glutamato
IPSC	corriente postsináptica inhibidora
IPSP	potencial postsináptico inhibidor
L-AP4	ácido 2-amino-4-fosfonobutírico
LCRa/ACSF	líquido cefalorraquídeo artificial
mGluR-I-III	receptor metabotrópico a glutamato, grupos I-III
NBQX	6-nitro-7-sulfamoilbenzo[f]quinoxaline -2,3-dione
NMDA	N-metil-d-aspartato
NMDAR	receptor glutamatérgico ionotrópico activado por NMDA

CONTENIDO

	6
RESUMEN	
ABSTRACT	7
CONTENIDO	8
EL HIPOCAMPO	9
Función de la formación hipocampal	10
Estratos y regiones de la formación hipocampal	11
El circuito hipocampal	12
El giro dentado	14
La región CA3	15
FUNCIÓN SINÁPTICA Y NEUROTRANSMISIÓN	18
Transmisión sináptica en el sistema nervioso central	18
Transmisión sináptica de las fibras musgosas del giro dentado	23
Colocalización y cotransmisión de neurotransmisores en el sistema nervioso	27
Coexistencia y cotransmisión de glutamato y GABA en las células granulares del Giro Dentado	29
JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	32
HIPÓTESIS	34
OBJETIVOS	35
MATERIAL Y METODOS	36
RESULTADOS	41
Obtención de células piramidales disociadas de CA3 con botones funcionales de las fibras musgosas marcados con dextranamina o Zinpyr.	41
Registro en células piramidales de CA3 de las respuestas sinápticas al estimular un solo botón de las fibras musgosas.	41
Caracterización funcional de las respuestas sinápticas evocadas por la estimulación de un solo botón de una fibra musgosa	44
Disección farmacológica y caracterización de la cinética de las respuestas sinápticas a la estimulación de los botones de las fibras musgosas	46
Caracterización funcional de las respuestas GABAérgicas provocadas por la estimulación de los botones de las fibras musgosas	53
DISCUSIÓN	55
CONCLUSIONES	66
PERSPECTIVAS	66
BIBLIOGRAFIA	67
APÉNDICE	82

RESUMEN

En roedores adultos las células granulares del hipocampo tienen un fenotipo glutamatérgico, sin embargo se ha reportado por diversos grupos de investigación que durante el desarrollo, hasta el día 21 posnatal, estas células expresan los marcadores del fenotipo GABAérgico, i.e., el GABA, la descarboxilasa de ácido glutámico (GAD_{67}), el transportador vesicular de GABA (VGAT) y los receptores $GABA_A$ postsinápticos. En esta condición, la estimulación de las fibras musgosas, los axones de las células granulares, produce respuestas GABAérgicas monosinápticas con las características farmacológicas y fisiológicas de la transmisión de las fibras musgosas, lo que sugiere fuertemente que pueden coliberar glutamato y GABA. Sin embargo dada la compleja arquitectura de la red de CA3 y el giro dentado, estas respuestas GABAérgicas pueden ser debidas a estimulación no selectiva de entradas sinápticas provenientes de interneuronas locales. En el presente trabajo mostramos que la estimulación selectiva de un botón identificado de una fibra musgosa unido a la dendrita apical de una célula piramidal de CA3 proveniente de roedores de 2 semanas de edad, produce respuestas (1) glutamatérgicas, (2) GABAérgicas o (3) respuestas mixtas con las características farmacológicas y fisiológicas de las fibras musgosas. Lo que es más, las respuestas sinápticas GABAérgicas y las respuestas mixtas solo fueron obtenidas en neuronas piramidales provenientes de ratas de 15 días de edad pero no de roedores de 25 días de nacidas. De esta manera, los datos presentados en este estudio apoyan las observaciones de trabajos previos y demuestra que en las primeras 3 semanas las fibras musgosas coliberan glutamato y GABA.

ABSTRACT

Hippocampal granule cells express a glutamatergic phenotype in adult period, however in developing mammals it has been described the presence of the markers of the GABAergic phenotype, i.e., the presence of GABA, glutamic acid decarboxylase (GAD₆₇), vesicular GABA transporter (VGAT) and GABA_A receptors by several laboratories in the last 15 years. When this occurs, stimulation of the mossy fibers produces GABAergic monosynaptic responses with the pharmacological and physiological characteristics of mossy fiber transmission. This evidence strongly suggested that until postnatal day 21 mossy fibers can co-release glutamate and GABA, however given the complex network of the dentate gyrus and CA3 area, monosynaptic GABAergic events could represent inputs from local interneurons which are activated with non-selective stimulation, rather than GABA release from mossy fiber terminals. Here we show that the selective stimulation of a single mossy fiber bouton attached to the apical dendrite of a CA3 pyramidal cell from 2-week-old rat produced synaptic responses (1) glutamatergic, (2) GABAergic or (3) mixed glutamatergic/GABAergic, while synaptic responses evoked by the stimulation of inhibitory terminals in the same pyramidal cell were always exclusively GABAergic, underwent frequency-dependent depression and were unaffected by metabotropic glutamate receptors agonists. Even more, GABAergic and mixed glutamatergic-GABAergic synaptic signals could only be recorded in pyramidal cells from 15-, but not from 25-days-old rodents. Data presented in this study support previous observations and demonstrate that in the first 2-3 weeks GABA and glutamate are co-released from mossy fiber terminals.

INTRODUCCIÓN

En el sistema nervioso la transmisión de información rápida (<50 ms) entre las neuronas se lleva a cabo mediante corrientes eléctricas y mensajeros químicos a través de las sinapsis. A la mitad de la década de los años 30's del siglo XX Henry Dale postuló que cada neurona funciona como una unidad metabólica en la que todas sus terminales deben utilizar el mismo mecanismo químico de neurotransmisión. Posteriormente, esta propuesta fue transformada gradualmente a un Principio que establecía que una neurona libera solo un tipo de neurotransmisor en todas sus sinapsis (Dale, 1935; Eccles y cols. 1954; Strata y Harvey, 1999). Esto llevó a muchos científicos a descartar la posibilidad que una neurona pudiera liberar más de un neurotransmisor. Sin embargo, actualmente está bien establecida la coliberación de un neurotransmisor rápido "clásico" y un péptido, nucleótido, ion u otro neuromodulador (Hökfelt y cols. 1980; Schultzberg y cols. 1982; Kupfermann, 1991; Merighi, 2002). Lo que es más, hay evidencia de liberación de dos neurotransmisores de acción rápida por una sola neurona en varias áreas del sistema nervioso (Jonas y cols. 1998; Gutierrez, 2000; Zheng y cols. 2004; Gillespie y cols. 2005; Borodinsky y Spitzer, 2007).

Estudios pioneros en nuestro laboratorio muestran que durante los primeros 21 días del desarrollo postnatal y en la etapa adulta en condiciones de hiperexcitabilidad las células granulares del giro dentado muestran un fenotipo dual GABAérgico/glutamatérgico y en estas condiciones, la estimulación de las células granulares o de sus axones produce respuestas inhibitoras monosinápticas, además de la excitadora, con las características farmacológicas y fisiológicas de la transmisión de las fibras musgosas (Gutiérrez y cols., 2003; Gutierrez, 2005; Jaffe y Gutierrez, 2007; Gutierrez, 2005; Gutiérrez, 2009). Estos hallazgos han sido confirmados y complementados por otros grupos de investigación, sin embargo la evidencia aportada hasta ahora ha sido obtenida activando con estimulación de campo los somas de las células granulares o sus

axones, asumiendo que dicha estimulación es selectiva y que no activa a las interneuronas locales.

Para demostrar concluyentemente que las fibras musgosas del giro dentado pueden coliberar GABA y glutamato, en el presente estudio se registró la actividad sináptica de células piramidales aisladas de la región CA3 del hipocampo de roedores jóvenes mientras se estimulaba de manera selectiva y unitaria botones sinápticos marcados provenientes de las fibras musgosas. Los resultados obtenidos constituyen la demostración directa de que los botones sinápticos de las fibras musgosas del giro dentado de ratas en desarrollo coliberan glutamato y GABA sobre las neuronas piramidales del área CA3 del hipocampo.

EL HIPOCAMPO

El hipocampo es una región cerebral marginal a la neocorteza que en los humanos se encuentra en la parte medial del lóbulo temporal. Esta estructura, que fue nombrada así por el anatomista italiano Giulio Cesare Aranzio en 1587 por su semejanza con el pez marino del mismo nombre, ha sido utilizada como un importante modelo de investigación neurobiológica en diferentes especies, ya que es una estructura muy conservada en la escala filogenética y esto ha permitido un mejor conocimiento del sistema nervioso normal y patológico (Albright y cols. 2000; Lømo, 2003; Andersen y cols. 2006). En los mamíferos se ha demostrado que la formación hipocampal tiene un papel preponderante en tareas de navegación espacial y en la formación de memorias que pueden ser conscientemente expresadas (Scoville y Milner, 1957; O'Keefe, 1976; Squire y Zola, 1996). Un interés adicional por la estructura y funcionamiento del hipocampo se debe a su relación con importantes procesos patológicos como la depresión (Sheline y cols. 2002), la enfermedad de Alzheimer (Jack, Jr. y cols. 1998), la esquizofrenia (Harrison 2004) y la epilepsia (Babb, 1999; Magloczky y Freund, 2005).

Función de la formación hipocampal

Existen dos teorías principales, no mutuamente excluyentes, acerca de la función del hipocampo: la teoría de mapa cognitivo y la teoría de memoria declarativa. La teoría de mapa cognitivo tiene su origen en la década de 1970's con los estudios de O'Keefe quien realizó registros de la actividad neuronal unitaria en roedores en libre movimiento. Inicialmente se descubrieron células piramidales específicas de lugar ("place-cells") caracterizadas por disparar ráfagas de potenciales de acción cuando el animal de experimentación en libre movimiento ocupa una posición particular en el espacio (O'Keefe y Dostrovsky, 1971; O'Keefe, 1976). Posteriormente se encontraron otras categorías de células principales que disparaban ráfagas de potenciales de acción en diferentes contextos espaciales y posicionales. Se describieron así las neuronas de dirección cefálica ("head-direction cells") que presentan tasas altas de disparo cuando la cabeza del roedor se posiciona en una dirección específica en un ambiente familiar (Taube y cols 1990), y las neuronas de entramado ("grid-cells") que poseen múltiples localizaciones de disparo que delimitan los vértices de arreglos triangulares a lo largo de una superficie (Hafting y cols. 2005). Así, estos trabajos llevaron a la hipótesis de que estas células en conjunto conformarían un amplio circuito de representación espacial dinámica y autolocalización (Morris 2007).

Por otra parte, Scoville y Milner en 1957 reportaron que la remoción quirúrgica de la región mesial del lóbulo temporal en pacientes con epilepsia o esquizofrenia producía amnesia anterógrada permanente (Scoville y Milner, 1957). El caso más célebre de este reporte original fue el paciente H.M., en el cual también se describió décadas después un deterioro en la adquisición de nuevos conocimientos semánticos (Gabrieli y cols. 1988; Corkin, 2002). Estudios posteriores en humanos y en primates demostraron que el hipocampo y las cortezas de la región mesial del lóbulo temporal subyacen la capacidad de memoria declarativa (Squire y Zola, 1996). Aún más, Zola-Morgan y cols. demostraron en otro famoso paciente sin patología subyacente (R.B.), que la lesión bilateral limitada a una región del hipocampo (área CA1) producía amnesia anterógrada declarativa, aunque menos severa que en el caso de H.M. (Zola-

Morgan y cols. 1986). En conjunto estos estudios llevaron a la concluir que en primates humanos y no humanos, el lóbulo temporal medial y, en específico el hipocampo, constituye un sistema que permite la consolidación de memorias declarativas a través de una transferencia gradual de la información procesada hacia la neocorteza (Squire y Zola 1996, Morris 2007). Puesto que la arquitectura y operaciones neurales son esencialmente iguales a lo largo del hipocampo y entre las distintas especies, se ha planteado la hipótesis que los algoritmos neurales del hipocampo se desarrollaron filogenéticamente primero para el cálculo de distancias simples y complejas en un espacio físico, y eventualmente se emplearon para la navegación en un espacio cognitivo y el computo de relaciones entre elementos percibidos o imaginados (Buzsáki, 2006).

Estratos y regiones de la formación hipocampal

El arreglo y conectividad neuronal de la formación hipocampal es muy distintiva y conservada a lo largo de toda su longitud. Las neuronas y las fibras presentan una disposición estratificada con seis regiones adjuntas pero citoarquitectónicamente distintas: la corteza entorrinal, el giro dentado, el parasubiculum, el presubiculum, el subiculum y el hipocampo propiamente dicho (Amaral y Lavenex, 2006; Fig. 1). Este último se divide en 3 regiones, llamadas cuerno de Ammon (CA)1, CA2 y CA3 (Lorente de Nó, 1934). El hipocampo contiene en todas sus regiones las siguientes capas o estratos: alveus, oriens, piramidal, radiatum y lacunosum-molecular. En la región CA3 se encuentra una capa más: el *stratum lucidum*, que se localiza entre los estratos piramidal y radiatum (Förster y cols. 2006; Amaral y Witter, 1989). Por su parte, el giro dentado se divide en tres capas: el *stratum moleculare*, el *stratum granulare* y el hilus o capa polimórfica.

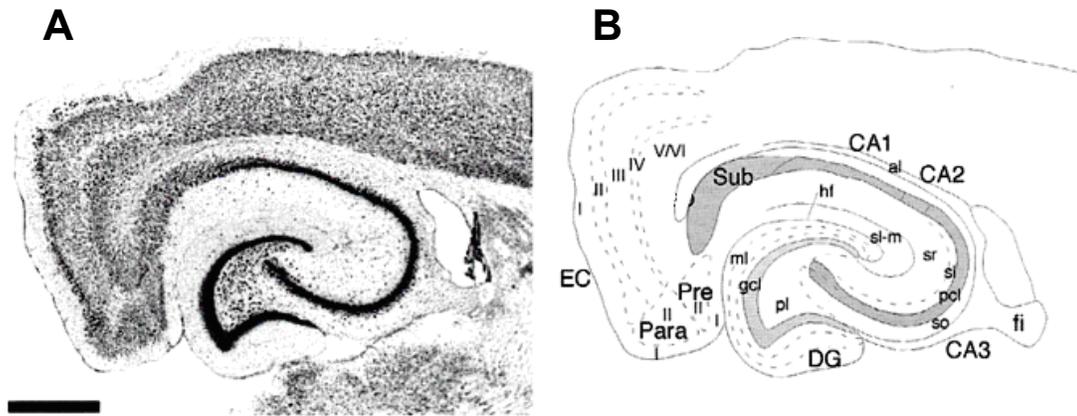


Figura 1. Corte horizontal de la formación hipocampal de la rata. **A.** Tinción de Nissl de una rebanada de corteza entorrinal-hipocampo. **B.** Esquema de la rebanada que muestra las diferentes regiones y capas de la formación hipocampal. al, alveus; CA, cuerno de Ammon; DG, giro dentado; EC, corteza entorrinal; fi, fimbria; gcl, capa de células granulares del giro dentado; hf, fisura hipocampal; ml, capa molecular del giro dentado; Para, parasubiculum; pcl, capa de células piramidales del hipocampo; pl, capa polimórfica del giro dentado; Pre, presubiculum; sl, stratum lucidum de CA3; sr, stratum radiatum del hipocampo; sl-m, stratum lacunoso-molecular del hipocampo; so, stratum oriens del hipocampo. Los números romanos indican las capas corticales. Barra=500 μ m. (Tomado y modificado de Amaral y Lavenex, 2006).

El Circuito hipocampal

El circuito de la formación hipocampal consiste en un circuito principal excitador preponderantemente unidireccional con circuitos paralelos secundarios (Fig. 2 B). El punto de inicio de este circuito es la corteza entorrinal, región por medio de la cual las fibras aferentes de todas las áreas corticales alcanzan el hipocampo (Burwell y Amaral, 1998; Amaral y Lavenex, 2006). De esta región, las neuronas de la capa II dan origen a la vía perforante que atraviesa el subiculum y termina en el giro dentado y el área CA3 del hipocampo. Por su parte las neuronas localizadas en la capa III proyectan fibras al subiculum y al área CA1. En el giro dentado, el siguiente relevo en la vía principal del circuito, las células granulares dan origen a las fibras musgosas (FM; Fig. 2 B). Estas hacen sinapsis con interneuronas locales en el hilus del giro dentado (Amaral, 1979), y en la región CA3 hacen contacto con las células piramidales e interneuronas a lo largo del *stratum lucidum* (Crawford y Connor, 1973; Acsady y cols. 1998; Fig.3 Superior). De esta forma, las neuronas de CA3 reciben entradas directas de la corteza

entorrinal a través de la vía perforante e, indirectamente, a través de las células granulares del giro dentado.

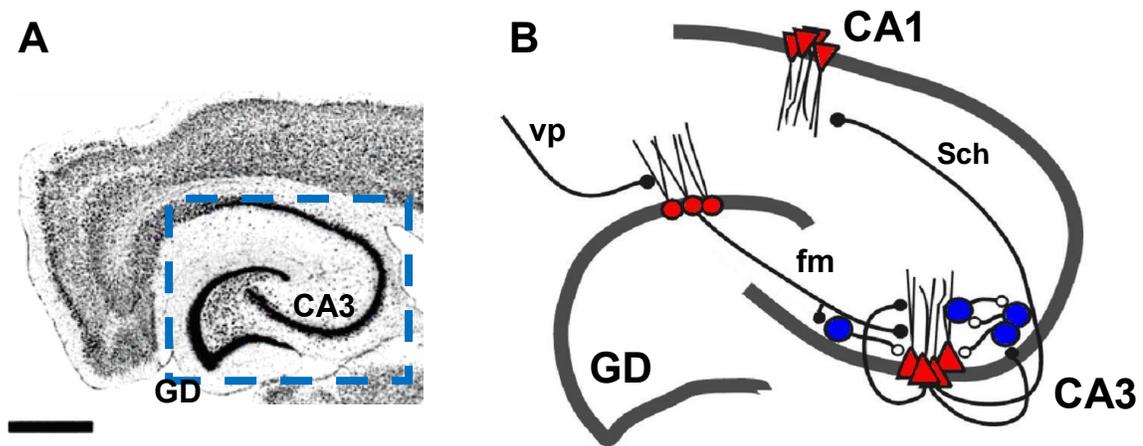


Figura 2. Circuito Hipocampal. **A.** Rebanada de corteza entorrinal-hipocampo donde se indican con el recuadro las regiones del giro dentado y CA3. Barra=500 μ m. **B.** Esquema simplificado de los circuitos del hipocampo que muestra la vía principal y las principales regiones. vp, vía perforante de la corteza entorrinal; GD, giro dentado; fm, fibras musgosas de las células granulares; CA3, región CA3 del hipocampo; Sch, fibras colaterales de Schaffer; CA1, región CA1 del hipocampo. Con triángulos rojos se representan las células piramidales, con círculos rojos las células granulares y con círculos azules las interneuronas locales. (Figuras tomadas y modificadas de Anderson y cols., 1971 y de Scharfman, 2007).

Las células piramidales de CA3, además de hacer sinapsis con otras células piramidales, envían sus axones llamados, en conjunto, fibras colaterales de Schaffer, hacia la región CA1 (Ishizuka y cols. 1990). Las células piramidales de CA1 envían sus axones al subiculum y a las capas profundas de la corteza entorrinal. El subiculum envía sus fibras al pre- y parasubiculum, aunque su proyección cortical más importante es la corteza entorrinal (Witter, 1993). Finalmente, las capas profundas de la corteza entorrinal dan origen a proyecciones que se dirigen a las mismas áreas corticales de las que recibieron fibras aferentes.

El Giro Dentado

Esta región que constituye el segundo relevo en el circuito principal de la corteza entorrinal-formación hipocampal posee neuronas principales excitadoras llamadas células granulares que proyectan sus fibras al hilus y a la región CA3 (Fig. 3 A). En su recorrido contacta células musgosas y diversos tipos de interneuronas que son neuronas de proyección local de naturaleza excitadora e inhibidora respectivamente (Amaral y cols. 1990). En los roedores, en cada hipocampo existen cerca de un millón de células granulares (Claiborne y cols. 1986). Dichas neuronas son de forma esférica, con un diámetro de 8 a 12 μm y con un árbol dendrítico orientado en forma perpendicular al *stratum* de células granulares, que se distribuye en forma radiada a lo largo del *stratum moleculare*. Los axones de las células granulares, llamados en conjunto fibras musgosas, se origina en el polo opuesto al origen de las dendritas y se dirigen a la región CA3 atravesando el hilus (Claiborne y cols. 1986). En su trayecto estos axones dan origen a 6-8 colaterales que hacen sinapsis con las células musgosas e interneuronas locales del giro dentado, sin embargo su proyección principal se dirige a la región CA3, en donde los axones se disponen en forma compacta a lo largo del *stratum lucidum*, estableciendo sinapsis con las células principales e interneuronas locales (Fig.3 Superior; Acsady y cols. 1998; Amaral y Lavenex, 2006).

Las fibras musgosas son axones amielínicos de 0.2-0.5 μm de diámetro con expansiones de 3-8 μm , llamados botones gigantes que forman grandes uniones complejas con las espinas dendríticas de una sola célula piramidal (Fig. 3 B, C). Estos botones gigantes tiene de 3 a 80 zonas activas y se presentan a intervalos de 140-150 μm de tal modo que cada célula granular establece sinapsis con cerca de 15 células piramidales a lo largo de todo CA3 (Blackstad y cols. 1970). Las fibras musgosas poseen además filopodios que emergen de los botones gigantes y hacen sinapsis con interneuronas locales. Estas células son numéricamente el principal blanco de las fibras musgosas ya que de cada botón gigante emergen 2 - 3 filopodios (Acsady y cols. 1998). Finalmente, a lo largo de cada fibra musgosa se observan pequeños botones "*en passant*" de 0.5-2 μm de diámetro que hacen sinapsis con interneuronas de CA3 (Claiborne y cols. 1986).

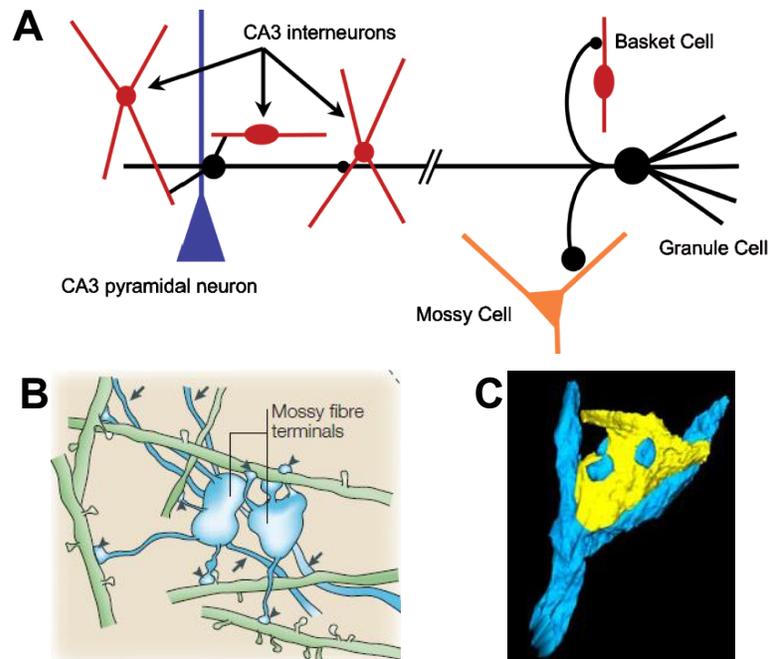


Figura 3. Las fibras musgosas y sus terminales sinápticas. **A.** Esquema simplificado de los blancos sinápticos de las células granulares. **B.** Esquema de dos botones gigantes de las fibras musgosas (flechas) con extensiones filopoidales (cabezas de flechas) que contactan dendritas de interneuronas de CA3. **C.** Reconstrucción tridimensional de un botón de fibra musgosa (amarillo) sobre una dendrita apical (azul) de una célula piramidal del área CA3 de un roedor de 28 días posnatales (Figuras tomadas y modificadas de Jaffe y Gutiérrez, 2007; Nicoll y Schmitz, 2005; y Rollenhagen y cols., 2007).

