

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
Del Instituto Politécnico Nacional
Sede Sur

Departamento de Farmacobiología

**Modulación de la transmisión sináptica entre las fibras musgosas
y las interneuronas de hipocampales por activación del receptor
TrkB**

Tesis que presenta:

Q.F.B. Ernesto Griego Melo

Para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias en

Neurofarmacología y Terapéutica Experimental

Director de Tesis: Dr. Emilio Javier Galván Espinosa

Q.F.B. Ernesto Griego Melo

Q.F.B. Ernesto Griego Melo

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio 9, bajo la dirección del Dr. Emilio Javier Galván Espinosa, en las instalaciones del departamento de Farmacobiología de la Unidad Sur del Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, con el apoyo otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología mediante la beca 614008.

Q.F.B. Ernesto Griego Melo

Agradecimientos

Al CONACyT y al CINVESTAV por facilitar los recursos e instalaciones para desarrollar esta tesis.

Al Dr. Emilio Galván por depositar su confianza en este proyecto y en mi persona, así como por tener la paciencia y plena disposición en mi paulatina inserción en su equipo de trabajo.

A mi comité sinodal:

Dr. Rafael Gutiérrez Aguilar

Dr. Luís Tovar y Romo

Dr. Pavel Montes de Oca Balderas

Por su atinados y muy valiosos comentarios.

A la Dra. Gisela Gómez Lira por su enorme ayuda con las técnicas inmunohistoquímicas y por sus consejos en torno a mi proyecto.

A mis compañeros de laboratorio Gabriel, Melissa, Jesús, Monserrat y Jonatan; así como a Rocío, Isabel y Pepe Chuy por hacer amenos estos dos años en el laboratorio, por los momentos divertidos y por sus enseñanzas.

A nuestro técnico Juan Javier por su apoyo y por cada taza de rocambolesco café.

A los amigo/as que durante este periodo he conocido y les tengo en gran estima.

A Deisy, por ser siempre paciente y amorosa. Por decir siempre lo que piensas y, afortunadamente, casi nunca pensar como yo. Por el espacio que ocupas en mi vida.

A mis padres y hermanos, que han estado siempre presentes en cada paso que he decidido tomar en la vida. Por ser mi ejemplo, mi potencia y mi motor. A ustedes les dedico este logro, y los venideros.

A todos los que han contribuido para que hoy esté aquí, amigos del alma. Gracias.

Q.F.B. Ernesto Griego Melo

“Sin nombre, sin edad, sin fronteras, libre de todo, incluso de mí mismo, desaparecer en lo impensable. La meta de la vida es morir contento.”

Alejandro Jodorowsky

Índice

Abreviaturas.....	i
Índice de figuras y tablas.....	iii
Resumen.....	v
Abstract.....	vi
Introducción.....	1
La formación del hipocampo.....	1
Interneuronas.....	3
Sinapsis fibra musgosa – interneurona de CA3.....	5
Plasticidad a largo plazo en la sinapsis FM – interneurona de CA3.....	7
Receptor TrkB.....	8
Señalización por PI3K/Akt.....	10
Señalización por Ras/MAPK.....	10
Señalización por PLC γ	11
Modulación de la transmisión sináptica por el receptor TrkB.....	12
Modulación de la excitabilidad intrínseca por el receptor TrkB.....	13
Justificación.....	15
Hipótesis.....	16
Objetivos.....	16
Material y métodos.....	17
Registros electrofisiológicos.....	17
Inmunohistofluorescencia.....	21

Análisis estadístico.....	22
Resultados.....	23
Caracterización de los patrones de disparo y transmisión sináptica de interneuronas de CA3.....	23
Las interneuronas de CA3 expresan al receptor TrkB.....	26
La activación del receptor TrkB no modifica el disparo de las interneuronas de CA3.....	28
La activación del receptor TrkB modifica la fuerza de la transmisión sináptica en las interneuronas de CA3.....	31
El bloqueo farmacológico del receptor TrkB previene la inducción de la potenciación en interneuronas de disparo regular del <i>stratum lucidum</i>	37
Discusión.....	39
Propiedades intrínsecas y de disparo de las interneuronas de CA3.....	39
La expresión del receptor TrkB en interneuronas de CA3.....	41
Modificación de las propiedades de disparo de las interneuronas de CA3 por el receptor TrkB.....	41
Efecto de la activación del receptor TrkB en la transmisión sináptica de interneuronas de CA3.....	42
Conclusión.....	45
Perspectivas.....	45
Bibliografía.....	46

Abreviaturas

7,8-DHF:	7,8-dihidroxi flavona
Akt:	Proteína cinasa B
AMPA:	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
AMPAR:	Receptor del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
ANA-12:	<i>N</i> -[2-[[<i>(</i> Hexahidro-2-oxo-1 <i>H</i> -azepin-3-yl)amino]carbonil]fenil]tiofeno-2-carboxamida
AP-V:	Ácido 2-amino-5-fosfovaleriánico
BDNF:	Factor Neurotrófico Derivado de Cerebro
CA1, 2 y 3:	Cornu ammonis 1,2 y 3
CaMKII:	Cinasa dependiente de calcio-calmodulina
CG:	Célula granular
CI-AMPA:	Receptor AMPA impermeable a calcio
CP-AMPA:	Receptor AMPA permeable a calcio
CREB:	Elemento de respuesta a AMP cíclico
DAG:	Diacilglicerol
DCG-IV:	(2 <i>S</i> ,2' <i>R</i> ,3' <i>R</i>)-2-(2',3'-dicarboxiciclopropil)glicina
EPSC:	Corriente postsináptica excitadora
ERK:	Cinasas reguladas por señales extracelulares
FM:	Fibra musgosa
FPP:	Facilitación por pulso pareado
GABA:	Ácido gamma-amino butírico
GD:	Giro dentado
HFS:	Estimulación a alta frecuencia
IN:	Interneurona
IP3:	Inositol trifosfato
LTP:	Potenciación a largo plazo