La región CA3

Las neuronas de la región CA3, como en otras áreas corticales, se dividen en células principales e interneuronas locales, que en conjunto reciben tres importantes entradas sinápticas: las fibras musgosas del giro dentado, las fibras de la vía perforante provenientes de la corteza entorrinal, y las fibras de asociación/comisurales que se originan de células piramidales de la región CA3 del hipocampo contralateral (Amaral y cols. 1990). La información de la región CA3 se transmite a otras regiones esencialmente por los axones de las células piramidales. Estas neuronas poseen axones muy ramificados que envían fibras a otras células piramidales próximas en CA3 (fibras de asociación), a la región CA1 contralateral (fibras de proyección comisural), a la región CA1 ipsilateral (fibras colaterales de Schaffer), y en una pequeña proporción al hilus del giro dentado (Ishizuka y cols. 1990; Scharfman, 2007).

En esta región, las células principales son llamadas células piramidales y constituyen una capa de neuronas glutamatérgicas con soma de forma triangular alineados en el *stratum pyramidale*. Estas neuronas poseen un árbol dendrítico basal y un árbol dendrítico apical, orientados en sentido perpendicular al *stratum pyramidale*. El árbol dendrítico basal se extiende al *stratum oriens* y el apical hacia la fisura hipocampal atravesando los *strata lucidum, radiatum* y *lacunosomoleculare* (Amaral y Witter, 1989). Las células piramidales forman una población relativamente homogénea, sin embargo a lo largo de CA3 las características morfológicas de estas neuronas cambian. Lorente de Nó subdividió esta área en las regiones CA3a (próxima a la región CA1), CA3c (cercana al hilus del giro dentado) y CA3b (entre CA3a y CA3c; Lorente de Nó, 1934). Las células piramidales localizadas en la parte proximal de CA3 (CA3c) poseen un tamaño de su soma de alrededor de $300 \mu\text{m}^2$ (20 μm en su diámetro) y una extensión dendrítica total de 8 a 10 mm, mientras que las células más grandes, localizadas en la región distal de CA3 (CA3a), tienen un tamaño somático de cerca de $700 \mu\text{m}^2$ (30 μm de diámetro) y una extensión dendrítica total de 16 a 18 mm (Ishizuka y cols. 1995). Los árboles dendríticos tanto basales como apicales están cubiertos por espinas donde se establecen sinapsis excitadoras. Algunas de las espinas más grandes en el sistema nervioso están localizadas en las dendritas proximales de las células piramidales de CA3, conocidas como excrecencias espinosas, en donde los botones gigantes de las fibras musgosas establecen sinapsis con las células piramidales (Fig. 3 C), conteniendo 30-40 sitios de liberación de neurotransmisor (Henze y cols. 2000).

Las interneuronas, a pesar de ser considerablemente menos abundantes que las células principales (< 10 % de la población total), constituyen una población muy diversa de neuronas GABAérgicas con una conectividad altísima y muy variada y que difieren entre ellas en su forma, patrón de arborización, propiedades funcionales y en su expresión de marcadores moleculares (Freund y Buzsáki, 1996; Somogyi y Klausberger, 2005). En el hipocampo se han distinguido 16 tipos diferentes de interneuronas (Somogyi y Klausberger, 2005). En términos generales, las interneuronas se pueden dividir de acuerdo a sus marcadores

bioquímicos: las que expresan proteínas de unión a calcio y las que expresan neuropéptidos (Freund y Buzsáki, 1996); de acuerdo con su patrón de disparo, en interneuronas de disparo rápido e interneuronas de disparo no-rápido y, finalmente con base en los dominios de contacto de sus sinapsis, en interneuronas de inhibición perisomática, interneuronas de inhibición dendrítica e interneuronas biestratificadas (Somogyi y Klausberger, 2005). Los blancos celulares de las interneuronas son las células principales y las propias interneuronas, pero existen distintas clases de interneuronas que muestran preferencia por alguno de estos blancos neuronales. Así, hay interneuronas que selectivamente inervan otras interneuronas, interneuronas que terminan sobre las dendritas de las células piramidales e interneuronas que contactan la región somática de las células piramidales (Freund y Buzsáki, 1996). Estas diferencias en el patrón de contacto sináptico de los dominios subcelulares tiene implicaciones funcionales, ya que las interneuronas de inhibición somática mantienen en las células principales un control temporal preciso en la generación de potenciales de acción, mientras que aquellas de dominio dendrítico contrarrestan las entradas sinápticas excitadoras y participan en el control de la electrogénesis dendrítica (Miles y cols. 1996). Los ensambles de células piramidales son los elementos que codifican, procesan y almacenan la información, mientras que la red de interneuronas de proyección local modula las funciones computacionales y determina la generación de oscilaciones (Buzsáki y Chrobak, 1995; Paulsen y Moser, 1998).

Funcionalmente el giro dentado y el área CA3 tienen un papel importante en la codificación de memoria y el procesamiento de la información espacial. Las células granulares del giro dentado modifican y procesan las señales provenientes de diversas áreas corticales de tal forma que inducen esquemas de actividad nuevos y bien definidos en los ensambles de células piramidales de CA3, evitando la interferencia con patrones de actividad previamente codificados. (Acsady y Kali, 2007; Kesner, 2007; Treves y cols. 2008). Se tiene evidencia que el giro dentado es la región que lleva a cabo el proceso de separación de patrones en CA3 y la neocorteza, paso en el cual se amplifican las diferencias entre las representaciones nuevas y las ya almacenadas, lo que constituye un elemento

crítico en la codificación de nuevos trazos de memoria episódica (Rolls y Kesner 2006; Leutgeb y Moser 2007; Bakker y cols. 2008).

FUNCIÓN SINÁPTICA Y NEUROTRANSMISIÓN

El sistema nervioso posee una gran capacidad computacional y de procesamiento de información que le permite generar patrones complicados de comportamiento y llevar a cabo su función integrativa (Sherrington 1906, Churchland y Sejnowski 1992). Evolutivamente las células nerviosas han adquirido la capacidad de recibir, enviar y procesar señales hasta en 10^5 contactos especializados (Ryan y Grant 2009). Lo que es más, pueden combinar y procesar dichas entradas sinápticas, lineal- y no-linealmente, para llevar a cabo un gran cantidad y diversidad de cálculos (Koch 2004, Muotri y Gage 2006). Así, la función del sistema nervioso se basa de manera fundamental en el flujo de información entre las sinapsis.

Transmisión sináptica en el sistema nervioso central

El concepto de sinapsis tiene su origen en el siglo XIX con los estudios de Claude Bernard sobre los efectos del curare. Este investigador planteó la hipótesis de que existía una estructura especializada entre las terminales de los nervios motores y las fibras musculares en donde actuaba el curare (Bernard 1864). Poco después Kühne en 1871 describió el intrincado patrón de terminales nerviosas periféricas yuxtapuestas a la membrana muscular subyacente planteando que esta unión neuromuscular constituía el sitio de contacto especializado para la transmisión del impulso del nervio motor al músculo (Shepherd y cols., 1997). A pesar de ello, en aquella época la unión neuromuscular se descartó como modelo para la transmisión entre neuronas del sistema nervioso central, por la imposibilidad de observar de manera directa los contactos entre las neuronas. A fines del siglo XIX Santiago Ramón y Cajal con base en sus estudios histológicos estableció la independencia de las células nerviosas en la teoría neuronal y adelantó el concepto de sinapsis proponiendo que la propagación del impulso nervioso entre

neuronas se hacía entre contactos de axones y dendritas a nivel de “ciertos aparatos” específicos (Ramón y Cajal 1889). Del análisis de sus observaciones histológicas, Cajal además dedujo correctamente la dirección de los flujos de los impulsos nerviosos entre las neuronas e influenció el trabajo de varios fisiólogos. Poco después, Sherrington basado en sus estudios de los arcos reflejos espinales realizó una descripción general de la dinámica de neurotransmisión en el sistema nervioso y en este contexto propuso que los sitios de unión entre las neuronas no eran simples contactos sino conexiones especializadas de gran relevancia funcional. Sherrington, con Foster y Verral, nombró *sinapsis* a estas uniones interneuronales especializadas (Sherrington 1897, 1906; Fulton 1938).

La naturaleza de la transmisión entre las terminales nerviosas y su blanco postsináptico inicialmente se pensó de origen eléctrico por influencia de los trabajos pioneros de Galvani (1791), Du Bois-Reymond (1877) y Von Helmholtz (1950). Aunque Du Bois-Reymond ya apuntaba que la neurotransmisión podría deberse a la secreción de alguna sustancia estimuladora (Du Bois-Reymond 1877), fue Elliot tres décadas después quien obtuvo la primera evidencia de esto, al probar los efectos de la adrenalina sobre diversos órganos antes y después de ser denervados. Elliot hipotetizó que la adrenalina podría ser la sustancia liberada cuando el impulso nervioso arriba a las terminales nerviosas periféricas (Elliot 1904), y un año después Langley planteó el concepto de sustancias receptoras en las células blanco (Langley 1905). Posteriormente Henry Dale, Otto Loewi y otros investigadores contribuyeron de manera fundamental a consolidar la hipótesis de la naturaleza química de la neurotransmisión. Loewi con sus famosos experimentos de estimulación vagal en una preparación de corazones aislados probó la liberación de acetilcolina en las terminales cardíacas del nervio vago (Loewi 1921). Dale por su parte confirmó de manera definitiva el papel de la acetilcolina como neurotransmisor en el sistema nervioso periférico de mamíferos (Dale 1934, 1935). Muchos investigadores aceptaron la naturaleza química de la transmisión interneuronal, sin embargo varios electrofisiólogos, entre los que destacaba John C. Eccles, rechazaban inicialmente la transmisión química en el sistema nervioso. No obstante, con el desarrollo de los registros intracelulares se

terminó por vislumbrar por el propio Eccles y colaboradores que la transmisión en las neuronas era mediada químicamente (Eccles 1982).

En la segunda mitad del siglo XX el panorama en la neurotransmisión se hizo más complejo. Se inició la caracterización de varias sinapsis del sistema nervioso periférico y central en diversas preparaciones (Del Castillo y Katz 1954, Curtis y Watkins 1960, Katz y Miledi 1968). Lo que es más, se descubrieron varios neurotransmisores excitadores e inhibidores de diferente naturaleza bioquímica (Roberts y Frankel 1950, Carlsson 1958, Curtis y Watkins 1960), y la existencia de sinapsis eléctricas a través de uniones comunicantes en organismos vertebrados e invertebrados (Furshpan y Potter 1959, Bennett y cols. 1963). Actualmente se acepta que existen dos tipos principales de sinapsis a saber: las sinapsis eléctricas y las sinapsis químicas. En las primeras, la transmisión de la información se lleva a cabo directamente, de manera muy rápida, altamente estereotipada y frecuentemente bidireccional, por medio de flujos iónicos a través de uniones comunicantes que establecen continuidades físicas de una célula a otra (Furshpan y Potter, 1959; Bennett y Zukin, 2004). En el caso de las sinapsis químicas la señalización es fundamentalmente unidireccional, necesita de varios pasos, es más plástica y se lleva a cabo usando neurotransmisores específicos (Axelrod y cols 1961, De Robertis y cols 1962, Katz y Miledi 1965, Krnjevic 1974). En el sistema nervioso de los mamíferos el mecanismo de señalización más común es la transmisión por sinapsis químicas, en donde los neurotransmisores liberados por la neurona presináptica producen flujos de corriente iónica o cambios metabólicos en las neuronas blanco mediante la activación de receptores específicos de naturaleza proteica, localizados en la membrana postsináptica (Del Castillo y Katz 1955, Miledi y cols 1971, Peroutka y Snyder 1981, Eccles 1982, Albright y cols 2000). Existen diversos neurotransmisores de diferente naturaleza química y peso molecular, los cuales basándose en su tamaño se pueden dividir en dos grupos principales. El primer grupo lo constituyen los neuropéptidos, moléculas transmisoras relativamente grandes que se componen usualmente de 3 a 30 aminoácidos y de efecto relativamente lento, mientras que en el segundo grupo tenemos los neurotransmisores de molécula pequeña, con efectos rápidos

en el rango de unos cuantos milisegundos, que comprenden a las amina biogénicas como la acetilcolina y la adrenalina, y aminoácidos como el glutamato y el GABA.

Los neurotransmisores rápidos de molécula pequeña, pueden activar dos clases de receptores en las células postsinápticas: receptores ionotrópicos y receptores metabotrópicos. Los receptores ionotrópicos están conformados por canales iónicos regulados por ligando que dan lugar a flujos de corriente iónica que constituyen respuestas postsinápticas rápidas que duran solo algunos milisegundos. Por otra parte, los receptores metabotrópicos están conformados por proteínas acoplados a proteínas G que generan cambios metabólicos que de manera secundaria generan respuestas más lentas en la membrana postsináptica.

Por su efecto en las células postsinápticas los neurotransmisores se pueden clasificar en excitadores e inhibidores, dependiendo si despolarizan o hiperpolarizan el potencial eléctrico de la membrana postsináptica o que produzcan una despolarización lenta que permita un cortocircuito (shunt) eléctrico en la membrana. Los efectos de un neurotransmisor en la polarización de la membrana celular dependen del flujo iónico neto que generan, es decir, si producen un flujo catiónico o aniónico hacia el interior o exterior de la célula. En el sistema nervioso central de individuos adultos el principal neurotransmisor excitador es el glutamato y el principal inhibidor es el GABA, aunque, en ciertas condiciones, el glutamato puede tener efectos inhibidores y el GABA puede producir despolarización excitadora (shunt) o inhibidora (Ben Ari y cols. 1989, Ren y cols. 2007).

La transmisión glutamatérgica es la transmisión excitadora principal en el sistema nervioso central y sus efectos posinápticos se llevan a cabo por la activación de 3 tipos de receptores ionotrópicos y 8 metabotrópicos. Los receptores ionotrópicos a glutamato incluyen al receptor del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-propionico (AMPA-R), al receptor de kainato (KA-R), y al receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA-R), que producen potenciales postsinápticos despolarizantes de

pocos milisegundos, con propiedades farmacológicas y biofísicas características para cada subtipo de receptor. Estos receptores son canales catiónicos no selectivos permeables a sodio (Na^+), potasio (K^+) y en algunos casos a calcio (Ca^{++}). Por su parte, los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR) se clasifican en tres grupos: I, II y III (Pin y Duvoisin, 1995). Los receptores del grupo I incluyen los tipos mGluR1 y mGluR5 y están generalmente localizados en la membrana postsináptica en la periferia de la hendidura sináptica (Baude y cols. 1993). Los receptores del grupo II incluyen a los tipos mGluR2 y 3, mientras que los del grupo III incluyen a los tipos mGluR4, 6, 7 y 8, localizándose todos ellos en la membrana presináptica. Funcionalmente los mGluR del grupo I pueden responder preferencialmente a ráfagas de potenciales de acción que producen una presencia prolongada de glutamato en el área perisináptica, mientras que los mGluR del grupo II y III actúan como autoreceptores que regulan la liberación de neurotransmisor en las terminales sinápticas mediante la modulación de corrientes iónicas o interfiriendo con la maquinaria de liberación (Kamiya y cols. 1996)

El GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio en el sistema nervioso central en organismos adultos y puede activar dos tipos de receptores de membrana: los receptores de GABA tipo A (GABA_AR) y tipo B (GABA_BR). Los receptores tipo C (GABA_CR) son receptores ionotrópicos considerados una variante de los GABA_AR (Bormann, 2000) a los que no se les conoce un papel importante en la formación hipocámpal (Kullman, 2007), y no serán considerados en este trabajo. Los receptores GABA_AR son receptores ionotrópicos permeables a iones Cl^- y HCO_3^- (Bormann y cols. 1987; Kaila, 1994) mientras que los tipo GABA_BR son receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G que al activarse permiten el flujo de corrientes lentas de K^+ o bloquean canales de Ca^{++} (Bormann, 1988). El GABA liberado sinápticamente genera potenciales postsinápticos inhibitorios de unos cuantos milisegundos, pero puede además activar receptores a GABA de alta afinidad localizados fuera de la sinapsis y generar corrientes persistentes de Cl^- (Semyanov y cols. 2003, Chadderton y cols. 2004, Brickley y Mody 2012). En efecto, aunado a la inhibición fásica, la activación de ciertos receptores GABA_A

genera una inhibición tónica con propiedades biofísicas y farmacológicas distintivas (Farrant y Nusser, 2005).

Transmisión sináptica de las fibras musgosas del giro dentado

La sinapsis de las fibras musgosas con las células piramidales de CA3 es una sinapsis clave en el circuito hipocampal y actúa como un detonador condicional que con un breve tren de potenciales de acción en una sola fibra musgosa puede hacer disparar potenciales de acción en una célula piramidal (Henze y cols., 2002). Asimismo opera como una sinapsis maestra que genera plasticidad dependiente de la temporalidad de los potenciales de acción en las sinapsis de las fibras de asociación/comisurales entre células piramidales (Kobayashi y Poo, 2004). Además presenta varias formas de plasticidad homosináptica a corto y largo plazo: potenciación postetánica, potenciación a largo plazo, facilitación por pulsos pareados y facilitación por frecuencia (Fig. 4; Salin y cols., 1996; Toth y cols., 2000).

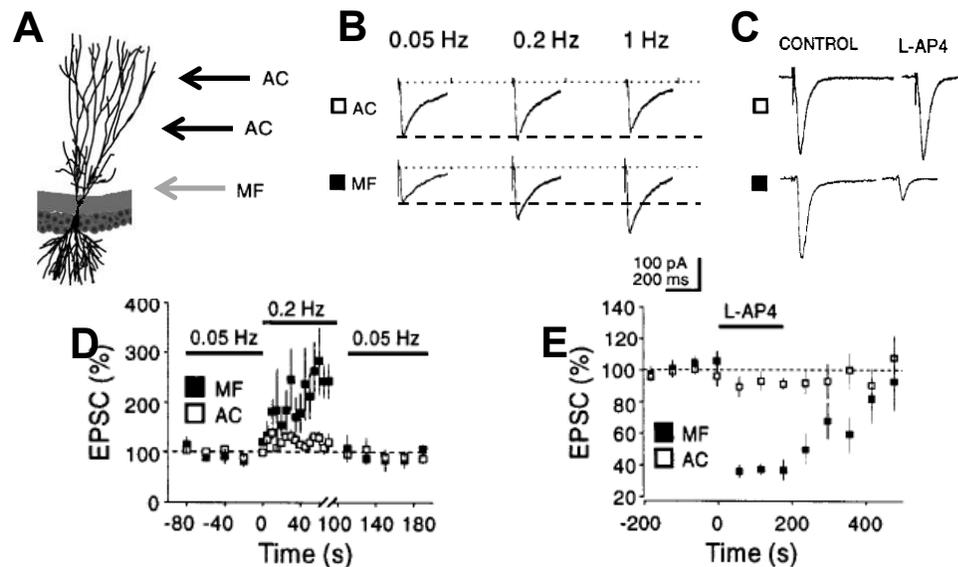


Figura 4. Distinta plasticidad a corto plazo entre las sinapsis de las fibras musgosas y las fibras comisurales. **A.** Esquema de una célula piramidal de CA3 en la capa piramidal, señalando el nivel del árbol dendrítico en donde hacen sinapsis las fibras de asociación comisural (AC) y las fibras musgosas del giro dentado (MF). **B-C.** Corrientes posinapticas al estimular las fibras musgosas y las fibras comisurales a diferentes frecuencias (**B**) y durante la perfusión de L-AP4 (**C**). **D.** Gráfica de grupo que muestra la diferente facilitación por frecuencia en las fibras musgosas y las fibras comisurales. **E.** Gráfica de grupo que muestra la inhibición de las corrientes posinapticas de las fibras musgosas pero no de las fibras comisurales al perfundir un agonista de los mGluR (Figura tomada y modificada de Salin y cols., 1996).

Las corrientes posinápticas excitadoras (EPSCs) de las fibras musgosas son respuestas complejas que tienen un componente mediado por receptores kainato, otro por receptores AMPA y un componente pequeño mediado por receptores NMDA (Jonas y cols., 1993; Castillo y cols., 1997). Estos EPSCs exhiben una marcada facilitación ante incrementos leves en la frecuencia de disparo de las células granulares, con mecanismos dependientes e independientes de la activación de receptores presinápticos de kainato (Schmitz y cols., 2001; Kwon y Castillo, 2008b). Después de una ráfaga de potenciales de acción, la transmisión en las fibras musgosas puede permanecer aumentada por horas (Henze y cols., 2000). Esta potenciación a largo plazo es muy distintiva, ya que posee un componente presináptico independiente de NMDAR y un componente posináptico menor dependiente de activación de NMDAR (Nicoll y Schmitz, 2005; Kwon y Castillo, 2008a). La marcada facilitación por frecuencia de las fibras musgosa es consistente con una baja probabilidad de liberación de neurotransmisión en condiciones basales. En las sinapsis formadas con las células piramidales, se ha reportado una probabilidad de liberación de 0.2 - 0.28, un contenido cuantal de 2 – 21 (Jonas y cols., 1993; Lawrence y cols., 2004), y una conductancia cuantal media de 150 pS que corresponde a cerca de 17 AMPA-R. La liberación de neurotransmisor de las fibras musgosas es modulada de manera compleja por la activación de varias clases de receptores presinápticos. La activación de los receptores de kainato presinápticos a bajas concentraciones facilitan la transmisión, mientras que a altas concentraciones la deprime (Kullmann, 2001; Schmitz y cols., 2001). Los GABA_AR presinápticos presentan también un efecto dual, ya que la activación de los GABA_AR tónicos facilitan la transmisión de las fibras musgosas pero la activación de los GABA_AR fásicos la inhibe (Ruiz y cols., 2003; Trevino y Gutierrez, 2005; Ruiz y cols., 2010). Este mismo efecto lo produce la activación de los GABA_BR presinápticos sobre la liberación de glutamato (Vogt y Nicoll, 1999) y GABA (Gutiérrez 2002, Safiulina y Cherubini 2009).

Una de las características de la transmisión de las fibras musgosas es su sensibilidad a la activación de los mGluR, en contraste con las sinapsis de fibras recurrentes de las células piramidales y de otras vías. Los mGluR presinápticos

del grupo II y del grupo III deprimen marcadamente las respuestas sinápticas de las fibras musgosas (Fig. 4 C y E; Fig. 5 A-D), lo cual ha sido utilizado para comprobar si una respuesta sináptica es producida por la activación de las fibras musgosas. Los mGluR del grupo III en las fibras musgosas se encuentran predominantemente en las zonas activas presinápticas mientras que los mGluR del grupo II se encuentran en porciones preterminales de las fibras musgosas (Shigemoto y cols., 1997). En ratas Wistar la liberación de glutamato se inhibe con la activación mGluR-II pero no con la activación de los mGluR-III, mientras que en cobayos sucede de manera opuesta (Lanthorn y cols., 1984;Manzoni y cols., 1995;Kamiya y cols., 1996).