LTD:	Depresión a largo plazo
MAPK:	Proteínas cinasas activadas por mitógeno
mTOR:	Diana de rapamicina de mamífero
NFκB:	Factor nuclear kappa B
NGF:	Factor de crecimiento neuronal
NMDA:	N-metil-D-Aspartato
NT3:	Neurotrofina 3
NT4:	Neurotrofina 4
P75:	Receptor de proBDNF
PDK:	Proteína cinasa dependiente de fosfoinosítido
PI3K:	Fosfoinositol-3-cinasa
PLC-gamma:	Fosfolipasa C gamma
PRAS40:	Sustrato de Akt rico en prolina de 40 kD
PTX:	Picrotoxina
Ras:	Proteína reguladora cuyo nombre deriva de <i>rats sarcoma</i>
Red C/A:	Red comisural/asociacional
SH2:	Dominio con homología con <i>src 2</i>
SL:	<i>stratum lucidum</i>
FS-SL:	Interneurona de disparo rápido del <i>stratum lucidum</i>
SL-IN:	Interneurona del <i>stratum lucidum</i>
RS-SL:	Interneurona de disparo regular del <i>stratum lucidum</i>
SO:	<i>stratum oriens</i>
SO-IN:	Interneurona del <i>stratum oriens</i>
SP:	<i>stratum pyramidale</i>
TrkB:	Receptor cinasa de tropomiosina B
Y:	Residuo de tirosina

Índice de figuras y tablas.

Figura 1. Plano sagital de la formación hipocampal.....	2
Figura 2. Control GABAérgico mediante interneuronas distribuidas en CA3.....	4
Figura 3. Micrografías electrónicas de terminales de la fibra musgosa.....	5
Figura 4. Propiedades biofísicas de los receptores CP y CI-AMPA.....	6
Figura 5. Curso temporal de pendientes de EPSCs de interneuronas de CA3.....	7
Figura 6. Vías de señalización mediadas por receptores Trk en el SNC.....	9
Figura 7. Vía de la fosfolipasa C gamma/IP3.....	11
Figura 8. La activación de TrkB por BDNF induce procesos de plasticidad sináptica.....	13
Figura 9. Características de disparo de interneuronas de CA3.....	24
Figura 10. Características de los EPSCs evocados en la fibra musgosa.....	25
Figura 11. Inmunohistofluorescencia de CA3 mostrando coexpresión para GAD-67, calbindina y TrkB en interneurona del <i>stratum lucidum</i>	26
Figura 12. Inmunohistofluorescencia de CA3 mostrando coexpresión para GAD-67, calretinina y TrkB en interneurona del <i>stratum lucidum</i>	27
Figura 13. Inmunohistofluorescencia de CA3 mostrando coexpresión para GAD-67, parvalbúmina y TrkB en interneurona del <i>stratum oriens</i>	27
Figura 14. La activación de TrkB no modifica el disparo en interneuronas del <i>stratum oriens</i>	28
Figura 15. La activación de TrkB no modifica el disparo en interneuronas de disparo rápido del <i>stratum lucidum</i>	29
Figura 16. La activación de TrkB no modifica el disparo en interneuronas de disparo regular del <i>stratum lucidum</i>	29
Figura 17. La estimulación de TrkB no modifica la cinética del potencial de acción en interneuronas de CA3.....	30

Figura 18. La estimulación a alta frecuencia de la fibra musgosa no induce LTP en interneuronas de CA3.....	32
Figura 19. La estimulación del receptor TrkB induce LTP en interneuronas disparo regular del <i>stratum lucidum</i>	34
Figura 20. La estimulación del receptor TrkB no induce LTP en interneuronas disparo rápido del <i>stratum lucidum</i>	35
Figura 21. La estimulación del receptor TrkB induce diversos fenómenos en las interneuronas del <i>stratum oriens</i>	36
Figura 22. La LTP exhibida por las interneuronas de disparo regular del <i>stratum lucidum</i> es dependiente del receptor TrkB.....	38
Tabla 1. Agentes farmacológicos empleados en los experimentos.....	20
Tabla 2. Propiedades intrínsecas de interneuronas de CA3.....	23

Resumen

El BDNF es una neurotrofina que activa principalmente al receptor TrkB, a través del cual ejerce muchos de sus efectos en el sistema nervioso central. Este receptor se encuentra ampliamente expresado en todo el sistema nervioso central, pero es en la formación hipocampal donde se halla en mayor abundancia, particularmente en la región CA3.

En este trabajo caracterizamos los efectos de la activación del receptor TrkB sobre las propiedades del disparo y de la transmisión sináptica excitadora en las interneuronas de los estrata *oriens* y *lucidum* de la región CA3 hipocampal mediante registros de *whole-cell patch-clamp*. La perfusión de BDNF o del agonista selectivo del receptor TrkB, el 7,8-DHF, no modifica las características cinéticas del potencial de acción ni la frecuencia de disparo en estas células.

Sin embargo, identificamos que al activar al receptor TrkB, ya sea por BDNF o 7,8-DHF, se induce potenciación sináptica en la sinapsis entre las fibras musgosas y las interneuronas de disparo regular del *stratum lucidum*. Lo cual no se observó en interneuronas de disparo rápido. Al repetir el mismo protocolo experimental, pero en presencia de ANA-12, un antagonista no competitivo del receptor TrkB, se abole totalmente la inducción de LTP.

En conclusión, nuestros resultados aportan evidencia que las interneuronas de CA3 expresan al receptor TrkB y, además, son susceptibles de potenciación sináptica por la estimulación de este receptor. Esta tesis brinda nueva información acerca de la fisiología celular de las interneuronas de CA3 y de la sinapsis que en ellas hacen las fibras musgosas.

Abstract

BDNF is a neurotrophin that activates mainly the TrkB receptor, through which it exerts many of its effects on the central nervous system. This receptor is widely expressed throughout the central nervous system, but it is in the hippocampal formation that it is found in greatest abundance, particularly in the CA3 region.

In this work, we characterize the effects of TrkB receptor activation on firing properties and synaptic transmission in the interneurons of the strata *oriens* and *lucidum* of the hippocampal CA3 region by whole-cell patch-clamp records. The perfusion of BDNF or the selective agonist of the TrkB receptor, 7,8-DHF, does not modify the kinetic characteristics of the action potential or the firing frequency in these cells.

However, we identified that activating the TrkB receptor, either by BDNF or 7,8-DHF, induces synaptic potentiation at the synapse between the mossy fibers and the regular spiking interneurons of the *stratum lucidum*. This was not observed in fast spiking interneurons. By repeating the same experimental protocol, but in the presence of ANA-12, a noncompetitive antagonist of the TrkB receptor, the induction of LTP is completely abolished.

In conclusion, our results provide evidence that the CA3 interneurons express the TrkB receptor and, in addition, are susceptible to synaptic potentiation by the stimulation of this receptor. This thesis provides new information about the cellular physiology of CA3 interneurons and the synapse that the mossy fibers make in them.

1. Introducción

1.1. La formación del hipocampo

El hipocampo es una estructura localizada en el lóbulo temporal que participa en los procesos de formación de la memoria y en la codificación de la localización espacial, y que junto con el giro dentado constituyen la formación hipocampal. Anatómicamente, desde una perspectiva coronal, el hipocampo tiene una estructura en forma de C que protruye hacia el cuerno inferior del ventrículo lateral. Se subdivide en cuernos de Amón (CA) 3, 2 y 1. La región CA3 se localiza en la división inferior de la estructura. Desde su capa más profunda hasta la superficie, el hipocampo ha sido dividido en 5 a 6 capas o estratos: *stratum oriens*, *stratum pyramidale*, *stratum lucidum* (localizado únicamente en la región CA3), *stratum radiatum* y *stratum lacunosum-moleculare*.

En el hipocampo existen dos grandes familias de neuronas, las neuronas principales o piramidales, y las interneuronas. Las neuronas piramidales tienen su soma localizado en el *stratum pyramidale*, mientras que las interneuronas se distribuyen en todos los *strata* hipocampales. De este segundo grupo profundizaremos más adelante.

Por otro lado, el giro dentado (GD) consta de 3 capas: el *stratum granulosum* en el cual se agrupan los somas de las neuronas principales del giro dentado (células granulares), una zona sin cuerpos celulares denominada *stratum moleculare* y una capa difusa justo por debajo de la capa granular que se denomina *hilus*, sitio donde se encuentran interneuronas y células musgosas. Los axones que emergen de las células granulares, conocidos genéricamente como fibras musgosas (FM), constituyen la principal aferencia excitadora a la región CA3 hipocampal.

El papel fisiológico de la formación hipocampal está íntimamente ligado con su estructura arquitectónica (Lisman 1999), por lo que su organización anatómica y funcional es de particular relevancia. En este contexto, las tres principales vías excitadoras en el hipocampo han sido profundamente investigadas (Figura 1), y en conjunto, se conocen como “circuito trisináptico”, denominación basada en el flujo

de información a través de la estructura hipocampal (Andersen, Bliss, and Skrede 1971).

El primer relevo sináptico al hipocampo es externo, mediante los axones de las células piramidales de la capa II de la corteza entorrinal (o vía perforante), que hacen sinapsis con células granulares del GD y con la región dendrítica distal de las neuronas piramidales de CA3. Las células granulares envían sus axones (fibras musgosas) a través del *stratum lucidum* (SL) de la región CA3 donde contactan a neuronas piramidales e interneuronas GABAérgicas. Las neuronas piramidales de CA3 envían sus axones (colaterales de Schaffer) a la región CA1, pero también contactan a otras neuronas piramidales de CA3, formando una red de axones colaterales recurrentes de naturaleza excitadora (sinapsis comisural de asociación o sinapsis CA3-CA3). Por último, los axones de las neuronas principales de CA1 constituyen la salida de la información del hipocampo, la cual regresa a la corteza entorrinal y al subículo (Cappaert, Strien, and Witter 2015).

Dado que las interneuronas juegan un papel central en el control de la actividad y capacidad integrativa de los circuitos locales, se describirán con mayor detalle en la siguiente sección.

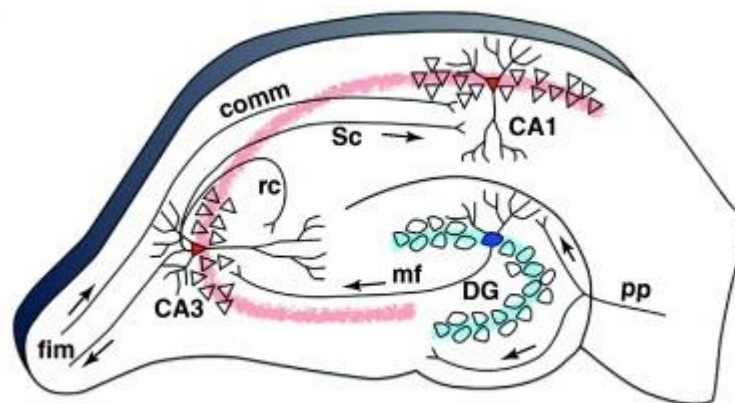


Figura 1. Plano sagital de la formación hipocampal. El esquema ilustra las principales vías de comunicación sináptica del hipocampo. Las neuronas de la corteza entorrinal (PP o perforant path, por sus siglas en inglés) envían sus axones al giro dentado y a la región CA3. Del giro dentado (DG) emanan las fibras musgosas (FM) que hacen contacto con las neuronas piramidales de CA3. Este grupo de neuronas, envía sus axones a la región CA1 (Colaterales de Schaffer) y también hace contactos locales (comisurales de asociación). Finalmente, los axones de CA1 hacen contacto con neuronas subiculares y de la corteza entorrinal (Modificado de Yassa and Stark 2011).