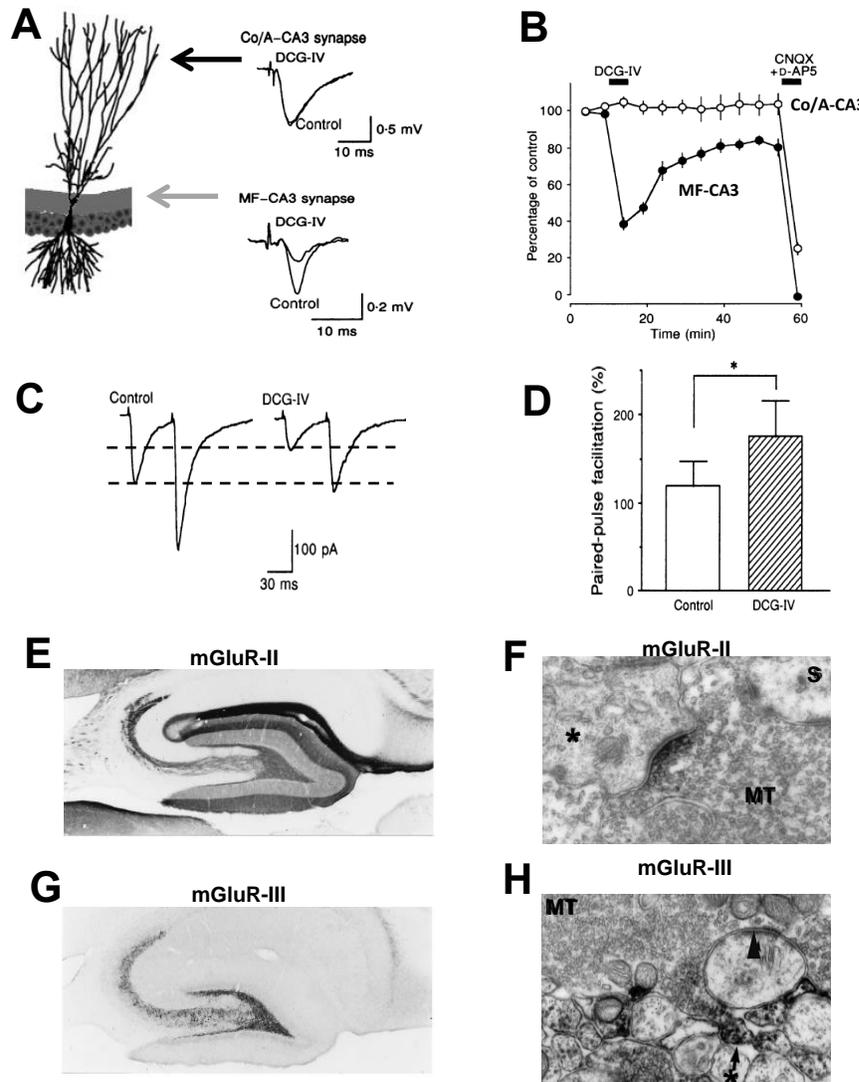


Figura 5. Receptores mGluR II y III en las fibras musgosas. **A-D**, Inhibición presináptica selectiva de los potenciales sinápticos de las fibras musgosas durante la activación de los mGluR-II en rebanadas de ratas. **A**, La aplicación de DCG-IV inhibe marcadamente el potencial de campo sináptico de las fibras musgosas (MF) pero no el de las fibras comisurales (Co/A). **B**, Grafica de grupo que muestra la inhibición del potencial de campo sináptico de las fibras musgosas (MF) pero no el potencial de las fibras comisurales (Co/A). **C**, Facilitación de pulsos pareados en LCRa y durante la perfusión de DCG-IV en la sinapsis de las fibras musgosas. **D**, Porcentaje de facilitación de la respuesta del 2° pulso pareado al perfundir DCG-IV en la sinapsis de las fibras musgosas. **E**, **G**, Distribución de la inmunoreactividad de mGluR2 (**E**) y mGluR7 (**G**) restringida al giro dentado y al tracto de las fibras musgosas en el hipocampo de rata. **F**, **H**, Micrografías electrónicas de botones de fibras musgosas con inmunoreactividad a mGluRs. **F**, Botón de una fibra musgosa con inmunoreactividad a mGluR7 en una sinapsis sobre una espina dendrítica (S) de una célula piramidal y sobre una interneurona (*). **H**, inmunoreactividad de mGluR2/3 (flecha y *) en una fibra musgosa en continuidad con un botón terminal (MT) que hace sinapsis con una espina dendrítica (cabeza de flecha) de una célula piramidal (Figuras tomadas y modificadas de Kamiya y cols., 1996 y de Shigemoto y cols., 1997).

Colocalización y cotransmisión de neurotransmisores en el sistema nervioso

En la primera mitad del siglo XX se conocían únicamente dos tipos de neurotransmisor, la acetilcolina y la noradrenalina. Dale y otros investigadores habían demostrado en el sistema nervioso periférico la existencia de nervios colinérgicos y adrenérgicos, y sus hallazgos generaron el concepto de la identidad química de cada neurona. De acuerdo con esta hipótesis, los diferentes efectos funcionales sobre las células blanco eran atribuidos a la liberación específica de un neurotransmisor por clases de neuronas químicamente diferentes que funcionan como unidades metabólicas. La observación de Dale de que cada neurona es una unidad químico-metabólica promovió la idea de que el neurotransmisor usado en una terminal nerviosa periférica podría ser un candidato plausible en las sinapsis centrales de las colaterales de la misma neurona. Posteriormente la hipótesis de Dale fue promovida a *Principio* por Eccles, planteándose que cualquier clase de neurona opera en todas sus sinapsis con el mismo mecanismo químico de transmisión (Eccles 1957, 1976). Con el tiempo este Principio se desvirtuó, y se estableció la creencia de que **una** neurona libera solo **uno y el mismo** neurotransmisor en todas sus terminales.

En la segunda mitad del siglo XX se descubrieron numerosas moléculas en el sistema nervioso incluyendo aminoácidos como el glutamato, glicina y GABA, monoaminas como la dopamina, histamina y serotonina, y péptidos como la sustancia P, somatostatina, bradicinina y endorfinas (Burnstock 1969, Hebb 1970, Gerschenfeld 1973, Krnjevic 1974, Agranoff 1975, Krieger 1983). Muchas de estas moléculas fueron relacionadas con diferentes tipos de señalización e involucradas en una variedad de funciones. Actualmente se sabe que las moléculas liberadas en las terminales nerviosas tienen diferentes funciones y una expresión diferencial a lo largo del desarrollo. Así, una misma molécula puede tener inicialmente un papel trófico y después una función de señalización rápida, o al inicio del desarrollo ser regulada a la baja para reactivarse en la etapa adulta bajo ciertas condiciones (Gutiérrez y cols. 2003, Represa y Ben Ari 2005, Gómez-Lira y cols. 2005, Hökfelt 2009).

En este contexto más rico y complejo de la comunicación interneuronal, se reportó la primera evidencia de coexistencia de un péptido y un neurotransmisor clásico de molécula pequeña en neuronas de ganglios simpáticos de mamíferos, encontrándose somatostatina en neuronas noradrenergicas (Hökfelt y cols. 1977). Posteriormente se encontraron más casos de colocalización de un neuropeptido con un neurotransmisor clásico (ver revisiones en Schultzberg y cols. 1982, Kupfermann 1991), y actualmente se considera que es muy probable que cada neuropéptido co-exista con un neurotransmisor clásico de algún tipo (Hökfelt 2009).

Por otra parte, las primeras evidencias de coexistencia de neurotransmisores de acción rápida fueron la de ATP con acetilcolina en el órgano eléctrico del Torpedo (Whittaker y cols., 1972) y en los nervios frénicos de rata (Silinsky y Hubbard 1973). Posteriormente se continuaron publicando más trabajos que indicaban la coexistencia de neurotransmisores clásicos en neuronas de invertebrados (Brownstein y cols. 1974; Cottrel, 1976; Boer y cols. 1984) y en neuronas del sistema nervioso periférico de mamíferos (Patterson y cols. 1974, Furshpan y cols. 1976). Aún más, recientemente se ha reportado la existencia de coliberación de dos neurotransmisores de acción rápida en varias neuronas del sistema nervioso central de mamíferos. La primera evidencia se encontró en neuronas retininas de conejos, que coliberaban acetilcolina y GABA (O'Malley y Masland, 1989). Desde entonces, se ha reportado un gran número de neuronas que coexpresan o coliberan neurotransmisores clásicos en todas las regiones del sistema nervioso central, desde la médula espinal hasta la corteza. En la medula espinal se ha encontrado interneuronas locales que coliberan glicina y GABA (Jonas y cols., 1998) y motoneuronas que coliberan acetilcolina y Glutamato (Nishimaru y cols., 2005). En el tallo cerebral se han reportado la existencia de neuronas en el núcleo medial del cuerpo trapezoide que coliberan GABA, glicina y glutamato al inicio del desarrollo (Gillespie y cols., 2005), y de motoneuronas que coliberan GABA y glicina (O'Brien y Berger 1999, Russier y cols. 2002). En la corteza cerebelosa se han observado que células de Golgi coliberan GABA y glicina a las células granulares y células en cepillo (Dugué y cols. 2005). En el núcleo acumbens,

neuronas dopaminérgicas mesolímbicas que coliberan glutamato y producen respuestas excitadoras en sus células postsinápticas (Tecuapetla y cols. 2010). Mientras que en neuronas del núcleo interpeduncular se ha demostrado que las terminales colinérgicas de la habenula coliberan acetilcolina y glutamato (Ren y cols 2011). Para una revisión exhaustiva del tema, véase (Gutiérrez R, Coexistence and Co-release of classical neurotransmitters. 2009)

Coexistencia y cotransmisión de glutamato y GABA en las células granulares del Giro dentado

En la formación hipocámpal, se ha considerado que las células granulares del giro dentado forman sinapsis glutamatérgicas con las interneuronas y células piramidales de la región CA3 (Crawford y Connor, 1973; Acsády y cols., 1998). Así, la activación de las células granulares produce respuestas excitadoras en las células piramidales y en las interneuronas que a su vez producen respuestas inhibitoras disinápticas en las células piramidales, de tal modo que la activación de las células granulares en presencia de fármacos bloqueadores de los receptores de glutamato no produce respuestas excitadoras ni inhibitoras en las células piramidales (Dichter y Spencer, 1969; Miles y Wong, 1987).

Sin embargo este paradigma empezó a cuestionarse cuando Ottersen y Storm-Mathisen describieron la presencia de GABA en el stratum lucidum, y posteriormente Sandler y Smith reportaron la presencia de GABA en las terminales de las fibras musgosas sugiriendo que al menos un componente de los potenciales posinápticos inhibitoras en CA3 tenían su origen en el GABA presente en las fibras musgosas (Ottersen y Storm-Mathisen, 1984; Sandler y Smith, 1991). Posteriormente, se demostró también en las fibras musgosas la presencia de la descarboxilasa de ácido glutámico (GAD₆₇), enzima limitante de la síntesis de GABA, y el RNAm del transportador vesicular de GABA (VGAT) y el propio VGAT tanto en condiciones fisiológicas como en condiciones de hiperexcitabilidad. Lo que es más se observó una regulación transitoria a la alza de estos marcadores del fenotipo GABAérgico después de crisis convulsivas (Schwarzer y Sperk, 1995; Sloviter y cols., 1996; Ramirez y Gutierrez, 2001; Lamas y cols., 2001;

Maqueda y cols., 2003; Safiulina y cols., 2006; Zander y cols., 2010). Se hipotetizó entonces que las células glutamatérgicas al tener la capacidad de sintetizar GABA, era probable que lo utilizaran como neurotransmisor.

Las primeras evidencias electrofisiológicas que apoyaban la hipótesis de coliberación en las fibras musgosas se realizaron con registros intracelulares en rebanadas de hipocampo y demostraron que la estimulación de las células granulares del giro dentado producían respuestas monosinápticas glutamatérgicas y GABAérgicas en las células piramidales de CA3 de rebanadas sometidas a aumentos de excitabilidad *In vitro* o *In vivo* pero no en rebanadas de ratas control, en las que solamente se observaron respuestas monosinápticas glutamatérgicas (Gutiérrez 2000, Gutiérrez y Heinemann 2001). Estas respuestas GABAérgicas fueron transitorias como la expresión de los marcadores del fenotipo GABAérgico observado por técnicas inmunocitoquímicas, puesto que un mes después de la última crisis convulsiva, la estimulación de las células granulares solamente produjo respuestas glutamatérgicas en las células piramidales de CA3 (Gutierrez, 2000; Gutierrez y Heinemann, 2001; Ramírez y Gutiérrez 2001; Gutierrez, 2002; Gómez-Lira y cols. 2005)

Kullmann y colaboradores mostraron la existencia de transmisión GABAérgica monosináptica de las fibras musgosas a la región CA3 en roedores en desarrollo (Walker y cols., 2001). Esto llevo a la hipótesis de que el fenotipo GABAérgico de las células granulares pudiera presentarse de manera fisiológica durante el desarrollo y desaparecer posteriormente. Estudios en nuestro laboratorio mostraron que, en efecto, durante los 6-7 a 21 días del desarrollo postnatal, las células granulares del giro dentado muestran un fenotipo dual GABAérgico/glutamatergico, y la subsecuente estimulación de estas células o de sus axones produce respuestas inhibitoras monosinápticas con las características farmacológicas y fisiológicas de la transmisión de las fibras musgosas (Gutierrez y cols., 2003; Gomez-Lira y cols., 2005). Estos hallazgos han sido confirmados y complementados por otros investigadores, quienes han encontrado que durante la primera semana de desarrollo postnatal el GABA es el principal neurotransmisor

usado por las fibras musgosas en sus blancos de CA3, y que en las membranas de dichos blancos los receptores AMPA y GABA_A colocalizan en aposición a los sitios de liberación de las fibras musgosas (Bergersen y cols., 2003; Safiulina y cols., 2006; Caiati y cols., 2010).

JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En las últimas dos décadas, nuestro laboratorio y otros grupos de investigación han demostrado la presencia de la maquinaria de síntesis, almacenamiento y vesiculación de GABA en las sinapsis de las fibras musgosas en roedores hasta el día 21 de desarrollo posnatal. Lo que es más, en estas condiciones, se ha mostrado que la estimulación de las fibras musgosas produce respuestas inhibitoras monosinápticas con las características farmacológicas y fisiológicas de las fibras musgosas en la región CA3, i.e., una marcada facilitación por frecuencia y una depresión ante la activación de receptores metabotrópicos a glutamato (Gutierrez, 2005; Jaffe y Gutierrez, 2007; Gutiérrez, 2009). No obstante, un problema importante cuando se estudia la transmisión sináptica de las fibras musgosas a las células piramidales de CA3 es la posible contaminación polisináptica que se asocia a la estimulación extracelular del tracto de las fibras musgosas (Henze y cols., 2000; Nicoll y Schmitz, 2005). Lo que es más, la evidencia aportada al momento ha sido obtenida activando con estimulación de campo los somas de las células granulares o sus axones, suponiendo que esta estimulación es selectiva y que las respuestas GABAérgicas observadas son resultado solo de dicha estimulación.

Para demostrar de manera definitiva la coliberación de GABA y glutamato en las terminales de las fibras musgosas, es necesario realizar registros pareados de una célula granular y una célula piramidal conectadas, sin embargo dado que cada célula granular tiene una probabilidad aproximada de 0.0005 de hacer contacto sináptico con una célula piramidal cualquiera (Amaral y cols., 1990), la probabilidad de encontrar en rebanadas de hipocampo una célula granular conectada con una célula piramidal es muy baja. Otra forma de demostrar la coliberación en las terminales de las fibras musgosas es producir una estimulación selectiva en una sola fibra musgosa o en un solo botón gigante, lo cual sin

embargo, se dificulta mucho por la compleja conectividad existente en el giro dentado y en CA3. Para este fin rediseñamos la preparación de célula disociada con botones sinápticos adheridos para estudiar la neurotransmisión de un solo botón sináptico identificado de las fibras musgosas en una sola célula piramidal, aislada de todos los demás elementos de la red neuronal de CA3 (Vorobjev, 1991; Akaike y Moorhouse, 2003; Beltran y cols., 2012).

HIPÓTESIS

Hipótesis de trabajo:

- En ratas en desarrollo, hasta el día 21 posnatal, la sinapsis formada por un botón de una fibra musgosa con una dendrita apical de una célula piramidal de CA3 colibera glutamato y GABA.

- La liberación de glutamato de las fibras musgosas se incrementa al aumentar la frecuencia de estimulación, por lo que se espera que en ratas en desarrollo la liberación de GABA por las fibras musgosas se incremente también al aumentar la frecuencia de estimulación.

- Si se sabe que la liberación de glutamato de las fibras musgosas se deprime al activar los receptores metabotrópicos de glutamato presinápticos, se espera que la liberación de GABA observada en la etapa en desarrollo se inhiba del mismo modo al activar receptores metabotrópicos de glutamato presentes en la presinapsis.

OBJETIVOS

- Obtener del área CA3 de hipocampos de ratas de 15 y 25 días, células piramidales disociadas viables con botones sinápticos adheridos funcionales.
- Marcar selectivamente con reactivos fluorescentes el tracto de las fibras musgosas y sus botones sinápticos en rebanadas de hipocampo de ratas en desarrollo.
- Registrar con el método de fijación de voltaje en la modalidad de célula completa (“patch-clamp”) células piramidales disociadas mecánicamente de la región CA3, y registrar las respuestas sinápticas obtenidas al estimular 1) un solo botón sináptico identificado de una fibra musgosa y 2) un solo botón proveniente de una interneurona.
- Caracterizar fisiológica y farmacológicamente en células piramidales disociadas del área CA3 del hipocampo de ratas de 15 y 25 días, las respuestas sinápticas obtenidas al estimular un solo botón sináptico marcado como proveniente de las fibras musgosas y compararlo con las respuestas sinápticas de un botón de una interneurona.

MATERIAL Y METODOS

Se aislaron mecánicamente células piramidales de CA3 con botones sinápticos de las fibras musgosas adheridos a regiones proximales de la dendrita apical. Esto se realizó después del marcaje selectivo de las fibras musgosas, con el objetivo de poder estimular sus botones identificados y caracterizar funcionalmente las respuestas sinápticas obtenidas. La disociación se realizó con un método mecánico y libre de enzimas (Akaike y Moorehouse 2003) y el registro se realizó con el método de fijación de membranas (*patch-clamp*). Aún más, en la misma célula se registraron también las respuestas producidas al estimular botones sinápticos provenientes de interneuronas y se compararon ambos tipos de respuestas.

Animales

Se utilizaron ratas de la cepa Wistar de 14 a 16 días de edad. Las ratas fueron anestesiadas con una inyección intraperitoneal de pentobarbital ($50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) y decapitadas. El cerebro fue rápidamente removido (~1 min.) y sumergido en una solución de corte y almacenamiento con alta concentración de sacarosa, a $\sim 4^\circ \text{ C}$, constantemente oxigenada (95% O_2 -5% CO_2). Esta solución de corte/almacenamiento con alta concentración de sacarosa contenía la siguiente composición (en mM): NaCl 87, NaHCO_3 25, glucosa 25, sacarosa 75, KCl 2.5, NaH_2PO_4 1.25, MgCl_2 4, CaCl_2 0.5 (Bischofberger y cols., 2006). De cada encéfalo se obtuvieron rebanadas horizontales de hipocampo-corteza entorrinal de $380 \mu\text{m}$ de espesor con un vibratomo (Leica VT1200) mientras se mantenía el cerebro sumergido en la solución de corte/almacenamiento a $\sim 4^\circ \text{ C}$ constantemente oxigenado. Las rebanadas fueron mantenidas en solución de corte/almacenamiento oxigenado a temperatura ambiente ($\sim 20^\circ \text{ C}$) hasta su utilización en la disociación mecánica.

Marcaje selectivo de los botones gigantes de las fibras musgosas

Los botones gigantes de las fibras musgosas se identificaron con el uso de marcadores fluorescentes por medio de dos métodos. Debido a que las fibras musgosas tienen un alto contenido en Zn^{2+} (Howell y cols., 1984) su exposición a Zinpyr-1 (1 μ M; Mellitech, Grenoble, Francia) nos permitió observarlas bajo exposición de luz con longitud de onda de 450-490 nm y filtros pasa-altos de 515 nm, ya que este compuesto fluorescente se une selectivamente al Zn^{2+} . Las rebanadas de hipocampo se mantuvieron en incubación 5 minutos previos y durante la disociación mecánica en solución externa con el fluoróforo.

En el segundo método, se depositó un microcristal del marcador fluorescente dextranamina rodaminada (Molecular Probes, Eugene, OR) en la capa granular del giro dentado (Boulton y cols., 1992). La dextranamina rodaminada se capta por los somas y es transportada anterógradamente a lo largo del trayecto de las fibras musgosas. Durante su transporte, las rebanadas se mantenían en una cámara de interfase líquido-aire por 3 h, constantemente perfundidas con la solución de corte/almacenamiento a temperatura ambiente ($\sim 20^\circ$ C).

Disociación de células piramidales

Para obtener células piramidales aisladas con botones sinápticos funcionales adheridos a las dendritas proximales, se llevó a cabo una disociación mecánica libre del uso de enzimas en el área CA3. Las rebanadas fueron colocadas sobre cubreobjetos tratados con poly-l-lisina en una cámara de registro, o colocadas directamente sobre cajas de cultivo (35 x 10 mm, Falcon, Becton-Dickinson) con solución externa. Para mantener las rebanadas fijas durante la disociación mecánica, se colocó un alambre de plata en forma de C con una malla de nylon sobre la rebanada. Las células fueron disociadas bajo visión estereoscópica, colocando y haciendo vibrar la punta roma de una micropipeta de borosilicato sobre la superficie de la rebanada en el área CA3 del hipocampo. La vibración se llevó a cabo con un dispositivo electromecánico el cual contenía un cabezal en el que se montaba la micropipeta y llevaba a cabo una oscilación lateral de su punta. Para obtener un extremo roma en las pipetas se usaron capilares de borosilicato (1/0.58 mm DE/DI; WPI Inc., Sarasota, Fla) que fueron estirados y pulidos con

calor en su punta para obtener un diámetro aproximado de 300 μm . Durante la disociación la punta de la pipeta se colocó sobre el *Stratum pyramidale* y se hizo vibrar de manera horizontal sobre la superficie de la rebanada, de manera perpendicular al *Stratum pyramidale*, con una amplitud suficiente para abarcar del *Stratum radiatum* al *Stratum alveus*, por 5 min a 30 – 40 Hz. Después del proceso de disociación mecánica, la rebanada utilizada fue retirada y el sobrenadante se mantuvo en reposo por 15 minutos para permitir la sedimentación y adhesión de las células piramidales a la superficie subyacente.

Registros electrofisiológicos

Las células disociadas fueron colocadas en un microscopio con epifluorescencia (Eclipse E600FN; Nikon), y los botones de las fibras musgosas se visualizaron usando aumentos 10X y 40X con los filtros adecuados (excitación de 450-490 nm y pasa altos de 515 nm para Zynpir-1; excitación 510-560 nm y pasa altos de 590 para dextranamina rodaminada). Antes de iniciar la búsqueda de neuronas para registro con botones adheridos, se perfundió solución externa en el cámara de registro durante 10 minutos a 0.2 – 0.3 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ para eliminar el exceso de marcador fluorescente. La solución externa contenía la siguiente composición (en mM): NaCl 150, KCl 3, MgCl_2 1, CaCl_2 2, HEPES 10 y glucosa 10, con pH ajustado a 7.40 con Tris-base (Jang y cols., 2006).

Los registros electrofisiológicos se realizaron con micropipetas de borosilicato con resistencia de 4-6 mM (Estirador Flaming-Brown P-97; Sutter Instrument Company, Novato, CA) llenas con solución intracelular para registro en fijación de voltaje o fijación de corriente. Para el primer caso la solución contenía (en mM): CsF 65, CsMeSO_4 70, CsCl 6, TEA-Cl 6, HEPES 10, EGTA 2, Mg-ATP 4, con pH ajustado a 7.20 con KOH; y para fijación de corriente la solución intracelular contenía (en mM): Gluconato-K 133, KCl 7, NaCl 1, MgCl_2 1.5, Mg-ATP 4, Na-GTP 0.5, EGTA 0.5, HEPES 10, con pH ajustado a 7.20 con KOH.