1.2. Interneuronas

Las interneuronas han sido definidas tradicionalmente como neuronas de plexo axonal restringido, con dendritas carentes de espinas que liberan ácido gamma-aminobutírico (GABA) (Shepherd, 2004). Además de contener GABA y las enzimas que lo sintetizan (descarboxilasa de ácido glutámico o GAD), las interneuronas poseen diversas proteínas de unión a calcio como parvalbúmina, calbindina y calretinina entre muchas otras. Además, contienen neuropéptidos como somatostatina y colecistocinina. La expresión de estas macromoléculas confiere una gran heterogeneidad a estas células. De hecho, no es exagerado decir que las interneuronas son las células más diversas y variadas de todo el sistema nervioso central (Freund and Buzsáki 1996; Maccaferri, Lacaille, and Einstein 2003; McBain 2001). La expresión de dichas moléculas se ha utilizado como un criterio para permitir su clasificación, sin embargo, agrupar a las interneuronas por criterios anatómicos o neuroquímicos resulta insuficiente para comprender su diversidad funcional. Esto ha dado lugar a nuevas propuestas de clasificación que incluyan criterios funcionales, como lo son la naturaleza de las entradas sinápticas que reciben (Yuan et al. 2017).

Las interneuronas juegan un papel central en el funcionamiento de las redes neuronales del hipocampo. Controlan tanto el número de células excitadoras activas, como su frecuencia de descarga. Además, juegan un papel central en la generación de oscilaciones en red (Jonas et al. 2004). De este último punto, vale la pena resaltar que las interneuronas del *stratum lucidum* (SL-IN) son responsables de la generación de oscilaciones en ritmo gamma, mientras que las interneuronas del *stratum oriens* (SO-IN) de las oscilaciones en ritmo theta en la región CA3 del hipocampo (Berridge 2009). Esto se debe a que estas interneuronas interactúan con diferentes regiones de las neuronas piramidales.

Las interneuronas localizadas somáticamente en el *stratum lucidum* (SL-IN) presentan una orientación perpendicular respecto al *stratum pyramidale* (SP), y de acuerdo a observaciones de nuestro laboratorio comprenden al menos dos subpoblaciones según su frecuencia de disparo, unas de alta frecuencia de disparo denominadas *fast spiking* (FS-IN), y otras de frecuencia regular denominadas

regular spiking (RS-IN). Respecto a las interneuronas somáticamente localizadas en el *stratum oriens* de CA3 la información es muy escasa, pero se acepta que existen diferentes subpoblaciones distinguibles según su distribución axodendrítica, y los marcadores bioquímicos que expresan (Aaron, Wilcox, and Dichter 2003).

Ambas poblaciones de interneuronas son contactadas por las fibras musgosas, y se ha determinado que modulan la actividad de las redes neurales de CA3 por medio de dos tipos de inhibición, denominadas de tipo proactiva positiva y negativa (*feedforward* y *feedback inhibition*, respectivamente) (McBain 2001). Las SL-IN median la inhibición proactiva positiva entre las fibras musgosas y las neuronas piramidales de CA3. En este mismo sentido, las interneuronas localizadas en el *stratum oriens* (SO-IN) probablemente proveen inhibición, tanto de tipo proactiva positiva como negativa, dentro de la red comisural/asociacional (C/A) de CA3, sin embargo, de este último grupo neuronal se tiene muy poca información. Mediante estos procesos, se logra la sincronización colectiva de las neuronas principales y se regula la plasticidad de las sinapsis glutamatérgicas (Galván, Cosgrove, and Barrionuevo 2011). De tal forma que ambos tipos de interneuronas juegan papeles importantes en la transferencia de la información y control de la excitabilidad en la región CA3 hipocampal (Lawrence and McBain 2003) (Figura 2).

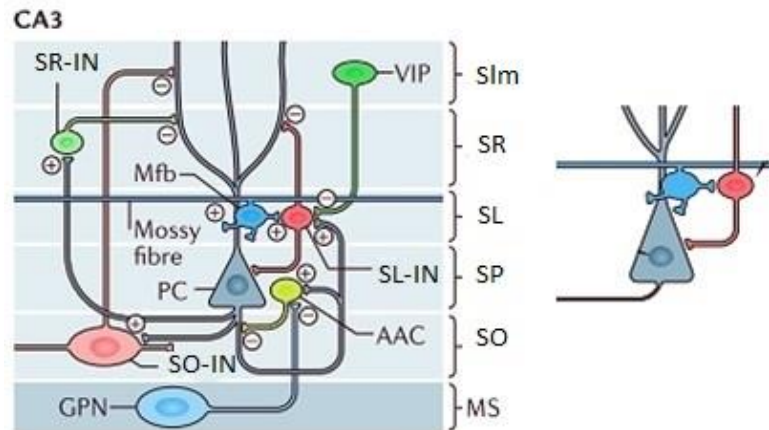


Figura 2. Tipos de sinapsis inhibitorias en diferentes clases de interneuronas de CA3. SR-IN, interneurona del stratum radiatum; VIP, péptido intestinal vasoactivo; Mfb, botón musgoso; PC, célula piramidal; SL-IN, interneurona del stratum lucidum; SO-IN, interneurona del stratum oriens; AAC, interneurona axoaxónica; GPN, interneurona de proyección; SIm, stratum lacunosum moleculare; SR, stratum radiatum; SL, stratum lucidum; SP, stratum pyramidale; SO, stratum oriens; MS, septum medial. (Modificado de Rebola, Carta, and Mulle 2017).

1.3. Sinapsis fibra musgosa - interneurona de CA3

Existe una gran cantidad de evidencia que sugiere que la conectividad que hace el giro dentado en CA3 es de particular importancia para la precisión mnemónica. El circuito formado entre las fibras musgosas y CA3 dicta los patrones de activación en esta región hipocampal, y se cree que media complejas tareas fisiológicas, tales como la separación y completamiento de patrones neuronales (Rebola, Carta, and Mulle 2017; Rollenhagen and Lübke 2010).

La fisiología sináptica del contacto que hacen las FM con las neuronas piramidales de CA3 ha sido descrita a detalle (Henze, Urban, and Barrionuevo 2000). Esta sinapsis se realiza a través de botones gigantes, denominados genéricamente como “botones musgosos” (figura 2), una especialización que comprende un gran número de sitios de liberación. En general, esta sinapsis exhibe una gran facilitación para muchos parámetros de plasticidad a corto plazo. Muchas de sus características fisiológicas resultan de la alta especialización del botón musgoso. Por otra parte, la sinapsis de las FM con interneuronas de CA3 se realiza a través de dos tipos de terminales diferentes al botón musgoso, denominadas *extensiones filopodiales* y terminales *en passant* (Figuras 2 y 3). Estos tipos de terminales ejercen efectos diferenciales en sus blancos postsinápticos, además de poseer mecanismos distintos para la recaptura y liberación de neurotransmisores.