Las señales obtenidas fueron amplificadas con un amplificador Multiclamp 700B (Molecular Devices, Palo Alto, CA), muestreadas y digitalizadas a 10 KHz y filtradas a 5 KHz (Digidata 1440A; Molecular Devices). En los experimentos de fijación de corriente las células fueron fijadas a -90 mV, tal que las corrientes

mediadas por los receptores GABA y glutamato fueron corrientes entrantes. Se utilizaron pulsos cuadrados hiperpolarizantes (-5 mV, 25 ms) para monitorizar la resistencia de acceso durante los experimentos. La célula registrada era desechada si la resistencia de acceso se modificaba más del 15%.

Para producir respuestas sinápticas en las células registradas se utilizaron micropipetas theta de borosilicato (2/1.4 mm DE/DI; Hilgenberg GmbH, Maisfeld, Alemania) llenas con solución externa, previamente estiradas y pulidas con calor en su punta (Estirador Flaming-Brown P-97) para obtener un diámetro aproximado de 1 μm . La punta de cada micropipeta theta fue colocada adyacente al botón sináptico de interés utilizando un micromanipulador piezoeléctrico (Burleigh PCS-500). Para estimular un botón sináptico, se aplicaron pulsos cuadrados de corriente (50 μs , 1-15 μA) cada 20 segundos con un estimulador (S48; Grass Instruments, West Warwick, RI) a través de una unidad de aislamiento (PSIU6, Grass Instruments). Los botones provenientes de las fibras musgosas fueron identificados por su posición en la dendrita apical y por su marca fluorescente. Para estimular botones provenientes de interneuronas se estimularon botones no marcados localizados en el soma o en las dendritas basales. Para determinar el área efectiva de estimulación, la pipeta theta fue movida distalmente del sitio de estimulación inicial en pasos de 0.2 – 0.3 μm , hasta que la tasa de fallo fue 100%. Se observó que a distancias de \sim 0.5 μm o más, desaparecían por completo las respuestas sinápticas evocadas (Fig. 9A-C). La latencia de las respuestas sinápticas fue de 0.97 ± 0.03 ms (n=6) al estimular los botones de las fibras musgosas y de 1.0 ± 0.04 ms (n=6) a la estimulación de los botones de interneuronas fue (Fig. 9D, F). Las corrientes sinápticas producidas tuvieron un tiempo de ascenso (10-90 %) muy constante, esto es, de 1.2 ± 0.2 ms (n=6) al estimular los botones de las fibras musgosas y de 3.0 ± 0.3 ms (n=5) al estimular los botones de las interneuronas. La medición de estos parámetros se realizó de manera rutinaria en cada experimento y las células que no cumplieran con todas las características mencionadas fueron desechadas.

Farmacología

Una vez obtenido el registro estable de una célula piramidal con respuestas sinápticas evocadas al estimular selectivamente los botones marcados provenientes de las fibras musgosas, se realizaron registros electrofisiológicos en las siguientes condiciones: 1) condiciones control con solución externa; 2) durante la perfusión DCG-IV ([2S,2'R,3'R]-2-[2',3'-dicarboxiciclopropil] glicina; 1 μ M; Tocris Cookson) agonista de los mGluR-II; 3) en presencia de los antagonistas de los receptores NMDA (ácido (DL)-2-amino-5-fosfonoaléxico; APV, 30 μ M, Tocris Cookson) y AMPA/KA (6-nitro-7-sulfamoyl-benzo(f)quinoxalina-2,3-diona; NBQX, 10 μ M; Tocris Cookson); 4) en presencia de los antagonistas de los receptores NMDA y AMPA/KA y del agonista de los mGluR-III (ácido L-(+)-2-amino-4-fosfonobutirico; L-AP4; 10 μ M; Tocris Cookson); y 5) durante la perfusión de los antagonistas de los receptores de glutamato (NBQX + APV) y de Bicuculina, un antagonista de los GABA_AR (20 μ M; Sigma). De igual forma se llevaron a cabo registros de la actividad sináptica en la misma célula y con las mismas condiciones mencionadas, pero estimulando los botones provenientes de interneuronas.

Análisis de datos

Las señales obtenidas fueron procesadas con el programa Clampfit 10 (Molecular Devices). Los parámetros medidos en las corrientes sinápticas incluyeron latencia, amplitud, tiempo de ascenso (10-90%) y tiempo de decaimiento (10-90%). La latencia de las respuestas sinápticas se midió del inicio del artefacto de estimulación al inicio de la fase de ascenso de la corriente sináptica. Todas las variables fueron medidas con funciones de análisis del programa Clampfit 10. Los valores obtenidos se expresan como la media \pm error estándar. Las medias fueron comparadas con la prueba t de Student.

RESULTADOS

Obtención de células piramidales disociadas de CA3 con botones funcionales de las fibras musgosas marcados con dextranamina o Zinpyr

Se marcó selectivamente el tracto de las fibras musgosas en rebanadas de hipocampo-corteza entorrinal de ratas en desarrollo (14 - 16 d.) por dos métodos: 1) Exposición de la rebanada al marcador selectivo de Zn^{++} , Zinpyr-1, 2) introducción de un cristal de dextranamina-rodaminada en la capa granular del giro dentado, tras lo cual se permitió su transporte a lo largo del trayecto de las fibras musgosas (Fig. 6). Una vez marcadas las fibras musgosas, las células de la región CA3 se disociaron mecánicamente y se obtuvieron interneuronas y células piramidales aisladas con su dendrita apical proximal conteniendo botones fluorescentes provenientes de las fibras musgosas (Fig. 7). Ambos tipos celulares fueron identificados por su tamaño, forma y patrón de disparo (Fig. 7 B-E). El registro electrofisiológico mostró que las células piramidales tuvieron una resistencia de entrada de $1.7 \pm 0.5 \text{ G}\Omega$, potenciales de mantenimiento estables por 60 – 70 min, 2 a 3 potenciales o corrientes de acción ante la estimulación con pulsos rectangulares supraumbrales (Fig. 7 B,D) y, finalmente, actividad sináptica espontánea (Fig. 8B).

Registro en células piramidales de CA3 de las respuestas sinápticas al estimular un solo botón de las fibras musgosas

Para producir respuestas sinápticas en las células piramidales, se estimuló con una micropipeta theta los botones fluorescentes de las fibras musgosas en la dendrita apical y los botones no marcados provenientes de interneuronas localizados en el soma o en las dendritas basales (Figs. 8A, 9A). Las respuestas sinápticas provocadas cuando se estimularon los botones gigantes de las fibras musgosas tuvieron una naturaleza todo o nada ante una estimulación

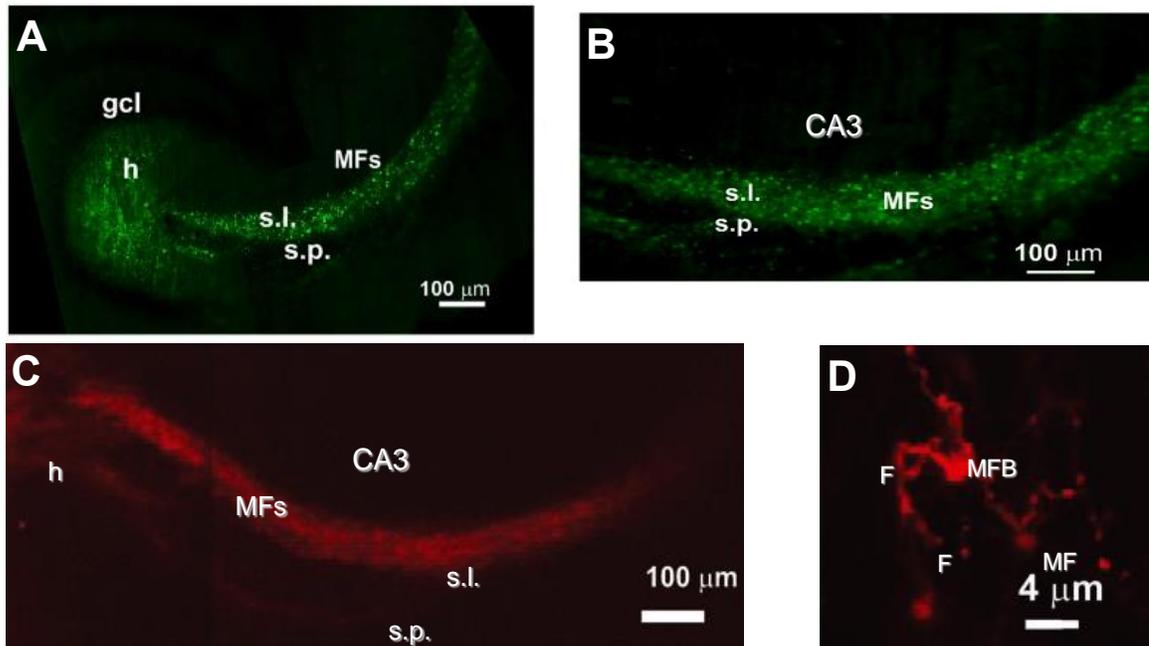


Figura 6. Marca selectiva de las fibras musgosas con Zinpyr y Rodamina. **A**, Marca con Zinpyr-1 de las fibras musgosas (MFs) en la región del hilus (h) y de CA3 donde discurren en el stratum lucidum (s.l.). **B**, Tracto de las fibras musgosas en la región CA3 donde se observan algunos botones gigantes (s.p., stratum pirarmidal). **C**, Marca con dextranamina rodaminada de las fibras musgosas (MFs) en el stratum lucidum (s.l.) de CA3. **D**, Botón gigante de fibra musgosa con su axón (MF) y extensiones filopoidales (F) en la región CA3.

umbral (Fig 8 C-D), con un porcentaje de fallo de $59.8 \pm 2 \%$ ($n=6$) y de $47.3 \pm 5 \%$ ($n=6$) cuando se estimularon los botones de interneuronas (Fig 9D,E). Estos valores coinciden con los reportados en estas sinapsis con esta preparación (Akaike y cols., 2002; Yamamoto y cols., 2010; Shin y cols., 2011). Para determinar el área efectiva de estimulación y descartar que no se estuvieran estimulando dos botones unidos, la pipeta theta fue alejada del sitio de estimulación inicial en pasos de $0.2 - 0.3 \mu\text{m}$, hasta que la tasa de fallo fuera del 100%. Se observó que a distancias mayores de $\sim 0.5 \mu\text{m}$ las respuestas sinápticas desaparecían por completo (Fig. 9A-C). La latencia de las respuestas sinápticas fue de $0.97 \pm 0.03 \text{ ms}$ ($n=6$) al estimular los botones de las fibras musgosas (Fig. 9F) y de $1.0 \pm 0.04 \text{ ms}$ ($n=6$) a la estimulación de los botones de interneuronas. Las corrientes sinápticas producidas tuvieron un tiempo de ascenso (10-90%) de $1.2 \pm 0.2 \text{ ms}$ ($n=6$) al estimular los botones de las fibras musgosas (Fig. 9G) y de $3.0 \pm 0.3 \text{ ms}$ ($n=5$) al estimular los botones de las interneuronas. En conjunto estos datos corroboran que las corrientes sinápticas registradas fueron producidas por la estimulación de un solo botón sináptico.

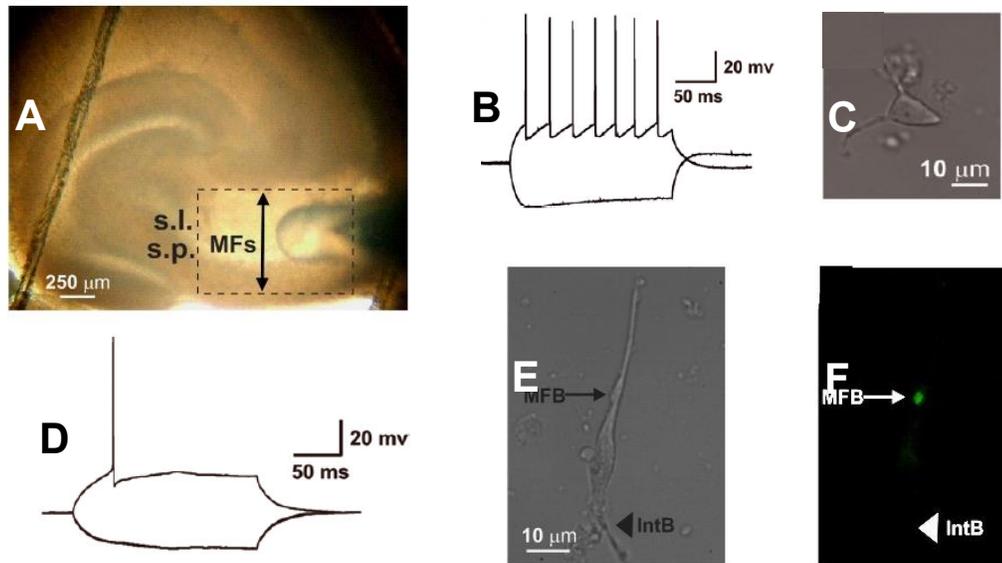


Figura 7. Células piramidales funcionales disociadas de CA3 con botones de las fibras musgosas marcados. **A**, Rebanada de hipocampo en la que se muestra el área de disociación en CA3, la punta roma de una micropipeta con lo que se lleva acabo y el sentido, trayecto y amplitud de la disociación (flecha doble; s.l., stratum lucidum; s.p., stratum piramidal; MFs fibras musgosas). **B**, Patrón de disparo de una interneurona disociada mecánicamente de CA3 (**C**). **D**, Patrón de disparo de una célula piramidal disociada mecánicamente de CA3 (**E**). **F**, Los botones de las fibras musgosas (MFB) se identificaron como marcas fluorescentes en la dendrita apical de las células piramidales disociadas. La cabeza de flecha indica un probable botón proveniente de una interneurona (IntB).

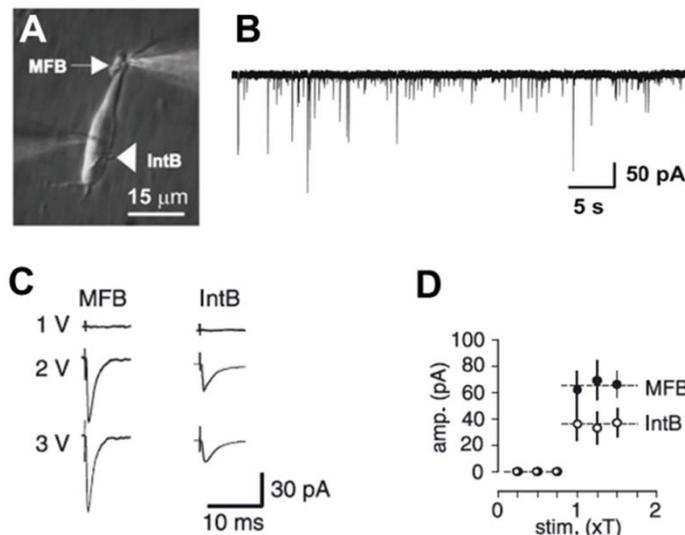


Figura 8. Respuestas sinápticas espontáneas y evocadas al estimular un botón sináptico. **A**, Célula piramidal con pipeta de estimulación posicionada sobre un botón de fibra musgosa (MFB) en su dendrita apical. **B**, Registro de actividad sináptica espontánea de una célula piramidal disociada. **C**, Corrientes sinápticas de naturaleza todo-o-nada y grafica de grupo de dichas respuestas (**D**) ante una estimulación periumbral de un botón de fibra musgosa (MFB) o de interneurona (IntB).

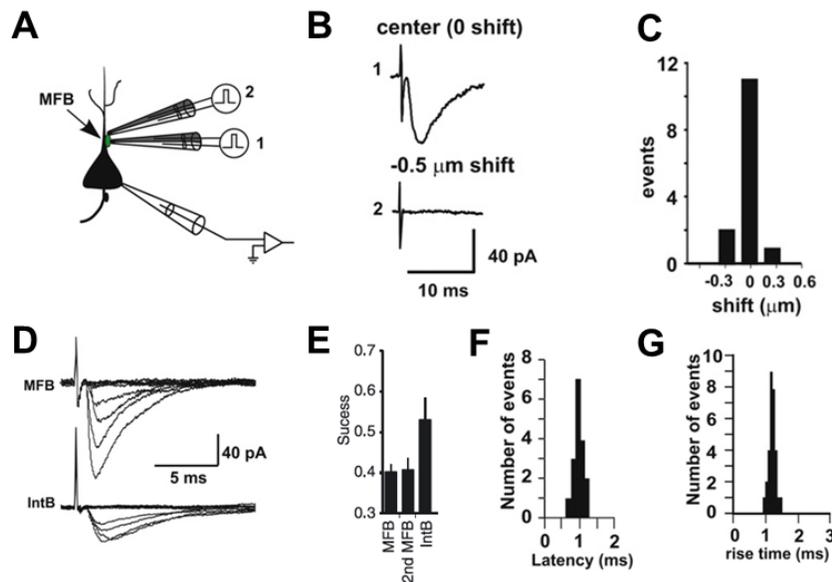


Figura 9. Respuestas sinápticas evocadas al estimular un solo botón sináptico. **A**, Esquema de una célula piramidal con un botón de fibra musgosa (MFB) en su dendrita apical y arreglo de electrodo de estimulación y registro. **B-C**, Corriente sináptica evocada al colocar la pipeta de estimulación sobre un botón de fibra musgosa y desaparición de la respuesta ante discretos desplazamientos en la posición de la pipeta. **D**, Corrientes sinápticas de amplitud variable pero con latencia y tiempo de ascenso constantes, evocadas al estimular un MFB y un botón de interneurona (IntB). **E-G**, Grafica de grupo de la probidad de éxito (**E**) y graficas de latencia (**F**) y tiempo de ascenso (**G**) de las corrientes sinápticas evocadas al estimular un MFB.

Caracterización funcional de las respuestas sinápticas evocadas por la estimulación de un solo botón de una fibra musgosa

Uno de los rasgos distintivos de las respuestas sinápticas por la activación de las fibras musgosas es su marcada facilitación por frecuencia (Salin y cols., 1996; Schmitz y cols., 2001; Nicoll y Schmitz, 2005; Fig. 4). Para comprobar la presencia de esta facilitación en nuestra preparación, se incrementó la frecuencia de estimulación en los botones de las fibras musgosas de 0.05 Hz a 1 Hz. Este incremento produjo una potenciación de la respuesta de $260.1 \pm 45.6\%$ ($p < 0.01$; $n=5$; Fig. 10 A, B), que fue acompañada por un decremento en el porcentaje de fallas a $34.1 \pm 0.9\%$ de la respuesta inicial ($p < 0.05$; $n=5$; Fig. 10 C). En cambio, el incremento de la frecuencia de estimulación a 1 Hz a los botones de interneuronas produjo una depresión de las respuestas de $59.4 \pm 12.1\%$ ($n=6$; Fig. 10 A, B) con un incremento en el porcentaje de fallas a $58.2 \pm 4.3\%$ ($p < 0.05$; $n=6$; Fig. 10 C).

Otra característica de la transmisión de las fibras musgosas es que la activación de los mGluR presentes en sus terminales, deprime la liberación de neurotransmisor (Lanthorn y cols., 1984; Manzoni y cols., 1995; Kamiya y cols., 1996, Fig. 5). Para confirmar esta modulación de las respuestas al activar los mGluR se perfundió DCG-IV, un agonista de los mGluR-II. La perfusión de este fármaco durante la estimulación de los botones de las fibras musgosas produjo una depresión de 54.2 ± 8.5 % ($p < 0.05$; $n=5$) en la amplitud de las respuestas, un incremento en el porcentaje de fallas de 77.3 ± 1.1 % ($p < 0.05$; $n=5$) y un incremento en el cociente de las respuestas al aplicar un protocolo de pulsos pareados (1.7 ± 0.2 a 2.1 ± 0.3 ; $p < 0.05$; $n=5$, Fig. 10 D-F). La presencia de DCG-IV durante la estimulación de los botones provenientes de interneuronas no modificó la amplitud inicial, el porcentaje de fallas ni el cociente de los pulsos pareados (Fig. 10 D-F; $n=5$). En conjunto, estos resultados confirman que las respuestas producidas por la estimulación de los botones marcados presentan las mismas características plásticas y farmacológicas observadas en los estudios sobre la transmisión sináptica de las fibras musgosas (Jaffe y Gutiérrez, 2007).

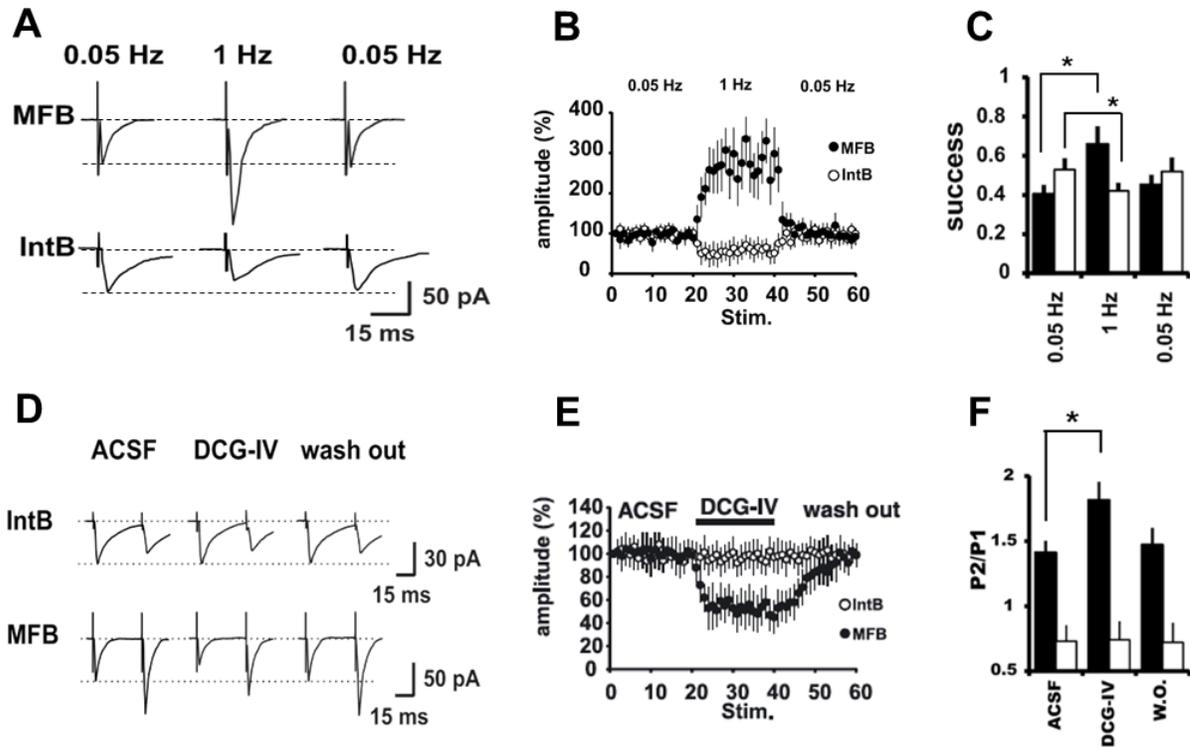


Figura 10. Características funcionales de las respuestas sinápticas evocadas de un botón de una fibra musgosa. **A**, Potenciación de las respuestas sinápticas de un botón de fibra musgosa (MFB) y depresión de las respuestas provenientes de interneuronas (IntB) al incrementar la frecuencia de estimulación de 0.05 Hz a 1 Hz. **B**, Grafica de grupo de la potenciación de las respuestas sinápticas de los botones de las fibras musgosas y de la depresión de las respuestas de las interneuronas. **C**, Probabilidad de éxito de las respuestas sinápticas de los botones de las fibras musgosas y de las interneuronas al incrementar la frecuencia de estimulación (* $p < 0.05$). **D**, Corrientes sinápticas evocadas por la estimulación de un botón de fibra musgosa (MFB) y de un botón de interneurona (IntB) en líquido cefalorraquídeo artificial (ACSF) control y durante la perfusión de DCG-IV. **E**, Grafica de grupo que muestra la depresión de las respuestas sinápticas provenientes de las fibras musgosas, pero no la de los botones de interneuronas durante la perfusión de DCG-IV. **F**, Razón de pulsos pareados de las respuestas sinápticas provenientes de los botones sinápticos de las fibras musgosas (barras negras) y de interneuronas (barras blancas) en líquido cefalorraquídeo artificial (ACSF) control y durante la perfusión de DCG-IV (* $p < 0.05$).

Disección farmacológica y caracterización de la cinética de las respuestas sinápticas a la estimulación de los botones de las fibras musgosas

Al estimular los botones marcados de las fibras musgosas durante la perfusión de fármacos antagonistas de los receptores ionotrópicos de glutamato (iGluR), NBQX y APV, se observó que en 4 de 14 casos se producía una depresión del

98.5±1.3% ($p < 0.01$; Fig. 11 A) de las respuestas, en 7 de 14 una depresión parcial de $56.3 \pm 9.3 \%$ ($p < 0.05$; Fig. 11 C) y en 3 de 14 no se observó ningún efecto estadísticamente significativo ($1.2 \pm 3.4 \%$, $p < 0.39$; Fig. 11 B). En los casos en los que se observó una depresión parcial al perfundir NBQX+APV, la amplitud de las corrientes sinápticas provocadas durante la perfusión de LCRA control fue de 102.8 ± 24.4 pA (excluyendo las fallas, $n=6$) mientras que la amplitud del componente residual insensible a los antagonistas de los iGluR fue de 24.9 ± 15.2 pA. En los casos en los que las corrientes sinápticas fueron del todo resistentes a los antagonistas de los iGluR, las respuestas sinápticas tuvieron una amplitud de 54.2 ± 12.4 pA y fueron bloqueadas completamente con la perfusión de bicuculina, un antagonista de los GABA_AR, lo que indicaba que estas corrientes eran mediadas por la activación de estos receptores. Lo anterior prueba que en ratas con dos semanas de edad, algunos botones de las fibras musgosas liberaban *glutamato* y *GABA*, mientras que otros botones liberan *solo glutamato* ó *solo GABA* (Fig. 11 E). Por su parte, la estimulación de los botones provenientes de interneuronas presentaron respuestas insensibles a la perfusión de NBQX + APV, pero fueron bloqueadas con la perfusión del antagonista de los GABA_AR (Fig. 11 D). Es importante mencionar que los valores en el umbral de intensidad de estimulación ($50 \mu\text{s}$, $1 \mu\text{A}$), la naturaleza todo o nada de la respuesta, el área efectiva de estimulación (0.53 ± 0.11 vs $0.52 \pm 0.08 \mu\text{m}$; $n = 6$) y la latencia de las respuestas sinápticas (0.97 ± 0.03 vs 0.96 ± 0.02 ms; $n = 6$) no cambiaron durante la aplicación de los antagonistas de los iGluR en comparación a las condiciones control con LCRA (Fig. 12 A-F). Esto indica que en ambas condiciones se estimuló un solo botón sináptico

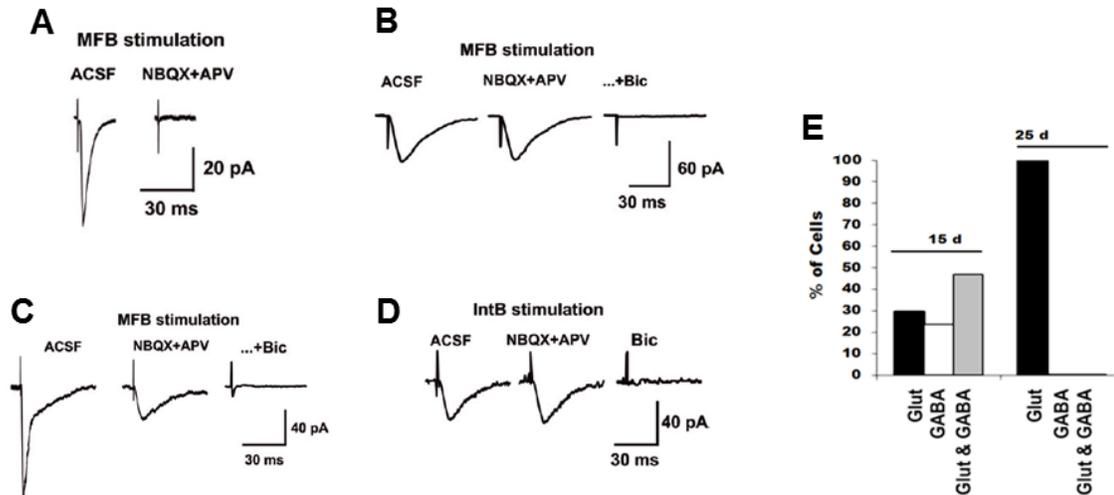


Figura 11. La estimulación de los botones de las fibras musgosas provoca respuestas sinápticas mixtas. **A**, Las corrientes sinápticas evocadas por la estimulación de un botón de fibra musgosa (MFB) de un roedor de 15 días de edad fueron en algunos casos bloqueadas por los antagonistas de los receptores de los iGluR (NBQX+APV). **B**, Algunas otras corrientes sinápticas evocadas por la estimulación de un MFB no se modificaron durante la perfusión de NBQX+APV pero fueron bloqueadas por completo al aplicar el antagonista de los GABA_AR (Bic). **C**, En otros casos, las corrientes evocadas por la estimulación de un MFB fueron bloqueadas parcialmente por los antagonistas de los iGluR y la corriente remanente fue eliminada al perfundir Bicuculina (Bic). **D**, En todos los casos las respuestas sinápticas de los botones de las interneuronas (IntB) no se modificaron durante la perfusión de NBQx+APV y fueron bloqueados por completo al aplicar bicuculina. **E**, Resumen de porcentajes de las respuestas sinápticas evocadas en roedores de 15 y 25 días.

La relación corriente-voltaje (I/V) de las corrientes sinápticas producidas al estimular los botones de las fibras musgosas en LCRa mostró un potencial de inversión de -27 mV, observándose incluso, a potenciales cercanos a -30 mV, respuestas sinápticas compuestas con un componente entrante y otro saliente. Durante el bloqueo de los iGluR este potencial de inversión se desplazó a -60 mV, que corresponde al valor del potencial de inversión calculado para Cl⁻ (-63 mV) en nuestra preparación (Fig. 13 A). En contraste las corrientes sinápticas evocadas por la estimulación de los botones de interneuronas presentaron un potencial de inversión de -64 mV en condiciones control, el cual no se modificó durante la perfusión de los iGluR (Fig. 13 B). Lo anterior confirma que las respuestas sinápticas evocadas por la estimulación de los botones de las fibras musgosas eran mediadas por glutamato y GABA, mientras que las respuestas a la estimulación de los botones de interneuronas eran de naturaleza solo GABAérgica.

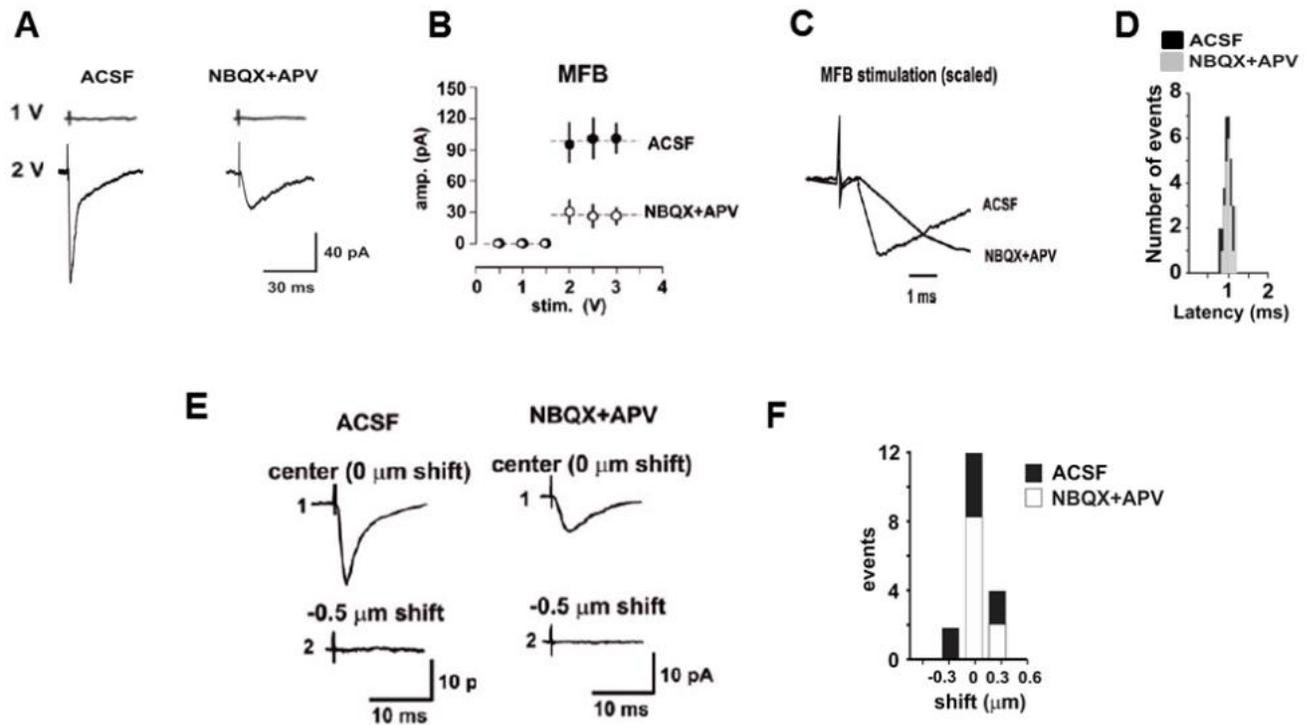


Figura 12. Las respuestas sinápticas mixtas provienen de un solo botón de las fibras musgosas. **A-B**, Corrientes sinápticas evocadas (**A**) por la estimulación de un botón de fibra musgosa (MFB) y gráfica de grupo (**B**) donde se observa que estas respuestas tienen el mismo umbral en condiciones control (ACSF) y durante la perfusión de NBQX+APV. **C**, Las corrientes sinápticas evocadas por la estimulación de un MFB tuvieron la misma latencia en ACSF y durante el bloqueo de los iGluR. **D**, Histograma de frecuencia de las respuestas sinápticas evocadas por la estimulación de un MFB en ACSF y durante la perfusión de NBQX+APV. **E**, La distancia de desplazamiento de la pipeta de estimulación del centro del botón estimulado, a la cual no se evocaron respuestas fue la misma en condiciones control y durante el bloqueo de los iGluR. **F**, Histograma de eventos que muestra que en ambas condiciones (ACSF vs NBQX+APV) desplazamientos de más de 0.3 μm evitaron que se evocaran respuestas sinápticas.

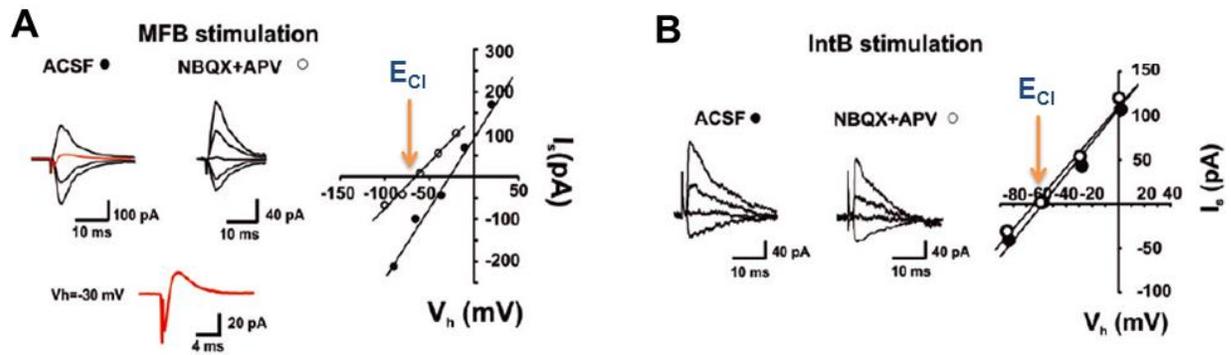


Figura 13. Potenciales de inversión de las respuestas sinápticas evocadas al estimular los botones de las fibras musgosas y los botones provenientes de interneuronas. **A**, Relación I-V y corrientes sinápticas evocadas por la estimulación de un botón de fibra musgosa (MFB). Obsérvese el cambio de polaridad a un potencial de ~ -30 mV en condiciones control (ACSF) en donde incluso se observa una corriente bifásica (trazo rojo) con un componente entrante y otro saliente, mientras que durante la perfusión de los antagonistas de los receptores de los iGluR (NBQX+APV) el potencial de inversión es de ~ -60 mV (Flecha roja: $E_{Cl} = -63$ mV). **B**, Relación I-V y corrientes sinápticas evocadas por la estimulación de un botón de interneurona (IntB). Las corrientes sinápticas evocadas por la estimulación de un IntB invierten su polaridad a -64 mV tanto en condiciones control (ACSF) como durante la perfusión de NBQX+APV.

Debido a que la estimulación de terminales de fibras musgosas produce liberación de glutamato y GABA que activan simultáneamente a ambos tipos de receptores, las corrientes sinápticas podían tener diferentes cinéticas de ascenso y descenso. De las corrientes evocadas, se encontraron (1) corrientes con un tiempo de ascenso y constante de decaimiento (τ) rápidos (1.2 ms y 8.4 ms respectivamente, $n=6$), (2) corrientes con un tiempo de ascenso rápido y un descenso con una τ rápida (6.9 ± 2 ms; $n=6$) y otra τ lenta (29.7 ± 3.7 ms; $n=6$) y finalmente (3) corrientes con un tiempo de ascenso y τ lentos (3.4 ± 0.4 ms y 34.6 ± 4.1 ms respectivamente, $n=6$; Fig. A, E-G). Así, estas cinéticas correspondieron a (1) las respuestas mediadas por glutamato, (2) las respuestas mediadas por glutamato y GABA y (3) las respuestas mediadas solo por GABA. En condiciones control las respuestas rápidas glutamatergicas constituyeron el $38.5 \pm 4.2\%$ de las respuestas sinápticas evocadas, las respuestas lentas GABAérgicas el $33.8 \pm 4.1\%$ y las respuestas mixtas el $27.5 \pm 4.7\%$ (Fig. 14 E). Por su parte las corrientes sinápticas evocadas por la activación de los botones de interneuronas presentaron siempre cinéticas lentas en su tiempo de ascenso y τ (Fig. 14 C, F-G), correspondientes a corrientes

GABAérgicas. Más aún, durante el bloqueo de los iGluR, las corrientes sinápticas producidas por activación de los botones de las fibras musgosas tuvieron solo una τ lenta (32.5 ± 5.7 ms; $n=6$; Fig. 14 B) de cinética similar al componente lento de las respuestas mixtas en condiciones control y a la τ de las corrientes sinápticas de los botones de interneuronas, por el contrario el bloqueo de los GABA_AR aisló corrientes sinápticas con una τ rápida, correspondientes a corrientes glutamatérgicas (Fig. 14 B). Es importante mencionar que en células piramidales disociadas del área CA3 de roedores de 23-25 días, la estimulación de los botones de las fibras musgosas generó, en todos los casos, corrientes sinápticas con tiempos de ascenso y constantes de decaimiento rápidos (1.8 ± 0.2 ms y 6.7 ± 0.4 ms respectivamente) que aumentaron su amplitud al aumentar la frecuencia de estimulación (1 Hz), se inhibieron al perfundir un agonista de los mGluR-II (DCG-IV) y se bloquearon por completo durante la perfusión de los antagonistas de los iGluR ($n=6$; Fig. 14 D, F), mientras que la estimulación de los botones de interneuronas generó en todas las células corrientes con τ lentas (35.1 ± 2.4 ms), que no se modificaron en presencia de DCG-IV ni al aumentar la frecuencia de estimulación y se bloquearon por completo en presencia de bicuculina ($n=6$).

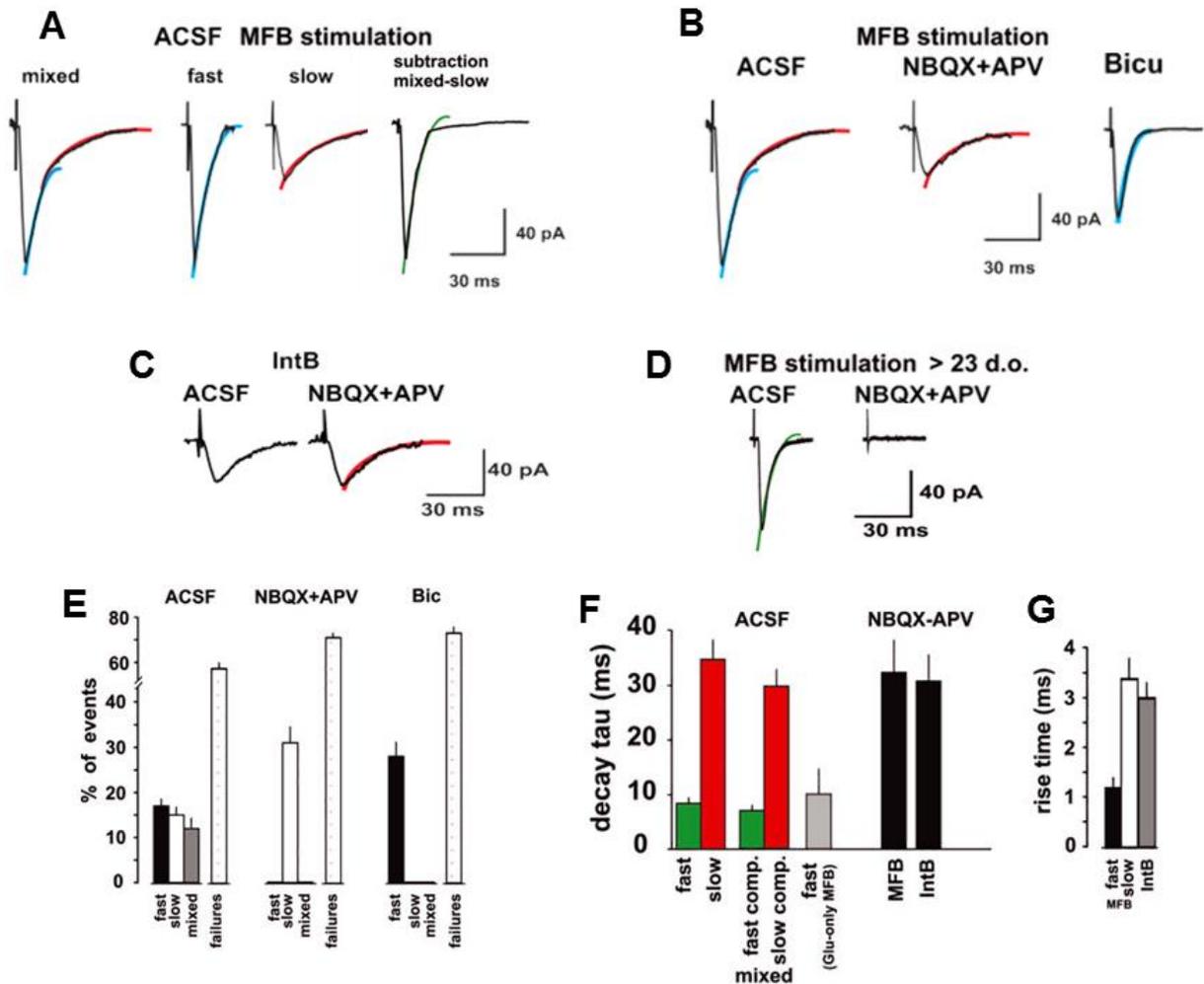


Figura 14. Cinética de las respuestas sinápticas evocadas provenientes de los botones de las fibras musgosas. **A**, En LCR artificial (ACSF) se observaron corrientes sinápticas evocadas de los botones de las fibras musgosas (MFB) con tres cinéticas de decaimiento: corrientes con una constante de decaimiento rápida (línea azul), corrientes con un tiempo de decaimiento lento (línea roja), y corrientes mixtas con un componente rápido y otro lento. La sustracción digital de las corrientes lentas de las corrientes mixtas produjo una corriente con un decaimiento rápido (línea verde). **B**, La perfusión de los bloqueadores de los iGluR (NBQX+APV) aisló un componente lento de las respuestas sinápticas provenientes de los MFB. **C**, Las corrientes sinápticas evocadas por la estimulación de un botón de interneurona (IntB) tuvieron un decaimiento lento que no se modificó durante el bloqueo de los iGluR. **D**, Las corrientes evocadas al estimular los MFB en células piramidales de roedores de 23 días tuvieron un decaimiento rápido y fueron eliminadas durante la perfusión de NBQX+APV. **E**, Porcentaje de fallas y de cada tipo de corriente evocada al estimular los botones de las fibras musgosas en condiciones control (ACSF), durante el bloqueo de los iGluR (NBQX+APV) y durante el bloqueo de los GABA_AR (Bic). **F-G**, Constantes de decaimiento (**F**) y tiempo de ascenso (**G**) de las diferentes corrientes sinápticas evocadas al estimular los MFB y los IntB en condiciones control (ACSF) y durante el bloqueo de los iGluR (Barras negras en **F**).

Caracterización funcional de las respuestas GABAérgicas provocadas por la estimulación de los botones de las fibras musgosas

Se investigó si el componente GABAérgico de las respuestas sinápticas evocadas por la estimulación de los botones de las fibras musgosas presentaba facilitación por frecuencia y sensibilidad a la activación de mGluRs. Por tanto, una vez aislado este componente, se incrementó la frecuencia de estimulación de 0.05 Hz a 1 Hz, observándose una potenciación en la amplitud de las respuestas de 213.1 ± 34 % ($p < 0.01$; $n=5$; Fig. 15 A-B), que fue acompañada por un decremento en la tasa de fallo a 49.0 ± 8.1 % ($p < 0.05$; Fig. 15 C). Por su parte, la perfusión de L-AP4, un agonista de los mGluR-III, deprimió un 79.8 ± 6.8 % la amplitud de las respuestas sinápticas ($p < 0.01$; $n=6$; Fig. 15 D-E), e incrementó tanto el cociente del protocolo de pulsos pareados como la tasa de fallos un 98.1 ± 8.2 % ($p < 0.05$; Fig. 15 F). En contraste, el incremento de la frecuencia de estimulación a 1 Hz deprimió la amplitud de las respuestas sinápticas evocadas por la estimulación de los botones de interneuronas al 66.1 ± 11.9 % ($p < 0.05$; $n = 5$) e incrementó en el porcentaje de fallos al 55 ± 3.9 % ($p < 0.05$; Fig. 15 A-C). La perfusión de L-AP4 no produjo cambios en la amplitud ni en la probabilidad de aparición de las respuestas evocadas (Fig. 15 D-F). Lo anterior indica que el componente GABAérgico de las respuestas de los botones de las fibras musgosas, pero no las respuestas de los botones de interneuronas, presenta las características de la transmisión sináptica de las fibras musgosas descritas en rebanadas (Salin y cols., 1996; Schmitz y cols., 2001; Kamiya y cols., 1996, revisado en Jaffe y Gutierrez 2007).