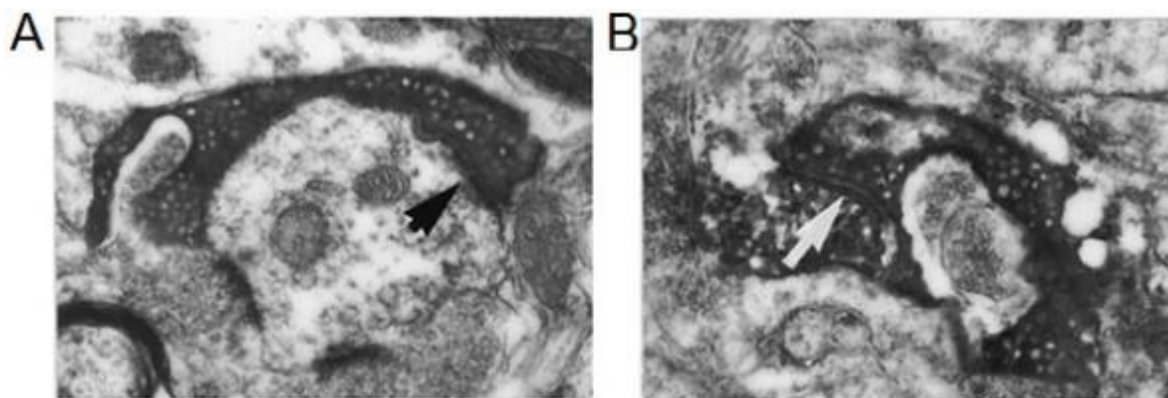


Figura 3. Micrografías electrónicas de una terminal en passant (A) y una extensión filopodial a lo largo de una fibra musgosa (B). Ambas contactando interneuronas de CA3. Las flechas señalan las densidades postsinápticas de la sinapsis. (Modificado de Acsády 1998).

A diferencia de la sinapsis que establecen las FM con las neuronas principales de CA3, la sinapsis FM-IN está caracterizada por poseer solo una o unas pocas zonas activas con una alta probabilidad de liberación, y en consecuencia presentan limitada facilitación a corto plazo.

Existe evidencia directa de la especialización funcional de las terminales presinápticas de la fibra musgosa. La transmisión sináptica entre las FM y las interneuronas del *stratum lucidum* está mediada por receptores glutamatérgicos tipo AMPA (AMPA) permeables e impermeables a calcio (CP-AMPA y CI-AMPA, respectivamente) (Tóth and McBain 1998). Las corrientes mediadas por CI-AMPA son caracterizadas por una rectificación saliente, insensibilidad a poliaminas y por conducir potasio y sodio, pero no calcio. Las corrientes mediadas por CP-AMPA muestran rectificación entrante en la relación I-V, son sensibles a poliaminas y tienen diferente cinética debido a su permeabilidad al calcio (figura 4). En este contexto, las interneuronas del *stratum lucidum*, expresan mayoritariamente CP-AMPA (Toth et al. 2000). Respecto a las interneuronas del *s. oriens* la información es prácticamente nula. Dicha expresión diferencial de los subtipos de receptores AMPA en las sinapsis entre las fibras musgosas y las neuronas de CA3 tiene implicaciones poderosas en la plasticidad sináptica a corto y largo plazo (Galván et al. 2011).

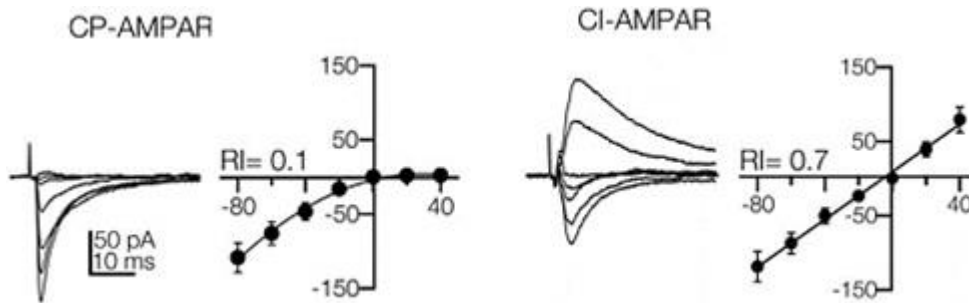


Figura 4. Propiedades biofísicas de los receptores CI y CP-AMPA. (Modificado de Galván et al. 2015)

1.3.1. Tipos de plasticidad a largo plazo en la sinapsis FM-Interneuronas de CA3

La plasticidad sináptica a largo plazo es definida como un cambio persistente en la fuerza sináptica de una conexión neuronal. La potenciación a largo plazo (LTP) implica un incremento en dicha fuerza sináptica (Bliss and Lomo 1973), mientras que la depresión a largo plazo (LTD) implica una debilitación de la conexión sináptica (Dudek and Bear 1992).

Estudios previos demostraron consistentemente que la forma predominante de plasticidad sináptica en la conexión FM – SL-IN es la depresión a largo plazo (LTD) (Maccaferri and Mcbain 1998), a diferencia de la sinapsis FM - neurona piramidal, donde predomina la potenciación a largo plazo (LTP) (Harris and Carl 1986). De acuerdo con lo expresado, se ha aceptado como noción estereotípica que los paradigmas experimentales de estimulación eléctrica en las FM se traducen en LTP en neuronas piramidales, pero en LTD en interneuronas (Nicoll and Schmitz 2005). Sin embargo, otros trabajos demostraron que, bajo ciertas condiciones experimentales (internalización de receptores mGluR 7), la sinapsis FM – SL-IN pueden expresar LTP (Pelkey et al., 2008).