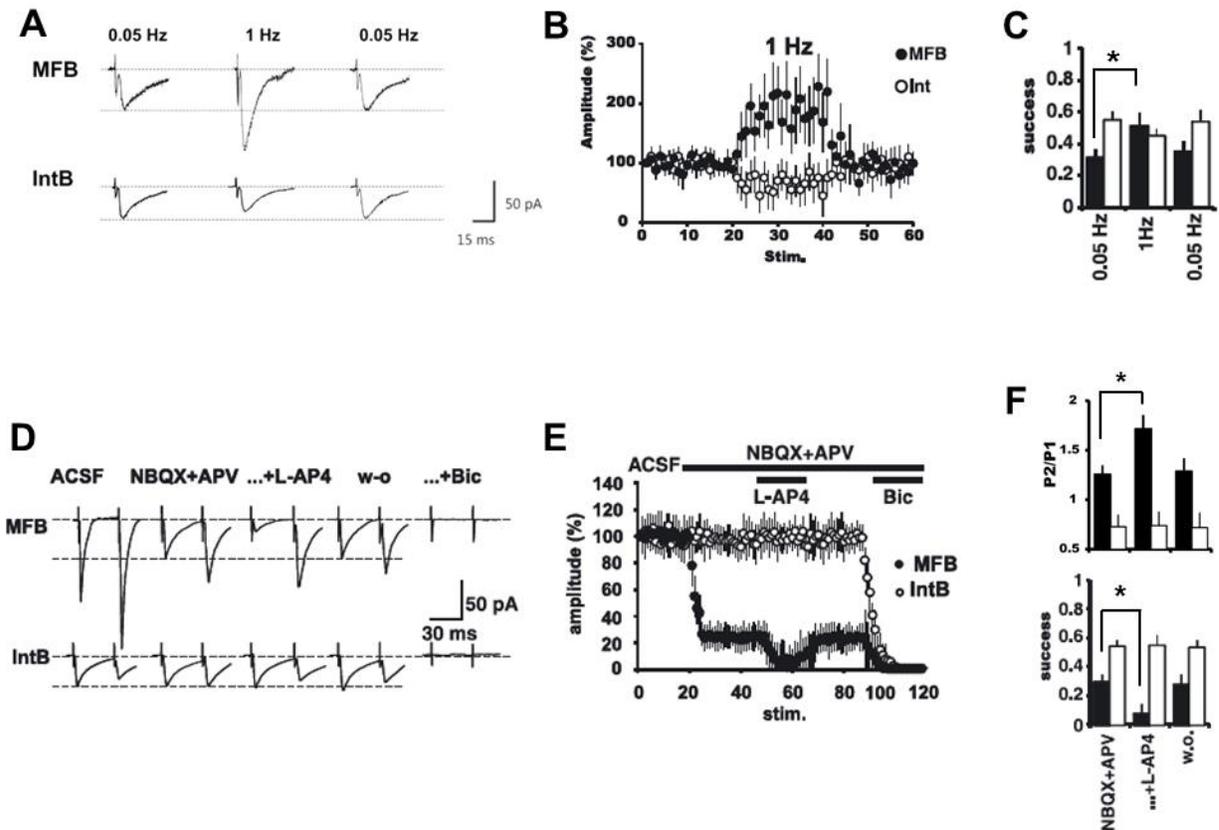


Figura 15. Caracterización funcional de las respuestas GABAérgicas de los botones de las fibras musgosas. **A**, Potenciación de las corrientes sinápticas evocadas por la estimulación de un botón de fibra musgosa (MFB), pero no de las corrientes provenientes los botones de interneuronas (IntB), al incrementar la frecuencia de estimulación a 1 Hz. **B**, Grafica de grupo donde se observa una potenciación del -200 % de las corrientes GABAérgicas evocadas al estimular los MFB, y una depresión de las corrientes provenientes de Int al incrementar la frecuencia de estimulación a 1 Hz. **C**, Probabilidad de éxito de las corrientes sinápticas evocadas por la estimulación de los MFB y de los IntB a 0.05 y 1 Hz. **D**, Depresión gradual de las corrientes sinápticas evocadas por la estimulación de un MFB, pero no de las corrientes provenientes los IntB, durante la perfusión NBQX+APV y posteriormente de L-AP4. **E**, Grafica de grupo donde se observa una depresión de las corrientes sinápticas evocadas por la estimulación de un MFB, pero no de las corrientes provenientes los IntB, durante la perfusión NBQX+APV y bloqueo posterior casi completo y reversible durante la perfusión de L-AP4. **F**, Probabilidad de éxito (grafica inferior) y cociente de pulsos pareados (grafica superior) de las corrientes sinápticas evocadas por la estimulación de los MFB y de los IntB durante el bloqueo de los iGluR (NBQx+APV) y durante la perfusión de NBQX + APV + L-AP4 (...+L-AP4; *= p<0.05).

DISCUSIÓN

En las últimas dos décadas se ha probado la presencia de la maquinaria molecular para la síntesis, almacenamiento y liberación de GABA y glutamato en las terminales sinápticas de las células granulares del hipocampo durante el desarrollo y, en el adulto, después de crisis convulsivas (Revisado en Gutiérrez 2005, Jaffe y Gutiérrez 2007, Gutiérrez 2009a). La presencia de una señalización GABAérgica monosináptica del giro dentado a la región CA3 después de crisis convulsivas que presentaba las mismas características fisiológicas que han sido descritas para la transmisión glutamatérgica de las fibras musgosas originó la hipótesis de la coliberación de GABA y glutamato de las terminales de las células granulares (Gutiérrez y Heinemann, 1997; Gutiérrez, 2000). Posteriormente, fue reportado que este mismo fenómeno ocurría en roedores durante las 3 primeras semanas de desarrollo (Walker y cols. 2001, Gutiérrez y cols. 2003, Safiulina y cols. 2006). Sin embargo, Uchigashima y cols. (2007) reportaron la inexistencia del componente GABAérgico en las respuestas sinápticas de las células piramidales ante la estimulación de las fibras musgosas, y sugirieron que los potenciales sinápticos GABAérgicos observados en estudios previos constituyen una contaminación de las respuestas por activación de interneuronas locales.

El circuito neuronal del giro dentado-región CA3 presenta una compleja y fina conectividad entre las células principales y los varios tipos de interneuronas que envían proyecciones a los diversos estratos que los componen (Amaral y Lavenex 2007). En efecto, las redes locales que rodean a las células granulares y a las fibras musgosas en su trayecto al área CA3 constituyen una fuente potencial de contaminación durante la activación de las GC o de sus axones. Por ello, en el presente trabajo se marcó de manera selectiva el tracto de las fibras musgosas, se removió la red local de CA3 y se obtuvieron células piramidales aisladas mecánicamente con terminales de fibras musgosas funcionales adheridas a su dendrita apical. Esto permitió el estudio detallado de la transmisión sináptica de un

botón identificado de una fibra musgosa y su comparación con la transmisión sináptica de botones de interneuronas adheridos a la misma célula piramidal. En este estudio se demuestra de manera directa que en roedores de 15 días de desarrollo posnatal los botones de las fibras musgosas pueden liberar glutamato y GABA del mismo botón sináptico, mientras que en roedores de 25 días estos botones solo liberan glutamato.

El estudio de una sola conexión sináptica entre dos neuronas del sistema nervioso central se ha abordado mediante el registro de una neurona blanco y la estimulación mínima simultánea eléctrica, química o fotónica de la membrana somática o axonal de un solo tipo o de una sola neurona presináptica (Liu y Tsien 1995; Jo y Schlichter 1999, Walker y cols 2001, Wang y cols 2007); y mediante registros pareados de dos neuronas conectadas o de una terminal sináptica y la neurona postsináptica (Geiger y cols. 1997, Jonas y cols. 1998, Geiger y cols. 2000; Mori y cols. 2004; Osorio y cols. 2013). La preparación célula disociada-botón sináptico terminal descrita en este trabajo, permitió el estudio directo e inequívoco de una sola sinapsis en una sola neurona en condiciones muy controladas, sin interferencia de otras neuronas de su microambiente. La técnica de disociación de neuronas para su estudio aislado se inició con el uso de pipetas Pasteur de pequeño calibre con o sin el uso adicional de enzimas en el medio extracelular (Kay y Wong 1986; Drewe y cols. 1988; Du y Bradley 1996; Kay y Krupa 1997). Posteriormente, con el fin de evitar que el uso de enzimas alterara las propiedades de los receptores y de los canales, se describió un método de disociación a partir de rebanadas, aplicando una punta roma de una micropipeta sobre el área de interés a estudiar y haciéndola desplazarse horizontalmente para desprender a las células sin el uso de enzimas en el medio extracelular (Vorobjev, 1991). Johansson y su grupo se basaron en esta técnica y lograron estimular químicamente terminales sinápticas adheridas mediante aplicación puntual de KCl o glutamato (Karlsson y cols. 1997; Haage y cols. 1998). Akaike y colaboradores desarrollaron independientemente una técnica muy similar que les permitió en diversas neuronas del SNC registrar actividad sináptica espontánea y corrientes sinápticas evocadas al estimular eléctricamente con micropipetas theta los

botones sinápticos adheridos y visualizados directamente con microscopia y marcaje fluorescente de proteínas y vesículas sinápticas (Rhee y cols. 1999; Koyama y cols. 1999; Akaike y cols. 2002, Jang y cols. 2002; Moorhouse y Akaike 2003; Akaike y cols. 2005). La combinación de la preparación célula disociada-botón sináptico terminal con las técnicas de marcaje selectivo de tractos axonales en general y del tracto de las fibras musgosas en particular que se describen en el presente trabajo de tesis constituye un método novedoso optimizado para el estudio de la sinapsis de las fibras musgosas con las células piramidales de CA3 (Beltrán y cols. 2012). Así, la preparación que desarrollamos ofrece la posibilidad de realizar con relativa facilidad registros con la técnica de fijación de voltaje controlando los medios intra y extracelulares, y permitiéndonos estudiar además la transmisión sináptica de un botón terminal proveniente de una interneurona en la misma célula que contiene el botón de las fibras musgosas marcado con fluorescencia. Podría suponerse que el procedimiento de disociación puede modificar la excitabilidad y composición en el botón presináptico y favorecer que se altere la plasticidad sináptica al perderse o dañarse parte del andamiaje perisináptico que direcciona y agrupa los receptores postsinápticos (Akaike y Moorhouse 2003; Dityatev y cols. 2010). Sin embargo, en nuestro caso y debido a las condiciones experimentales usadas, se conservaron los elementos no solo para la liberación sino también para la plasticidad sináptica ya que, como describimos, la estimulación de los botones marcados presentó las propiedades de la transmisión sináptica descrita para las sinapsis de las FM en rebanada. En particular corroboramos evidencia previamente publicada que mostraba que el soma de las células granulares no es un elemento necesario para que se presente facilitación por frecuencia en las sinapsis de las fibras musgosas (Calixto y cols. 2003).

Cabe mencionar que diversos autores no han observado esta señalización GABAérgica de las fibras musgosas en estudios que han abordado directa y selectivamente las sinapsis de estos axones, mediante registros pareados (Mori y cols. 2004, Alle y Geiger 2006, Szabadics y Soltesz 2009), fotoestimulación selectiva (Toni y cols. 2008, Kohara y cols. 2014) o en la preparación célula

disociada-botón sináptico terminal (Yamamoto y cols. 2011). Sin embargo esto se debe a que en las diferentes condiciones experimentales, inintencionada o premeditadamente: se eliminó cualquier componente GABAérgico que pudiera considerarse potencialmente “contaminante” con (1) la eliminación farmacológica o bioquímica de las corrientes GABAérgicas (Mori y cols. 2004, Yamamoto y cols. 2011), (2) el uso de un potencial de mantenimiento igual al E_{Inv} de Cl^- (Mori y cols. 2004, Alle y Geiger 2006, Yamamoto y cols. 2011, Kohara y cols. 2014), y (3) porque se usaron roedores adultos de ≥ 4 semanas de edad (Mori y cols. 2004, Toni y cols. 2008, Szabadics y Soltesz 2009, Kohara y cols. 2014).

De manera interesante Uchigashima y cols. (2007), han reportado explícitamente la ausencia de este componente GABAérgico en las respuestas sinápticas de las células piramidales de CA3 ante la estimulación mínima de las fibras musgosas, sugiriendo que los eventos GABAérgicos monosinápticos observados en los estudios previos representan respuestas evocadas por la activación inadvertida de interneuronas locales (Uchigashima y cols. 2007). En principio, aunque esta activación de algún tipo de interneurona es plausible, se tendría que explicar también: 1) la presencia de las características de la transmisión de las fibras musgosas en la señalización GABAérgica, 2) la existencia transitoria de un subgrupo de interneuronas solo durante un periodo de tiempo específico en el desarrollo, y 3) la correlación temporal de esta transmisión GABAérgica con la expresión transitoria de los marcadores de fenotipo GABAérgico en las células granulares (revisado en Gutiérrez 2005, Gutiérrez 2009a.). De hecho estas características y la desaparición de esta señalización GABAérgica en un periodo breve de tiempo apunta a un proceso plástico fisiológico más que a un cambio estructural en la red local. Lo que es más, analizando el estudio de estos autores, se puede observar que las respuestas que atribuyen a contaminación por interneuronas son de una amplitud un orden de magnitud mayor que las respuestas en el presente trabajo (4080 ± 380 vs 102.8 ± 24.4 pA), mientras que con estimulación mínima observaron respuestas de mucho menor amplitud ($LCRa = 617 \pm 116$ pA) que durante la perfusión de los bloqueadores de los iGluR, disminuyeron a un 10% de su valor inicial ($CNQX+AP5 = 43 \pm 5$ pA). Aunque el

efecto de los antagonistas de los iGluR sobre las corrientes evocadas con estimulación mínima llevo a Uchigashima y colaboradores a describir que estas corrientes fueron *casí* bloqueadas, los valores descritos para estas respuestas remanentes fueron semejantes a las amplitudes halladas en el presente estudio, lo que sugeriría su origen en las fibras musgosas.

Recientemente con un abordaje más directo mediante estimulación individual de una célula granular con fotolisis de MNI-glutamato y el registro simultáneo de una célula piramidal de CA3 en rebanadas cultivadas de ratones jóvenes transgénicos GAD₆₇-GFP⁺, Cabezas y cols. (2013), observaron que la GAD₆₇ era expresada solo en un subpoblación de células granulares, la cuales liberan GABA de sus terminales, reduciendo la excitabilidad de las fibras musgosas pero sin producir corrientes posinápticas en las células piramidales de CA3. Llama la atención que en este trabajo los autores no encuentren respuestas sinápticas en las células piramidales, sin embargo se debe considerar que mientras en estudios previos se usaron rebanadas frescas, en este estudio se usaron rebanadas organotípicas cultivadas por 12 días, provenientes de roedores de 8 días de edad. Debido a que la edad de desarrollo exacta de las células granulares y de sus fibras musgosas en estos cultivos es incierta, es muy difícil hacer una comparación adecuada con los estudios previos. Más aún, en la preparación referida existe una disminución importante de la actividad excitadora basal por la eliminación de aferencias extrínsecas, lo que puede interferir con el desarrollo normal de las sinapsis GABAérgicas y glutamatérgicas en la conexión fibra musgosa-célula piramidal, tanto en el compartimento presináptico como en el postsináptico (Gutiérrez y Heinemann 1999).

Es necesario considerar que se han encontrado sinapsis en las dendritas apicales de las neuronas piramidales de CA3, a nivel del stratum lucidum, provenientes de interneuronas asociadas a las fibras musgosas (Vida y Frotscher, 2000). Por ello, podría argumentarse que en nuestra preparación el componente GABAérgico observado puede tener su origen en terminales sinápticas de interneuronas contiguas a los botones sinápticos de las fibras musgosas, sin embargo en esta

tesis se demuestra que éste no es el caso. En nuestra preparación experimental las respuestas sinápticas evocadas se presentaron en una forma “todo o nada”, tuvieron un tiempo de ascenso constante, un tiempo de latencia breve y constante, además determinamos que los desplazamientos de la punta de la micropipeta de estimulación del sitio de estimulación efectiva mayores a 0.5 μ m no provocaban respuestas sinápticas. De haber otro botón adyacente, se hubiera detectado un cambio en la latencia, tiempo de ascenso o morfología de las respuestas. Aun mas, las sinapsis de las interneuronas asociadas a las fibras musgosas presentan una probabilidad de fallos muy variable (3 - 100 %), corrientes posinápticas de amplitud constante durante trenes de estimulación a frecuencias 1-25 Hz y frecuentemente una disminución del cociente en un protocolo de pulsos pareados (Vida y Frotscher, 2000; Losonczy y cols., 2004), mientras que en este trabajo mostramos que las respuestas GABAérgicas aisladas generadas al estimular los botones de las fibras musgosas presentaron una probabilidad inicial de fallo constante y baja, una potenciación de 213.9 ± 34 % al incrementar discretamente la frecuencia de estimulación de 0.05 a 1 Hz, un aumento del cociente en un protocolo de pulsos pareados de 1.72 a 4.43 y una depresión de la amplitud al activar los mGluR, que corresponden a las características reportadas para la transmisión de las fibras musgosas. Más aún, estas respuestas GABAérgicas de los botones de las fibras musgosas presentaron la misma naturaleza todo o nada, latencia, área de estimulación efectiva y umbral de estimulación que en las condiciones control durante la perfusión de LCRa, lo que indica que las respuestas que observamos provienen del mismo botón sináptico.

En el presente estudio se encontraron tres tipos de respuestas sinápticas al estimular los botones de las fibras musgosas de células piramidales provenientes de roedores de 15 días: glutamatérgicas, GABAérgicas y mixtas glutamatérgicas/GABAérgicas, lo cual no había sido reportado en estudios previos. Este tipo de segregación de las respuestas sinápticas nos indica que en esta etapa del desarrollo, el GABA y glutamato son liberados de diferentes vesículas de los botones de las fibras musgosas, lo que coincide con lo reportado por Walker y cols. (2001), quienes con estimulación mínima de una sola fibra musgosa

observaron también corrientes solo GABAérgicas, solo glutamatérgicas y corrientes mixtas, sugiriendo que estos neurotransmisores pueden ser liberados sincrónica o asincrónicamente. Lo que es más, estos resultados concilian los hallazgos de diversos autores que han reportado que con estimulación mínima de las fibras musgosas se generan respuestas solo GABAérgicas durante la primera semana (Safiulina y cols. 2006), respuestas mixtas en la segunda e inicio de la tercera semana (Walker y cols. 2001, Gutiérrez y cols. 2003, Bergersen y cols. 2003) y repuestas preponderantemente glutamatérgicas durante la tercera semana (Gutiérrez y cols., 2003; Uchigashima y cols 2007, Cabezas y cols. 2013). Más aún, recientemente nuestro grupo ha reportado que un porcentaje de células granulares de nueva generación en el giro dentado de roedores adultos pueden expresar de manera transitoria los marcadores del fenotipo GABAérgico, lo que sugiere la existencia de reservas de poblaciones de células granulares que pueden re-especificar su fenotipo de neurotransmisor e integrarse de manera específica a diferentes circuitos locales (Lara y cols. 2012; Dulcis y Spitzer, 2011). Con esto podemos sugerir que la población de células granulares no es una población homogénea, sino una población neuronal que presenta una importante heterogeneidad espacial y temporal (Fanselow y Dong 2010; Galimberti y cols. 2010; Klein 2010; Lara y col., 2012; Beltrán y cols., 2012).

Con la comprobación de que la activación de los mGluR-II inhibe las respuestas GABAérgicas podemos argumentar que estos receptores se encuentran en las zonas presinápticas activas en esta edad. Al respecto, Shigemoto y colaboradores han mostrado que en ratas adultas los mGluR-II se encuentran en el límite axón-botón gigante, de ~ 0.7 a $1.2 \mu\text{m}$ de distancia de las zonas activas, y ocasionalmente en los botones de las fibras musgosas pero no en sitios presinápticos (Shigemoto y cols. 1997). A diferencia de estos investigadores, el presente trabajo se realizó con roedores en desarrollo, por lo que no se podría descartar que en esta etapa los mGluR-II se encuentren en sitios presinapticos (ver también Kasyanov y cols., 2004). De manera alternativa la modulación observada se podría deber a que en nuestra preparación los botones de las fibras musgosas mantienen el remanente axonal preterminal que contiene los mGluR-II.

La liberación de neurotransmisor es un fenómeno complejo con una modulación diversa. Existe una segregación de las vesículas sinápticas, de tal modo que hay tres “*pools*” que han sido denominados de liberación rápida, de reciclado y de reserva (revisado en Rizzoli y Betz 2005). Existe además evidencia de la existencia de dos microdominios sinápticos, uno para la liberación espontánea y otro para la liberación evocada (Sutton y cols. 2009; Sara y cols. 2011), ambos con una importante modulación tras la activación de receptores presinápticos (Wasser y Kavalali 2009). En roedores en desarrollo se ha observado una activación tónica de los receptores presinápticos GABA_B que disminuye la probabilidad de liberación de las fibras musgosas en la primera semana de vida (Safiulina y Cherubini 2009), y una activación de los KAR presinápticos acoplados a proteína G que deprime la liberación de GABA de las terminales de las fibras musgosas (Caiati y cols 2010). Este último caso y el presentado en nuestro estudio constituyen ejemplos de una modulación cruzada entre receptores presinápticos glutamatérgicos y la maquinaria de liberación de vesículas GABAérgicas. En las terminales GABAérgicas y glutamatérgicas existe una expresión diferencial de proteínas presinápticas involucradas en la liberación de neurotransmisor. Se ha observado que en las terminales glutamatérgicas VGlut1⁺ coexpresan niveles altos de proteína sináptica vesicular-2A (SV2A), proteína sináptica vesicular-2B (SV2B), SNAP-25 y Rab3c, niveles intermedios de sinaptotagmina-1 (SYT1) y niveles bajos de SYT2, mientras que las terminales GABAérgicas VGAT⁺ se asocian a niveles altos de SV2A y SYT2, niveles intermedios SYT1, Rab3a y Rab3c, y a niveles bajos de SV2B y SNAP-25 (Bragina y cols. 2007, 2012). Algunas de estas moléculas pueden constituir blancos diferenciales de los mGluR presinápticos en la sinapsis de las fibras musgosas. Investigaciones previas muestran que en las sinapsis glutamatérgicas los mGluR-II deprimen el influjo de calcio presináptico mediado por los canales de calcio tipo P/Q e inhiben la maquinaria de liberación de neurotransmisor por un mecanismo que involucra vías de señalización intracelular dependientes de proteínas G_{i/o}, adenilatociclasa, proteincinasa A y AMP_C (Kamiya y Ozawa 1999, Nicholls y cols. 2006), mientras que en ciertas áreas no afectan la transmisión

GABAérgica (Deng y cols. 2010; Wang y cols. 2012). En las fibras musgosas se ha observado que los mGluR-II inhiben la liberación de neurotransmisión por mecanismos dependientes e independientes de la cascada de señalización adenilatociclasa-AMP_C (Maccaferri y cols. 1998). Durante el desarrollo es posible que en los botones de las fibras musgosas, los mGluR-II tengan como blanco proteínas preferentemente expresadas como pertenecientes a la maquinaria de liberación glutamatérgica, v.gr. SV2B y SNAP-25, mientras que los mGluR-III hagan lo propio con proteínas asociadas preferentemente a la maquinaria de liberación GABAérgica, como SV2A y SYT2 (Bragina y cols. 2007, 2012).

En diversos sitios del sistema nervioso central, incluyendo el hipocampo, la liberación de glutamato es preponderantemente mediada por canales Ca²⁺ tipo P/Q (Li y cols., 2007; Catterall y Few 2008; Kamp y cols., 2012), mientras que en ciertas sinapsis GABAérgicas del hipocampo, la liberación de neurotransmisor es mediada únicamente por la activación de los canales tipo N acoplados en microdominios (Poncer y cols., 1997; Catterall y Few 2008; Goswami y cols., 2012). En los botones gigantes de las fibras musgosas coexisten canales de Ca²⁺ tipo P/Q, N y R, en diferente proporción y con diferentes propiedades de apertura respecto a su cinética y umbral de activación (Li y cols., 2007), lo que sugiere una participación diferencial de cada tipo de canal en la transmisión sináptica. Dado que existe evidencia que indica que el GABA y glutamato son liberados de diferentes grupos de vesículas de los botones de las fibras musgosas (Walker y cols., 2001; Beltrán y cols., 2012), se puede suponer que en los botones gigantes los canales P/Q se encuentran más cercanos al *pool* glutamatérgico y los canales tipo N lo estén del *pool* GABAérgico, lo que podría controlar selectivamente la liberación de uno u otro neurotransmisor en esta sinapsis en esta etapa de desarrollo.