A diferencia de lo reportado en las sinapsis FM – SL-IN, las interneuronas somáticamente localizadas en el *stratum radiatum* y *lacunosum-moleculare* de CA3 muestran una robusta potenciación de las transmisión sináptica tras la estimulación a alta frecuencia de las FM (Galván, Calixto, and Barrionuevo 2008) (Figura 5).

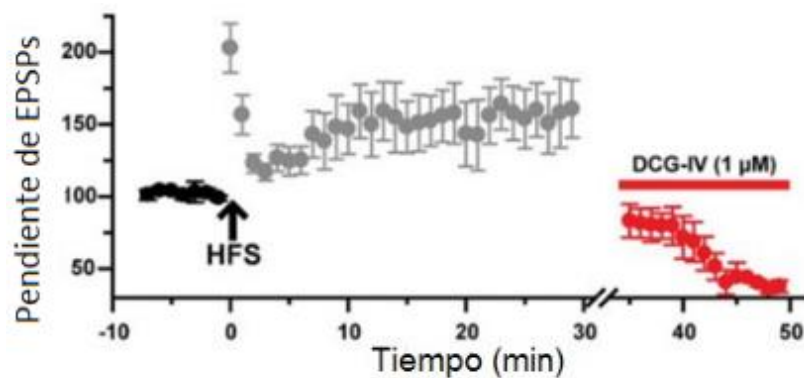


Figura 5. Curso temporal de pendientes de EPSPs registradas de interneuronas de CA3 antes y después de la inducción de LTP. (Modificado de Galván, Calixto, and Barrionuevo 2008).

1.4. Receptor TrkB

Tanto la transmisión sináptica como la excitabilidad intrínseca comparten la propiedad de ser modulables. Existe una gran diversidad de moléculas neuromoduladoras en el sistema nervioso central, un ejemplo claro de lo anterior son las neurotrofinas y sus receptores.

Las neurotrofinas son una familia de moléculas que comprende al menos 4 proteínas estructuralmente relacionadas, el Factor de Crecimiento Neural (NGF), las Neurotrofinas 3 y 4 (NT-3 y NT-4, respectivamente) y el Factor Neurotrófico Derivado de Cerebro (BDNF). Además de un grupo de moléculas conocidas como neurotrofinas no convencionales, que incluye al Factor Neurotrófico Derivado de la Glia (GDNF), al Factor Neurotrófico de Dopamina Cerebral (CDNF) y al Factor Neurotrófico Derivado de Astrocitos Mesencefálicos (MANF) (Airaksinen and Saarma 2002; Lindahl, Saarma, and Lindholm 2017).

El BDNF sobresale entre ese grupo debido a su alta expresión en la formación hipocampal y a sus potentes efectos a nivel sináptico. El BDNF comparte alrededor del 50% de su identidad primaria con las otras neurotrofinas clásicas.

Todas las neurotrofinas son sintetizadas inicialmente como proneurotrofinas, las cuales son sustratos de convertasas que las convierten a sus formas maduras al cortar en un punto de escisión exclusivo de cada neurotrofina (Gibon and Barker 2017). El pro-BDNF y la forma madura tienen actividad biológica diferente, dada su unión a diferentes receptores (Devin K. Binder 2004).

El BDNF se une a dos tipos de receptores no relacionados estructuralmente y expresados en la membrana celular. El receptor p75 y el receptor con actividad de tirosina cinasa, TrkB (Konnerth 2004). La unión del BDNF maduro con el TrkB ocurre con mucha mayor afinidad (10^{-11} M) que con el receptor p75 (10^{-9} M). Por el contrario, la forma inmadura se une con mayor afinidad al receptor p75. Esto es relevante desde un punto de vista funcional porque la señalización asociada a la activación de ambos receptores es de naturaleza antagónica. La señalización por p75 está asociada fundamentalmente a poda y muerte neuronal durante el neurodesarrollo (Joseph-Hernandez et al. 2017).

La unión del BDNF con el TrkB genera dimerización del receptor que resulta en la activación de su actividad de tirosina cinasa con la consecuente autofosforilación en múltiples residuos de tirosina; y en función del residuo de tirosina que se fosforile, será la vía de señalización intracelular que se activará (Minichiello 2009).

Dichos eventos de fosforilación crean sitios específicos de unión para proteínas intracelulares que participan en las cascadas transduccionales propias de este receptor, las cuales se acoplan a los sitios fosforilados mediante dominios SH2 (Patapoutian and Reichardt 2001).

La unión de estas proteínas conlleva la activación de diferentes vías de señalización que incluyen, a la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK), la vía de fosfatidilinositol-3-OH cinasa/Akt (PI3K/Akt), y la vía de la fosfolipasa C gamma (PLC- γ) (Kaplan et al. 2000; Minichiello et al. 2002) (Figura 6).