Funcionalmente, se ha propuesto que las aferencias GABAérgicas a las neuronas piramidales de CA3 durante el desarrollo ejercen un efecto trófico, con lo que las células granulares constituirían una aferencia de GABA adicional al de las interneuronas locales, especialmente en la primera semana de desarrollo cuando

el GABA es despolarizante y antes de la expresión de receptores AMPA (Ben Ari y cols. 2007, Safiulina y cols. 2010). De hecho se ha sugerido que la liberación de GABA de las fibras musgosas durante el desarrollo puede contribuir al refinamiento de la conectividad neuronal de una manera altamente selectiva, como lo observado en otras áreas del sistema nervioso central (Kasyanov y cols. 2004; Gillespie y cols. 2005, Romo-Parra y cols. 2008). La co-liberación de dos neurotransmisores puede variar la forma y curso temporal de los potenciales sinápticos de acuerdo al tipo y cantidad de receptores presentes en la postsinapsis, a la composición iónica de las neuronas blanco y a las interacciones moleculares postsinápticas, que modificarían en conjunto la suma e integración postsináptica (Gutiérrez y Arias-Montaña 2009). La relación entre el grado de excitación recibida por una neurona y su probabilidad de generar un potencial de acción puede describirse por una curva o función entrada-salida (I/O) con un umbral y una ganancia. Se ha observado que la eficacia sináptica excitadora controla el umbral de dicha función (I/O) en las neuronas principales, mientras que la transmisión sináptica inhibitoria modifica tanto el umbral como la ganancia de esta función I/O. Al final del desarrollo, la co-transmisión de GABA y glutamato de los botones las fibras musgosas dotaría a las sinapsis de estas fibras la capacidad de efectuar una optimización selectiva en el procesamiento e integración de información sináptica y neuronal de un modo energéticamente más eficiente (Somogyi 2006; Carvalho y Buonomano 2009). Al final del desarrollo el fenotipo GABAérgico de las células granulares desaparece y utiliza solo glutamato que es la configuración de la etapa adulta de la red local de CA3, en la que la inhibición es disináptica y está mediada por interneuronas locales (ver Jaffe y Gutiérrez 2007). Sin embargo, después de someter al giro dentado a periodos de hiperexcitabilidad (LTP *In Vitro* o con crisis convulsivas *In Vivo*) la liberación de GABA de las fibras musgosas puede ejercer un efecto protector, evitando sobreexcitación y excitotoxicidad de las células piramidales de CA3 (Gutiérrez y Heinemann 2006; Gutiérrez 2009b). Vemos entonces que las células granulares presentan un fenotipo programado durante el desarrollo temprano y una plasticidad de neurotransmisor inducido por estímulos fisiológicos y patológicos en la etapa adulta (Gutiérrez 2005, 2009b).

Previamente en nuestro laboratorio se demostró que la entrada de calcio es necesaria para la expresión del fenotipo GABAérgico en las células granulares adultas (Gómez-Lira y cols., 2005). El papel de las espigas de calcio en la expresión de un determinado fenotipo, y sobre todo en la expresión del fenotipo GABAérgico y glutamatérgico, ha sido ampliamente demostrado en células en desarrollo (revisado en Spitzer 2012). En *Xenopus laevis* se ha observado que previo a la formación sináptica, la frecuencia de las espigas de calcio regula el número de neuronas que expresan diferentes neurotransmisores. Un incremento en la frecuencia de las espigas de calcio genera un aumento en el porcentaje de neuronas GABAérgicas, y por el contrario un decremento en estas espigas lleva a un incremento en el número de neuronas glutamatérgicas (Gu y Spitzer 1995; Borodinsky y cols., 2004; Spitzer 2012). Así vemos, que existe una relación importante entre excitabilidad y la expresión de fenotipo de neurotransmisor, en donde el papel del calcio es fundamental.

CONCLUSIONES

En suma, vemos que la organización estructural y funcional del sistema nervioso es más compleja que lo inicialmente observado, cada vez más claro que muchas neuronas del sistema nervioso central y periférico usan dos o más moléculas como neurotransmisor rápido, con diferentes patrones espacio-temporales de expresión (Gutiérrez, 2009a). Esta modificación del fenotipo de neurotransmisor es una forma más de plasticidad neuronal que proporciona al sistema nervioso una mayor flexibilidad para responder a las diferentes condiciones ambientales (Gutiérrez, 2009a; Dulcis y Spitzer 2011; Borodinsky y cols., 2012).

PERSPECTIVAS

Unas de principales interrogantes que se originan a partir de este trabajo son: 1) identificar, tanto en condiciones fisiológica y como patológicas, las señales y mecanismos fisiológicos celulares y moleculares por los que se regula esta plasticidad de neurotransmisor descrita; y 2) conocer las implicaciones fisiológicas de la coliberación de GABA y glutamato sobre el desarrollo normal y conectividad de las células de las región de CA3. Ambas cuestiones constituyen potenciales líneas de investigación de nuestro laboratorio y de otros grupos.

BIBLIOGRAFÍA

Acsady L, Kamondi A, Sik A, Freund T, Buzsáki G (1998) GABAergic cells are the major postsynaptic targets of mossy fibers in the rat hippocampus. *J Neurosci* 18:3386-3403.

Acsády, L., & Káli, S. (2007). Models, structure, function: the transformation of cortical signals in the dentate gyrus. *Progress in brain research*, 163, 577-599.

Agranoff B W. (1975) Neurotransmitters and synaptic transmission. *Fedn. Proc. Fedn. Am. Socs. exp. Biol.* 34, 1911- 1914.

Akaike N, Moorhouse AJ (2003) Techniques: applications of the nerve-bouton preparation in neuropharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 24:44-47.

Akaike N, Murakami N, Katsurabayashi S, Jin YH, Imazawa T (2002) Focal stimulation of single GABAergic presynaptic boutons on the rat hippocampal neuron. *Neurosci Res* 42:187-195.

Akaike, N., Shoudai, K., Nonaka, K., Maeda, M., & Ito, Y. (2005). A Functional Study of Single Mammalian CNS "Synaptic Bouton". *Neurophysiology*, 37(2), 163-165.

Albright TD, Kandel ER, Posner MI (2000) Cognitive neuroscience. *Curr Opin Neurobiol* 10:612-624.

Alle, H., & Geiger, J. R. (2006). Combined analog and action potential coding in hippocampal mossy fibers. *Science*, 311(5765), 1290-1293.

Amaral DG (1979) Synaptic extensions from the mossy fibers of the fascia dentata. *Anat Embryol (Berl)* 155:241-251.

Amaral, D. G., & Witter, M. P. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience*, 31(3), 571-591.

Amaral DG, Ishizuka N, Claiborne B (1990) Neurons, numbers and the hippocampal network. *Prog Brain Res* 83:1-11.

Amaral DG, Lavenex P (2006) Hippocampal Neuroanatomy. In: *The Hippocampus Book* (Anderson P, Morris R, Amaral DG, Bliss, O'Keefe J, eds), pp 37-114. Oxford University Press.

Andersen P, Morris R, Amaral DG, Bliss TV, O'Keefe J (2006) The Hippocampal Formation. In: *The Hippocampus Book* (Anderson P, Morris R, Amaral DG, Bliss, O'Keefe J, eds), pp 3-8. Oxford University Press.

Axelrod J, Whitby LG, Hertting G (1961) Effects of psychotropic drugs on the uptake of H³-norepinephrine by tissues. *Science* 133:383-384

Babb TL (1999) Synaptic reorganizations in human and rat hippocampal epilepsy. *Adv Neurol* 79:763-779.

Bakker, A., Kirwan, C. B., Miller, M., & Stark, C. E. (2008). Pattern separation in the human hippocampal CA3 and dentate gyrus. *Science*, 319(5870), 1640-1642.

- Baude, A., Nusser, Z., Roberts, J. D. B., Mulvihill, E., Jeffrey McIlhinney, R. A., & Somogyi, P. (1993). The metabotropic glutamate receptor (mGluR1 α) is concentrated at perisynaptic membrane of neuronal subpopulations as detected by immunogold reaction. *Neuron*, 11(4), 771-787.
- Beltrán, J. Q., & Gutiérrez, R. (2012). Co-release of glutamate and GABA from single, identified mossy fibre giant boutons. *The Journal of physiology*, 590(19), 4789-4800.
- Beltrán, J. Q., Reyes, S., Pérez-Guzmán, J. A., Elías-Viñas, D., & Gutiérrez, R. (2012). Dissociation of CA3 pyramidal cells with attached, functional, identified mossy fiber and interneuronal boutons for studying glutamatergic and GABAergic synaptic transmission. *Journal of neuroscience methods*, 208(2), 155-160.
- Ben Ari Y, Cherubini E, Corradetti R, Gaiarsa JL (1989) Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. *J Physiol* 416:303-325.
- Ben-Ari, Y., Gaiarsa, J. L., Tyzio, R., & Khazipov, R. (2007). GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. *Physiological reviews*, 87(4), 1215-1284.
- Bennett, M. V. L., Aljure, E., Nakajima, Y., & Pappas, G. D. (1963). Electrotonic junctions between teleost spinal neurons: electrophysiology and ultrastructure. *Science*, 141(3577), 262-264.
- Bennett MV, Zukin RS (2004) Electrical coupling and neuronal synchronization in the Mammalian brain. *Neuron* 41:495-511.
- Bergersen L, Ruiz A, Bjaalie JG, Kullmann DM, Gundersen V (2003) GABA and GABAA receptors at hippocampal mossy fibre synapses. *Eur J Neurosci* 18:931-941.
- Bernard, C. (1864) Études physiologiques sur quelques poisons americains. I. Le curare. *Rev Deux Mondes* 53, 164-190.
- Bischofberger J, Engel D, Li L, Geiger JR, Jonas P (2006) Patch-clamp recording from mossy fiber terminals in hippocampal slices. *Nat Protoc* 1:2075-2081.
- Blackstad TW, Brink K, Hem J, June B (1970) Distribution of hippocampal mossy fibers in the rat. An experimental study with silver impregnation methods. *Journal of Comparative Neurology* 138:433-449.
- Bormann J (1988) Electrophysiology of GABAA and GABAB receptor subtypes. *Trends Neurosci* 11:112-116.
- Bormann, J. (2000). The 'ABC' of GABA receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 21(1), 16-19.
- Bormann J, Hamill OP, Sakmann B (1987) Mechanism of anion permeation through channels gated by glycine and gamma-aminobutyric acid in mouse cultured spinal neurones. *J Physiol* 385:243-286.
- Borodinsky, L. N., Root, C. M., Cronin, J. A., Sann, S. B., Gu, X., & Spitzer, N. C. (2004). Activity-dependent homeostatic specification of transmitter expression in embryonic neurons. *Nature*, 429(6991), 523-530.

- Borodinsky LN, Spitzer NC (2007) Activity-dependent neurotransmitter-receptor matching at the neuromuscular junction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:335-340.
- Boulton CL, von HD, Heinemann U (1992) Tracing of axonal connections by rhodamine-dextran-amine in the rat hippocampal-entorhinal cortex slice preparation. *Hippocampus* 2:99-106.
- Boyden, E. S., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G., & Deisseroth, K. (2005). Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nature neuroscience*, 8(9), 1263-1268.
- Bragina, L., Candiracci, C., Barbaresi, P., Giovedi, S., Benfenati, F., & Conti, F. (2007). Heterogeneity of glutamatergic and GABAergic release machinery in cerebral cortex. *Neuroscience*, 146(4), 1829-1840.
- Bragina, L., Fattorini, G., Giovedì, S., Melone, M., Bosco, F., Benfenati, F., & Conti, F. (2012). Analysis of synaptotagmin, SV2, and Rab3 expression in cortical glutamatergic and GABAergic axon terminals. *Frontiers in cellular neuroscience*, 5, 32.
- Bravo, J. A., Forsythe, P., Chew, M. V., Escaravage, E., Savignac, H. M., Dinan, T. G., ... & Cryan, J. F. (2011). Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(38), 16050-16055.
- Brickley, S. G., & Mody, I. (2012). Extrasynaptic GABA_A Receptors: Their Function in the CNS and Implications for Disease. *Neuron*, 73(1), 23-34.
- Burnstock G. (1969) Evolution of the autonomic innervation of visceral and cardiovascular systems in vertebrates. *Pharmac. Rev.* 21. 247-324.
- Burwell, R. D., & Amaral, D. G. (1998). Cortical afferents of the perirhinal, postrhinal, and entorhinal cortices of the rat. *The Journal of comparative neurology*, 398(2), 179-205.
- Buzsáki, G. (2006). *Rhythms of the Brain*. Oxford University Press.
- Buzsáki, G., & Chrobak, J. J. (1995). Temporal structure in spatially organized neuronal ensembles: a role for interneuronal networks. *Current opinion in neurobiology*, 5(4), 504-510.
- Cabezas, C., Irinopoulou, T., Gauvain, G., & Poncer, J. C. (2012). Presynaptic but not postsynaptic GABA signaling at unitary mossy fiber synapses. *The Journal of Neuroscience*, 32(34), 11835-11840.
- Caiati MD, Sivakumaran S, Cherubini E (2010) In the developing rat hippocampus, endogenous activation of presynaptic kainate receptors reduces GABA release from mossy fiber terminals. *J Neurosci* 30:1750-1759.
- Cajal, S. R. (1889). *Conexión general de los elementos nerviosos*. La Medicina Práctica. Madrid.
- Calixto, E., Thiels, E., Klann, E., & Barrionuevo, G. (2003). Early maintenance of hippocampal mossy fiber—long-term potentiation depends on protein and RNA

synthesis and presynaptic granule cell integrity. *The Journal of neuroscience*, 23(12), 4842-4849.

Carlsson A, Lindqvist M, Magnusson T, Waldeck B (1958) On the presence of 3-hydroxytyramine in brain. *Science* 127:471

Carvalho, T. P., & Buonomano, D. V. (2009). Differential effects of excitatory and inhibitory plasticity on synaptically driven neuronal input-output functions. *Neuron*, 61(5), 774-785.

Castillo PE, Malenka RC, Nicoll RA (1997) Kainate receptors mediate a slow postsynaptic current in hippocampal CA3 neurons. *Nature* 388:182-186.

Catterall, W. A., & Few, A. P. (2008). Calcium channel regulation and presynaptic plasticity. *Neuron*, 59(6), 882-901.

Chadderton, P., Margrie, T. W., & Häusser, M. (2004). Integration of quanta in cerebellar granule cells during sensory processing. *Nature*, 428(6985), 856-860.

Churchland, P. S., & Sejnowski, T. J. (1992). *The computational brain*. The MIT press.

Claiborne, B. J., Amaral, D. G., & Cowan, W. M. (1986). A light and electron microscopic analysis of the mossy fibers of the rat dentate gyrus. *Journal of comparative neurology*, 246(4), 435-458.

Corkin, S. (2002). What's new with the amnesic patient HM?. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(2), 153-160.

Crawford, I. L., & Connor, J. D. (1973). Localization and release of glutamic acid in relation to the hippocampal mossy fibre pathway.

Cryan, J. F., & O'Mahony, S. M. (2011). The microbiome-gut-brain axis: from bowel to behavior. *Neurogastroenterology & Motility*, 23(3), 187-192.

Curtis DR, Watkins JC (1960) The excitation and depression of spinal neurones by structurally related amino acids. *J Neurochem* 6:117–141

Dale, H. H. (1934). Chemical transmission of the effects of nerve impulses. *British Medical Journal*, pp. 835–841.

Dale H (1935) Pharmacology and Nerve-endings (Walter Ernest Dixon Memorial Lecture): (Section of Therapeutics and Pharmacology). *Proc R Soc Med* 28:319-332.

Deng, P. Y., & Lei, S. (2006). Bidirectional modulation of GABAergic transmission by cholecystinin in hippocampal dentate gyrus granule cells of juvenile rats. *The Journal of physiology*, 572(2), 425-442.

De Robertis E, Rodríguez de Lores Arnaiz G, Pellegrino de Iraldi A (1962) Isolation of synaptic vesicles from nerve endings of the rat brain. *Nature* 194:794–795

Dichter M, Spencer WA (1969) Penicillin-induced interictal discharges from the cat hippocampus. I. Characteristics and topographical features. *J Neurophysiol* 32:649-662.

- Dityatev, A., Seidenbecher, C. I., & Schachner, M. (2010). Compartmentalization from the outside: the extracellular matrix and functional microdomains in the brain. *Trends in neurosciences*, 33(11), 503-512.
- Drewe, J. A., Childs, G. V., & Kunze, D. L. (1988). Synaptic transmission between dissociated adult mammalian neurons and attached synaptic boutons. *Science*, 241(4874), 1810-1813.
- Du Bois-Reymond, E. H. (1877). *Gesammelte Abhandlungen zur allgemeinen Muskel-und Nervenphysik* (Vol. 2). Veit.
- Du, J., & Bradley, R. M. (1996). Electrophysiological and morphological properties of neurons acutely isolated from the rostral gustatory zone of the rat nucleus of the solitary tract. *Chemical senses*, 21(6), 729-737.
- Dulcis, D., & Spitzer, N. C. (2012). Reserve pool neuron transmitter respecification: Novel neuroplasticity. *Developmental neurobiology*, 72(4), 465-474.
- Eccles, J. C. (1957). The clinical significance of research work on the chemical transmitter substances of the nervous system. *The Medical journal of Australia*, 44(22), 745-753.
- Eccles, J. (1976). From electrical to chemical transmission in the central nervous system. *Notes and records of the Royal Society of London*, 219-230.
- Eccles, J. C. (1982). The synapse: from electrical to chemical transmission. *Annual review of neuroscience*, 5(1), 325-339.
- Eccles JC, Fatt P, Koketsu K (1954) Cholinergic and inhibitory synapses in a pathway from motor-axon collaterals to motoneurons. *The Journal of Physiology* 126:524-562.
- Del Castillo, J., & Katz, B. (1954). Quantal components of the end-plate potential. *The Journal of physiology*, 124(3), 560-573.
- Del Castillo J, Katz B (1955) On the localization of acetylcholine receptors. *J Physiol* 128:157–181
- Elliott TR (1904) On the action of adrenaline. *J Physiol Lond* 31:xx–xxi
- Fanselow, M. S., & Dong, H. W. (2010). Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures?. *Neuron*, 65(1), 7-19.
- Farrant M, Nusser Z (2005) Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. *Nat Rev Neurosci* 6:215-229.
- Förster, E., Zhao, S., & Frotscher, M. (2006). Laminating the hippocampus. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(4), 259-268.
- Freund, T. F., & Buzsáki, G. Y. (1996). Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*, 6(4), 347-470.
- Fulton, J.F. (1938) *The Physiology of the Nervous System*, Oxford University Press
- Furshpan EJ, Potter DD (1959) Transmission at the giant motor synapses of the crayfish. *The Journal of Physiology* 145:289-325.

- Gabrieli, J. D., Cohen, N. J., & Corkin, S. (1988). The impaired learning of semantic knowledge following bilateral medial temporal-lobe resection. *Brain and cognition*, 7(2), 157-177.
- Galimberti, I., Bednarek, E., Donato, F., & Caroni, P. (2010). EphA4 signaling in juveniles establishes topographic specificity of structural plasticity in the hippocampus. *Neuron*, 65(5), 627-642.
- Geiger JR, Lübke J, Roth A, Frotscher M, Jonas P., 1997, Submillisecond AMPA receptor-mediated signaling at a principal neuron-interneuron synapse, *Neuron* 18(6):1009-23.
- Geiger, J. R., & Jonas, P. (2000). Dynamic control of presynaptic Ca^{2+} inflow by fast-inactivating K^+ channels in hippocampal mossy fiber boutons. *Neuron*, 28(3), 927-939.
- Gerschenfeld. M. (1973) Chemical transmission in invertebrate central nervous systems and neuromuscular junctions. *Physiol. Rev.* 53. 1-119.
- Gillespie DC, Kim G, Kandler K (2005) Inhibitory synapses in the developing auditory system are glutamatergic. *Nat Neurosci* 8:332-338.
- Gómez-Lira, G., Lamas, M., Romo-Parra, H., & Gutiérrez, R. (2005). Programmed and induced phenotype of the hippocampal granule cells. *The Journal of neuroscience*, 25(30), 6939-6946.
- Goswami, S. P., Bucurenciu, I., & Jonas, P. (2012). Miniature IPSCs in hippocampal granule cells are triggered by voltage-gated Ca^{2+} channels via microdomain coupling. *The Journal of Neuroscience*, 32(41), 14294-14304.
- Gu, X., & Spitzer, N. C. (1995). Distinct aspects of neuronal differentiation encoded by frequency of spontaneous Ca^{2+} transients. *Nature*, 375(6534), 784-787.
- Gutiérrez R (2000) Seizures induce simultaneous GABAergic and glutamatergic transmission in the dentate gyrus-CA3 system. *J Neurophysiol* 84:3088-3090.
- Gutiérrez R (2002) Activity-dependent expression of simultaneous glutamatergic and GABAergic neurotransmission from the mossy fibers in vitro. *J Neurophysiol* 87:2562-2570.
- Gutiérrez R (2005) The dual glutamatergic–GABAergic phenotype of hippocampal granule cells. *Trends in Neuroscience* 28:297-303.
- Gutiérrez R (2009a) The dual glutamatergic/GABAergic phenotype of hippocampal granule cells. In: *Co-Existence and Co-Release of Classical Neurotransmitters*, pp 1-21. Springer.
- Gutiérrez R (2009b) Phenotypic Plasticity of the Granule Cells and its Relation to Epilepsy. In: Philip A. Schwartzkroin, editor *Encyclopedia of Basic Epilepsy Research*, Vol 1, pp. 463-472. Oxford: Academic Press.
- Gutiérrez, R., Heinemann, U. (1999). Synaptic reorganization in explanted cultures of rat hippocampus. *Brain research*, 815(2), 304-316.
- Gutiérrez R, Heinemann U (2001) Kindling induces transient fast inhibition in the dentate gyrus--CA3 projection. *Eur J Neurosci* 13:1371-1379.

- Gutiérrez, R., & Heinemann, U. (2006). Co-existence of GABA and Glu in the hippocampal granule cells: implications for epilepsy. *Current topics in medicinal chemistry*, 6(10), 975-978.
- Gutiérrez R, Romo-Parra H, Maqueda J, Vivar C, Ramirez M, Morales MA, Lamas M (2003) Plasticity of the GABAergic phenotype of the "glutamatergic" granule cells of the rat dentate gyrus. *J Neurosci* 23:5594-5598.
- Hafting T, Fyhn M, Molden S, Moser MB, Moser EI (2005) Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. *Nature* 436:801-806
- Haage, D., Karlsson, U., & Johansson, S. (1998). Heterogeneous presynaptic Ca²⁺ channel types triggering GABA release onto medial preoptic neurons from rat. *The Journal of Physiology*, 507(1), 77-91.
- Harrison, P. J. (2004). The hippocampus in schizophrenia: a review of the neuropathological evidence and its pathophysiological implications. *Psychopharmacology*, 174(1), 151-162.
- Hebb C. (1970) CNS at the cellular level: identity of transmitter agents. *Ann. Rev. Physiol.* 32. 165.-192.
- Heijtz, R. D., Wang, S., Anuar, F., Qian, Y., Björkholm, B., Samuelsson, A., Martin L. Hibberd, Hans Forsberg & Pettersson, S. (2011). Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(7), 3047-3052.
- Henze DA, Urban NN, Barrionuevo G (2000) The multifarious hippocampal mossy fiber pathway: a review. *Neuroscience* 98:407-427.
- Henze DA, Wittner L, Buzsáki G (2002) Single granule cells reliably discharge targets in the hippocampal CA3 network in vivo. *Nat Neurosci* 5:790-795.
- Hökfelt T, Lundberg JM, Schultzberg M, Johansson O, Skirboll L, Anggard A, Fredholm B, Hamberger B, Pernow B, Rehfeld J, Goldstein M (1980) Cellular localization of peptides in neural structures. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 210:63-77.
- Howell GA, Welch MG, Frederickson CJ (1984) Stimulation-induced uptake and release of zinc in hippocampal slices. *Nature* 308:736-738.
- Ishizuka, N., Cowan, W. M., & Amaral, D. G. (1995). A quantitative analysis of the dendritic organization of pyramidal cells in the rat hippocampus. *Journal of Comparative Neurology*, 362(1), 17-45.
- Ishizuka, N., Weber, J., & Amaral, D. G. (1990). Organization of intrahippocampal projections originating from CA3 pyramidal cells in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 295(4), 580-623.
- Jack CR, Jr., Petersen RC, Xu Y, O'Brien PC, Smith GE, Ivnik RJ, Tangalos EG, Kokmen E (1998) Rate of medial temporal lobe atrophy in typical aging and Alzheimer's disease. *Neurology* 51:993-999.
- Jaffe DB, Gutiérrez R (2007) Mossy fiber synaptic transmission: communication from the dentate gyrus to area CA3. *Prog Brain Res* 163:109-805.

- Jang IS, Nakamura M, Ito Y, Akaike N (2006) Presynaptic GABAA receptors facilitate spontaneous glutamate release from presynaptic terminals on mechanically dissociated rat CA3 pyramidal neurons. *Neuroscience* 138:25-35.
- Jo, Y. H., & Schlichter, R. (1999). Synaptic corelease of ATP and GABA in cultured spinal neurons. *Nature neuroscience*, 2(3), 241-245.
- Jonas P, Major G, Sakmann B (1993) Quantal components of unitary EPSCs at the mossy fibre synapse on CA3 pyramidal cells of rat hippocampus. *J Physiol* 472:615-663.
- Jonas P, Bischofberger J, Sandkuhler J (1998) Corelease of two fast neurotransmitters at a central synapse. *Science* 281:419-424.
- Kaila K (1994) Ionic basis of GABAA receptor channel function in the nervous system. *Prog Neurobiol* 42:489-537.
- Kamiya H, Shinozaki H, Yamamoto C (1996) Activation of metabotropic glutamate receptor type 2/3 suppresses transmission at rat hippocampal mossy fibre synapses. *J Physiol* 493 (Pt 2):447-455.
- Kamiya, H., & Ozawa, S. (1999). Dual mechanism for presynaptic modulation by axonal metabotropic glutamate receptor at the mouse mossy fibre-CA3 synapse. *The Journal of physiology*, 518(2), 497-506.
- Kamp, M. A., Hänggi, D., Steiger, H. J., & Schneider, T. (2012). Diversity of presynaptic calcium channels displaying different synaptic properties. *Reviews in the Neurosciences*, 23(2), 179-190.
- Karlsson, U., Sundgren, A. K., Nasstrom, J. & Johansson, S. (1997). Glutamate-evoked currents in acutely dissociated neurons from the rat medial preoptic nucleus. *Brain Research* 759, 270—276.
- Kasyanov, A. M., Safiulina, V. F., Voronin, L. L., & Cherubini, E. (2004). GABA-mediated giant depolarizing potentials as coincidence detectors for enhancing synaptic efficacy in the developing hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(11), 3967-3972.
- Katz, B., & Miledi, R. (1965). The measurement of synaptic delay, and the time course of acetylcholine release at the neuromuscular junction. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 161(985), 483-495.
- Katz, B., & Miledi, R. (1968). The role of calcium in neuromuscular facilitation. *The Journal of physiology*, 195(2), 481-492.
- Kay, A. R., & Wong, R. K. (1986). Isolation of neurons suitable for patch-clamping from adult mammalian central nervous systems. *Journal of neuroscience methods*, 16(3), 227-238.
- Kay, A. R., & Krupa, D. J. (1997). Acute isolation of neurons from the mature mammalian central nervous system. *Current Protocols in Neuroscience*, 6.5.1-6.5.7
- Kesner, R. P. (2007). Behavioral functions of the CA3 subregion of the hippocampus. *Learning & memory*, 14(11), 771-781.

- Klein, R. (2010). Topography in Hippocampal Mossy Fiber Plasticity. *Neuron*, 65(5), 580-582.
- Kobayashi K, Poo MM (2004) Spike train timing-dependent associative modification of hippocampal CA3 recurrent synapses by mossy fibers. *Neuron* 41:445-454.
- Koch, C. (2004). *Biophysics of computation: information processing in single neurons*. Oxford university press.
- Kohara, K., Pignatelli, M., Rivest, A. J., Jung, H. Y., Kitamura, T., Suh, J. & Tonegawa, S. (2013). Cell type-specific genetic and optogenetic tools reveal hippocampal CA2 circuits. *Nature neuroscience*.
- Koyama, S., Kubo, C., Rhee, J. S., & Akaike, N. (1999). Presynaptic serotonergic inhibition of GABAergic synaptic transmission in mechanically dissociated rat basolateral amygdala neurons. *The Journal of Physiology*, 518(2), 525-538.
- Krieger DT (1983) Brain peptides: what, where, and why. *Science* 222:975–985
- Krnjevic K. (1974) Chemical nature of synaptic transmission in vertebrates. *Physiol. Rev.* 54. 418-440.
- Kullmann DM (2001) Presynaptic kainate receptors in the hippocampus: slowly emerging from obscurity. *Neuron* 32:561-564.
- Kullmann, D. M. (2007). Synaptic function. In: *The Hippocampus Book* (Anderson P, Morris R, Amaral DG, Bliss, O'Keefe J, eds), pp 203-231. Oxford University Press.
- Kullmann, D. M., Ruiz, A., Rusakov, D. M., Scott, R., Semyanov, A., & Walker, M. C. (2005). Presynaptic, extrasynaptic and axonal GABA_A receptors in the CNS: where and why?. *Progress in biophysics and molecular biology*, 87(1), 33-46.
- Kupfermann I (1991) Functional studies of cotransmission. *Physiol Rev* 71:683-732.
- Kwon HB, Castillo PE (2008a) Long-term potentiation selectively expressed by NMDA receptors at hippocampal mossy fiber synapses. *Neuron* 57:108-120.
- Kwon HB, Castillo PE (2008b) Role of glutamate autoreceptors at hippocampal mossy fiber synapses. *Neuron* 60:1082-1094.
- Lamas M, Gomez-Lira G, Gutiérrez R (2001) Vesicular GABA transporter mRNA expression in the dentate gyrus and in mossy fiber synaptosomes. *Brain Res Mol Brain Res* 93:209-214.
- Lanthorn TH, Ganong AH, Cotman CW (1984) 2-Amino-4-phosphonobutyrate selectively blocks mossy fiber-CA3 responses in guinea pig but not rat hippocampus. *Brain Res* 290:174-178.
- Langley JN (1905) On the reactions of cells and nerve-endings to certain poisons, chiefly as regards the reaction of striated muscle to nicotine and curari. *J Physiol Lond* 33:374–413

- Lara, E., Beltrán, J. Q., Segovia, J., & Gutiérrez, R. (2012). Granule cells born in the adult rat hippocampus can regulate the expression of GABAergic markers. *Experimental neurology*, 237(1), 134-141.
- Lawrence JJ, Grinspan ZM, McBain CJ (2004) Quantal transmission at mossy fibre targets in the CA3 region of the rat hippocampus. *J Physiol* 554:175-193.
- Leutgeb, J. K., & Moser, E. I. (2007). Enigmas of the dentate gyrus. *Neuron*, 55(2), 176-178.
- Li, L., Bischofberger, J., & Jonas, P. (2007). Differential gating and recruitment of P/Q-, N-, and R-type Ca²⁺ channels in hippocampal mossy fiber boutons. *The Journal of Neuroscience*, 27(49), 13420-13429.
- Liu, G., & Tsien, R. W. (1995). Properties of synaptic transmission at single hippocampal synaptic boutons. *Nature*, 375(6530), 404-408.
- Loewi O. (1921) Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung. *Pflügers Arch* 189:239–242
- Lømo (2003) The discovery of long-term potentiation. *Philosophical Transactions: Biological Sciences* 358:617-620.
- Lorente de Nó, R. (1934). Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system. *Journal für Psychologie und Neurologie*.
- Losonczy A, Biro AA, Nusser Z (2004) Persistently active cannabinoid receptors mute a subpopulation of hippocampal interneurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:1362-1367.
- Maccaferri, G., Tóth, K., & McBain, C. J. (1998). Target-specific expression of presynaptic mossy fiber plasticity. *Science*, 279(5355), 1368-1371.
- Maglóczy Z, Freund TF (2005) Impaired and repaired inhibitory circuits in the epileptic human hippocampus. *Trends Neurosci* 28:334-340.
- Manzoni OJ, Castillo PE, Nicoll RA (1995) Pharmacology of metabotropic glutamate receptors at the mossy fiber synapses of the guinea pig hippocampus. *Neuropharmacology* 34:965-971.
- Maqueda J, Ramirez M, Lamas M, Gutiérrez R (2003) Glutamic acid decarboxylase (GAD)67, but not GAD65, is constitutively expressed during development and transiently overexpressed by activity in the granule cells of the rat. *Neurosci Lett* 353:69-71.
- Merighi A (2002) Costorage and coexistence of neuropeptides in the mammalian CNS. *Prog Neurobiol* 66:161-190.
- Miledi R, Molinoff P, Potter LT (1971) Isolation of the cholinergic receptor protein of Torpedo electric tissue. *Nature* 229:554–557.
- Miles R, Wong RK (1987) Inhibitory control of local excitatory circuits in the guinea-pig hippocampus. *J Physiol* 388:611-629.

- Miles, R., Tóth, K., Gulyás, A. I., Hájos, N., & Freund, T. F. (1996). Differences between somatic and dendritic inhibition in the hippocampus. *Neuron*, 16(4), 815-823.
- Mori, M., Abegg, M. H., Gähwiler, B. H., & Gerber, U. (2004). A frequency-dependent switch from inhibition to excitation in a hippocampal unitary circuit. *Nature*, 431(7007), 453-456.
- Morris, R. (2007). Theories of hippocampal function. In: *The Hippocampus Book* (Anderson P, Morris R, Amaral DG, Bliss, O'Keefe J, eds), pp 37-114. Oxford University Press.
- Moulder, K. L., Jiang, X., Taylor, A. A., Shin, W., Gillis, K. D., & Mennerick, S. (2007). Vesicle pool heterogeneity at hippocampal glutamate and GABA synapses. *The Journal of Neuroscience*, 27(37), 9846-9854.
- Muotri, A. R., & Gage, F. H. (2006). Generation of neuronal variability and complexity. *Nature*, 441(7097), 1087-1093.
- Nicoll RA, Schmitz D (2005) Synaptic plasticity at hippocampal mossy fibre synapses. *Nat Rev Neurosci* 6:863-876.
- Nicholls, R. E., Zhang, X. L., Bailey, C. P., Conklin, B. R., Kandel, E. R., & Stanton, P. K. (2006). mGluR2 acts through inhibitory G α subunits to regulate transmission and long-term plasticity at hippocampal mossy fiber-CA3 synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(16), 6380-6385.
- Nishimaru H, Restrepo CE, Ryge J, Yanagawa Y, Kiehn O (2005) Mammalian motor neurons corelease glutamate and acetylcholine at central synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:5245-5249.
- O'Keefe J (1976) Place units in the hippocampus of the freely moving rat. *Exp Neurol* 51:78-109.
- O'Keefe, J., Dostrovsky, J. (1971). The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain research*, 34(1), 171-175.
- O'Malley DM, Masland RH (1989) Co-release of acetylcholine and gamma-aminobutyric acid by a retinal neuron. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:3414-3418.
- Osorio, B., León, U., Galván, E. J., & Gutiérrez, R. (2013). Cocultures of GFP+-granule cells with GFP--pyramidal cells and interneurons for the study of mossy fiber neurotransmission with paired recordings. *Hippocampus*, 23(4), 247-252.
- Ottersen OP, Storm-Mathisen J (1984) Neurons containing or accumulating transmitter amino acids. *Handbook of chemical neuroanatomy* 3:141-246.
- Paulsen, O., & Moser, E. (1998). A model of hippocampal memory encoding and retrieval: GABAergic control of synaptic plasticity. *Trends in neurosciences*, 21(7), 273-278.
- Peroutka SJ, Snyder SH (1981) Two distinct serotonin receptors: regional variations in receptor binding in mammalian brain. *Brain Res* 208:339-347
- Pin JP, Duvoisin R (1995) The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology* 34:1-26.

- Poncer, J. C., McKinney, R. A., Gähwiler, B. H., & Thompson, S. M. (1997). Either N-or P-type calcium channels mediate GABA release at distinct hippocampal inhibitory synapses. *Neuron*, 18(3), 463-472.
- Ramirez M, Gutiérrez R (2001) Activity-dependent expression of GAD67 in the granule cells of the rat hippocampus. *Brain Res* 917:139-146.
- Ren, M., Yoshimura, Y., Takada, N., Horibe, S., & Komatsu, Y. (2007). Specialized inhibitory synaptic actions between nearby neocortical pyramidal neurons. *Science*, 316(5825), 758-761.
- Rhee, J. S., Ishibashi, H., & Akaike, N. (1999). Calcium channels in the GABAergic presynaptic nerve terminals projecting to Meynert neurons of the rat. *Journal of neurochemistry*, 72(2), 800-807.
- Rizzoli, S. O., & Betz, W. J. (2005). Synaptic vesicle pools. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(1), 57-69.
- Roberts E, Frankel S (1950) Gamma-aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid. *J Biol Chem* 187:55-63
- Rolls, E. T., & Kesner, R. P. (2006). A computational theory of hippocampal function, and empirical tests of the theory. *Progress in neurobiology*, 79(1), 1-48.
- Romo-Parra, H., Trevino, M., Heinemann, U., & Gutiérrez, R. (2008). GABA actions in hippocampal area CA3 during postnatal development: differential shift from depolarizing to hyperpolarizing in somatic and dendritic compartments. *Journal of neurophysiology*, 99(3), 1523-1534.
- Ruiz A, Fabian-Fine R, Scott R, Walker MC, Rusakov DA, Kullmann DM (2003) GABAA receptors at hippocampal mossy fibers. *Neuron* 39:961-973.
- Ruiz A, Campanac E, Scott RS, Rusakov DA, Kullmann DM (2010) Presynaptic GABAA receptors enhance transmission and LTP induction at hippocampal mossy fiber synapses. *Nat Neurosci* 13:431-438.
- Ryan, T. J., & Grant, S. G. (2009). The origin and evolution of synapses. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(10), 701-712.
- Safiulina VF, Fattorini G, Conti F, Cherubini E (2006) GABAergic signaling at mossy fiber synapses in neonatal rat hippocampus. *J Neurosci* 26:597-608.
- Safiulina, V. F., & Cherubini, E. (2009). At immature mossy fibers-CA3 connections, activation of presynaptic GABAB receptors by endogenously released GABA contributes to synapses silencing. *Frontiers in cellular neuroscience*, 3, 1.
- Safiulina, V. F., Caiati, M. D., Sivakumaran, S., Bisson, G., Migliore, M., & Cherubini, E. (2010). Control of GABA release at mossy fiber-CA3 connections in the developing hippocampus. *Frontiers in synaptic neuroscience*, 2.
- Salin PA, Scanziani M, Malenka RC, Nicoll RA (1996) Distinct short-term plasticity at two excitatory synapses in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13304-13309.

- Sandler R, Smith AD (1991) Coexistence of GABA and glutamate in mossy fiber terminals of the primate hippocampus: an ultrastructural study. *J Comp Neurol* 303:177-192.
- Sara, Y., Bal, M., Adachi, M., Monteggia, L. M., & Kavalali, E. T. (2011). Use-dependent AMPA receptor block reveals segregation of spontaneous and evoked glutamatergic neurotransmission. *The Journal of Neuroscience*, 31(14), 5378-5382.
- Schmitz D, Mellor J, Frerking M, Nicoll RA (2001) Presynaptic kainate receptors at hippocampal mossy fiber synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:11003-11008.
- Schultzberg M, Hokfelt T, Lundberg JM (1982) Coexistence of classical transmitters and peptides in the central and peripheral nervous systems. *Br Med Bull* 38:309-313.
- Schwarzer C, Sperk G (1995) Hippocampal granule cells express glutamic acid decarboxylase-67 after limbic seizures in the rat. *Neuroscience* 69:705-709.
- Scoville WB, Milner B (1957) Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 20:11-21.
- Semyanov, A., Walker, M. C., & Kullmann, D. M. (2003). GABA uptake regulates cortical excitability via cell type-specific tonic inhibition. *Nature neuroscience*, 6(5), 484-490.
- Scharfman, H. E. (2007). The CA3 “backprojection” to the dentate gyrus. *Progress in brain research*, 163, 627-637.
- Sheline YI, Mittler BL, Mintun MA (2002) The hippocampus and depression. *Eur Psychiatry* 17 Suppl 3:300-305.
- Shepherd, G. M., & Erulkar, S. D. (1997). Centenary of the synapse: from Sherrington to the molecular biology of the synapse and beyond. *Trends in neurosciences*, 20(9), 385-392.
- Sherrington, C. S. (1897). *The central nervous system* (Foster M, Ed.) Vol. 3. Macmillan London.
- Sherrington, C. (1906). *The integrative action of the nervous system*. Yale University Press.
- Shigemoto R, Kinoshita A, Wada E, Nomura S, Ohishi H, Takada M, Flor PJ, Neki A, Abe T, Nakanishi S, Mizuno N (1997) Differential presynaptic localization of metabotropic glutamate receptor subtypes in the rat hippocampus. *J Neurosci* 17:7503-7522.
- Shin MC, Wakita M, Xie DJ, Iwata S, Akaike N (2011) Synergic effect of diazepam and muscimol via presynaptic GABA(A) receptors on glutamatergic evoked EPSCs. *Brain Res* 1416:1-9.
- Sloviter RS, Dichter MA, Rachinsky TL, Dean E, Goodman JH, Sollas AL, Martin DL (1996) Basal expression and induction of glutamate decarboxylase and GABA in excitatory granule cells of the rat and monkey hippocampal dentate gyrus. *J Comp Neurol* 373:593-618.

- Somogyi, J. (2006). Functional significance of co-localization of GABA and Glu in nerve terminals: a hypothesis. *Current topics in medicinal chemistry*, 6(10), 969-973.
- Somogyi, P., & Klausberger, T. (2005). Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus. *The Journal of physiology*, 562(1), 9-26.
- Spitzer, N. C. (2012). Activity-dependent neurotransmitter respecification. *Nature Reviews Neuroscience*, 13(2), 94-106.
- Squire LR, Zola SM (1996) Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13515-13522.
- Strata P, Harvey R (1999) Dale's principle. *Brain Res Bull* 50:349-350.
- Sutton, M. A., & Schuman, E. M. (2009). Partitioning the synaptic landscape: distinct microdomains for spontaneous and spike-triggered neurotransmission. *Science signaling*, 2(65), pe19.
- Szabadics, J., & Soltesz, I. (2009). Functional specificity of mossy fiber innervation of GABAergic cells in the hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, 29(13), 4239-4251.
- Taube JS, Muller RU, Ranck JB, Jr. (1990) Head-direction cells recorded from the postsubiculum in freely moving rats. I. Description and quantitative analysis. *J Neurosci* 10:420-435.
- Toni, N., Laplagne, D. A., Zhao, C., Lombardi, G., Ribak, C. E., Gage, F. H., & Schinder, A. F. (2008). Neurons born in the adult dentate gyrus form functional synapses with target cells. *Nature neuroscience*, 11(8), 901-907.
- Toth K, Suares G, Lawrence JJ, Philips-Tansey E, McBain CJ (2000) Differential mechanisms of transmission at three types of mossy fiber synapse. *J Neurosci* 20:8279-8289.
- Treves, A., Tashiro, A., Witter, M. P., & Moser, E. I. (2008). What is the mammalian dentate gyrus good for?. *Neuroscience*, 154(4), 1155-1172.
- Trevino M, Gutiérrez R (2005) The GABAergic projection of the dentate gyrus to hippocampal area CA3 of the rat: pre- and postsynaptic actions after seizures. *J Physiol* 567:939-949.
- Uchigashima, M., Fukaya, M., Watanabe, M., & Kamiya, H. (2007). Evidence against GABA release from glutamatergic mossy fiber terminals in the developing hippocampus. *The Journal of neuroscience*, 27(30), 8088-8100.
- Vida I, Frotscher M (2000) A hippocampal interneuron associated with the mossy fiber system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:1275-1280.
- Vogt KE, Nicoll RA (1999) Glutamate and gamma-aminobutyric acid mediate a heterosynaptic depression at mossy fiber synapses in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:1118-1122.
- Vorobjev VS (1991) Vibrodissociation of sliced mammalian nervous tissue. *J Neurosci Methods* 38:145-150.

- Walker MC, Ruiz A, Kullmann DM (2001) Monosynaptic GABAergic signaling from dentate to CA3 with a pharmacological and physiological profile typical of mossy fiber synapses. *Neuron* 29:703-715.
- Wang, S., Chen, X., Kurada, L., Huang, Z., & Lei, S. (2012). Activation of group II metabotropic glutamate receptors inhibits glutamatergic transmission in the rat entorhinal cortex via reduction of glutamate release probability. *Cerebral Cortex*, 22(3), 584-594.
- Wang, H., Peca, J., Matsuzaki, M., Matsuzaki, K., Noguchi, J., Qiu, L., ... & Augustine, G. J. (2007). High-speed mapping of synaptic connectivity using photostimulation in Channelrhodopsin-2 transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(19), 8143-8148.
- Wasser, C. R., & Kavalali, E. T. (2009). Leaky synapses: regulation of spontaneous neurotransmission in central synapses. *Neuroscience*, 158(1), 177-188.
- Whittaker VP, Dowdall MJ, Boyne AF (1972) The storage and release of acetylcholine by cholinergic nerve terminals: recent results with non-mammalian preparations. *Biochem Soc Symp*49-68.
- Witter, M. P. (1993). Organization of the entorhinal—hippocampal system: A review of current anatomical data. *Hippocampus*, 3(S1), 33-44.
- Yamamoto, S., Yoshimura, M., Shin, M. C., Wakita, M., Nonaka, K., & Akaike, N. (2011). GABA_A receptor-mediated presynaptic inhibition on glutamatergic transmission. *Brain research bulletin*, 84(1), 22-30.
- Zander JF, Munster-Wandowski A, Brunk I, Pahner I, Gomez-Lira G, Heinemann U, Gutiérrez R, Laube G, Ahnert-Hilger G (2010) Synaptic and vesicular coexistence of VGLUT and VGAT in selected excitatory and inhibitory synapses. *J Neurosci* 30:7634-7645.
- Zheng JJ, Lee S, Zhou ZJ (2004) A developmental switch in the excitability and function of the starburst network in the mammalian retina. *Neuron* 44:851-864.
- Zola-Morgan, S., Squire, L. R., & Amaral, D. G. (1986). Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, 6(10), 2950-2967.

APÉNDICE

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis fueron publicados en los siguientes artículos:

Beltrán, J. Q., Reyes, S., Pérez-Guzmán, J. A., Elías-Viñas, D., & Gutiérrez, R. (2012). Dissociation of CA3 pyramidal cells with attached, functional, identified mossy fiber and interneuronal boutons for studying glutamatergic and GABAergic synaptic transmission. *Journal of neuroscience methods*, 208(2), 155-160.

Beltrán, J. Q., & Gutiérrez, R. (2012). Co-release of glutamate and GABA from single, identified mossy fibre giant boutons. *The Journal of physiology*, 590(19), 4789-4800.

Este último artículo por su relevancia fue seleccionado por el editor (Editor's Choice) y reseñado en el siguiente artículo de *The Journal of Physiology*:

Tóth, K. (2012). Juvenile mossy fibres: two pipers in the same pub?. *The Journal of physiology*, 590(19), 4639-4639.