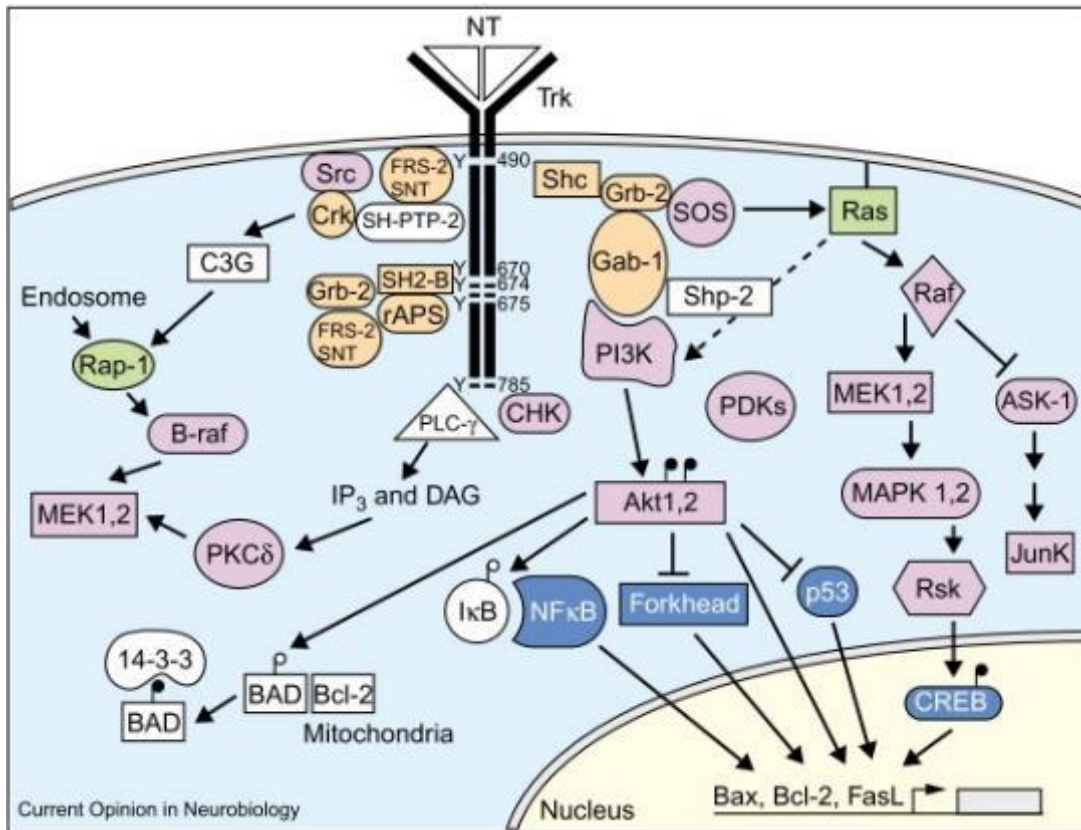


Figura 6. Vías de señalización mediadas por receptores Trk en el sistema nervioso central. Modificado de Patapoutian and Reichardt 2001.

1.4.1. Señalización por la vía de PI3K/Akt

La activación de la vía PI3K/Akt – dependiente de Ras es la principal vía de supervivencia en neuronas centrales (Williams and Doherty 1999), sin embargo, PI3K/Akt también puede ser activada mediante proteínas adaptadoras tales como Shc, Grb-2 y Gab-1. La activación de esta vía está relacionada con la fosforilación del residuo de tirosina Y490 (Biaric et al. 2013). Los productos generados por PI3K reclutan diversas proteínas con dominios PH, incluyendo a Akt cinasa y cinasas dependientes de fosfoinosítidos (PDKs).

Recientes estudios del laboratorio demostraron la participación directa de esta vía de señalización en la neuroprotección que ejerce el BDNF en la región CA3 durante un proceso isquémico (Tecuatl et al; 2018).

La activación de Akt conlleva la regulación de genes pro y anti apoptóticos, además de activar al factor de transcripción NF- κ B. Otro de los blancos de Akt es el sustrato de Akt rico en prolina de 40 kDa (PRAS40), un inhibidor de mTOR (diana de rapamicina de mamífero). Akt inhibe a PRAS40 y de esa forma permite la activación indirecta de mTOR. mTOR es una serin-treonin cinasa que modula diferentes aspectos fundamentales de la función neuronal en mamíferos (Switon et al. 2016). De hecho, mTOR ha tomado un lugar central en los estudios moleculares de la plasticidad neuronal ya que se ha mostrado que es crítico para diferentes formas de plasticidad sináptica, tales como LTP y LTD.

1.4.2. Señalización por la vía Ras/MAPK

Esta vía tiene múltiples funciones en las neuronas de mamíferos, incluyendo la inducción de mecanismos de plasticidad sináptica y supervivencia. Esta vía se desencadena tras la fosforilación del residuo Y515 en la región intracelular del receptor TrkB (Minichiello 2009). A diferencia de la vía de PI3K/Akt, la vía de las MAPK induce supervivencia mediante la expresión de proteínas antiapoptóticas, tales como Bcl-2 y CREB (elemento de unión en respuesta a AMP cíclico).

CREB activa la transcripción de genes esenciales para la supervivencia neuronal. Y la activación de la cinasa activadas por señales extracelulares (ERK) acopladas

a CREB es requerida para la inducción de LTP dependiente de BDNF en sinapsis del giro dentado (Yin, Edelman, and Vanderklish 2001).

1.4.3. Señalización por la vía de PLC- γ

La fosforilación de un residuo de tirosina en la posición 816 en la región intracelular del receptor TrkB causa la unión de la PLC- γ a este sitio a través de un dominio SH2. Dicha unión conduce a la fosforilación y activación de esta lipasa. Una vez reclutada y activada, la PLC- γ hidroliza al fosfatidilinositol-4,5-bifosfato para generar dos segundos mensajeros, inositol-1, 4, 5- trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG) (figura 7).

El IP3 induce la liberación de calcio de los almacenes intracelulares, lo cual resulta en la activación de enzimas dependientes de calcio. Una de esas enzimas es la CaMKII, la cual es fundamental para la expresión de procesos de plasticidad sináptica en el hipocampo, particularmente en la sinapsis entre las neuronas piramidales de CA3 con las neuronas piramidales de CA1 (Minichiello et al. 2002).

Otros estudios han obtenido fuertes evidencias de que la señalización de BDNF y TrkB regula selectivamente la expresión de parvalbúmina y crecimiento dendrítico en interneuronas a través de la activación de la vía de la PLC- γ (Berghuis et al. 2006).

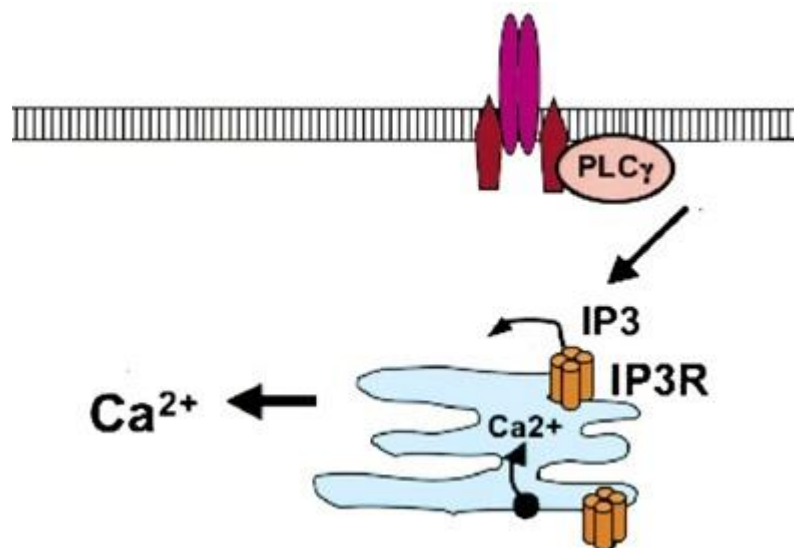


Figura 7. Vía de la fosfolipasa C / IP3. Modificado de Hogan et al 2003.

1.4.4. Modulación de la transmisión sináptica por el receptor TrkB

La activación del receptor TrkB ejerce efectos agudos sobre la transmisión sináptica, y está involucrado en la inducción de LTP. De hecho, su activación por el BDNF potencia la actividad sináptica excitadora de la región CA1 del hipocampo, generando incluso una potenciación sostenida durante horas (Kang and Schuman 1995). Dicha LTP es bloqueada en presencia del inhibidor selectivo del receptor TrkB, el fármaco K252a.

Otra característica de la LTP dependiente de BDNF/TrkB en CA1 es que presenta disminución de la facilitación por pulso pareado (FPP), lo cual implica un posible locus presináptico para la inducción de plasticidad (Kang and Schuman 1995) (Figura 8). Paradójicamente, no hay reportes detallados acerca de la expresión de TrkB ni de los efectos que ejerce este receptor en la plasticidad de la sinapsis que hacen las fibras musgosas con neuronas piramidales e interneuronas de la región CA3.

Lo anterior es más sorprendente aún si se tiene en cuenta que el mayor sitio de expresión de BDNF (tanto de mRNA como de proteína) en todo el SNC son los botones musgosos y terminales *en passant* de las fibras musgosas en la región CA3 (McNamara 2006), estructuras que contactan de manera primordial a las interneuronas de la región CA3.

Con todos los antecedentes acerca de las acciones del receptor TrkB en la fisiología sináptica, queda claro que investigar el papel de este receptor en la transmisión y plasticidad sináptica de la región CA3 es esencial, dada la abundante expresión del propio TrkB como de su principal ligando, el BDNF. Particularmente en las sinapsis excitadoras que realizan las fibras musgosas sobre las interneuronas de CA3. Siendo de nuestro particular interés aquellas localizadas en los *strata lucidum* y *oriens*, de las cuales nuestro conocimiento, en general, es limitado.

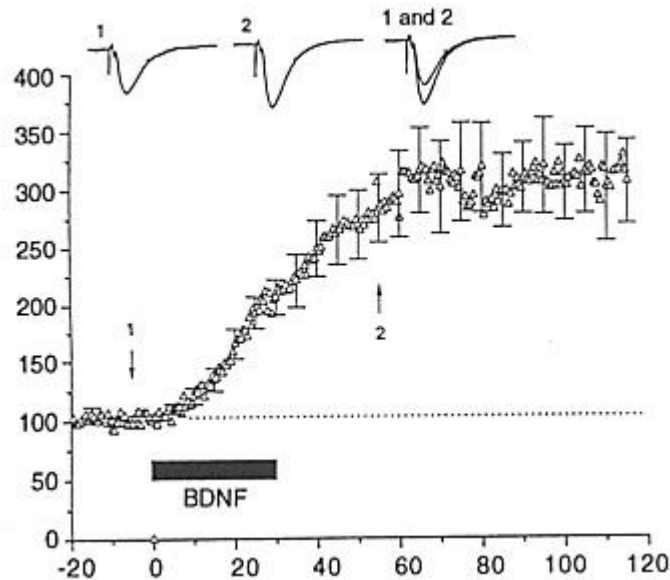


Figura 8. La activación del receptor TrkB por el BDNF es capaz de inducir procesos de plasticidad sináptica, específicamente LTP, en la sinapsis entre las colaterales de Schaffer y las neuronas principales de CA1. Modificado de Kang and Schuman 1995.

1.4.5. Modulación de la excitabilidad intrínseca neuronal por el receptor TrkB

Además de los ya mencionados efectos que ejerce el receptor TrkB en la neurotransmisión, el receptor del BDNF es capaz de modificar conductancias iónicas a nivel neuronal teniendo efectos directos en la excitabilidad intrínseca.

Se ha demostrado que la aplicación de BDNF incrementa al doble la velocidad de disparo de neuronas hipocámpales en cultivo en cuestión de minutos, por acción del receptor TrkB (Levine 1995).

Adicionalmente, se sabe que el TrkB modula la actividad de canales de sodio Nav1.9 mediante un probable mecanismo de activación dependiente de unión de ligando en neuronas cultivadas de hipocampo (Blum, Kafitz, and Konnerth 2002).

Por otra parte, se ha demostrado que el sistema BDNF/TrkB es modulador de la excitabilidad de interneuronas del giro dentado. En rebanadas frescas, la perfusión de BDNF modifica los patrones de disparo y disminuye la excitabilidad intrínseca mediante un mecanismo que parece operar a través de la corriente de potasio M, la

cual es mediada por canales $K_v7.2$, y que es crucial para el control de la excitabilidad intrínseca de las interneuronas del giro dentado (Nieto-Gonzalez and Jensen 2013).

Estos datos resultan interesantes toda vez que apuntan a una probable actividad del TrkB específica del tipo neuronal. Sin embargo, se ha omitido el estudio de este receptor y sus implicaciones en la excitabilidad y fisiología sináptica de las interneuronas de CA3.

Los antecedentes acerca de la miríada de acciones del receptor TrkB en el sistema nervioso central lo colocan no solo como un sustancial modulador de la transmisión sináptica, sino también como un receptor capaz de ejercer poderosas acciones excitadoras e inhibitoras en neuronas de diferentes estructuras cerebrales. Lo anterior, aunado a la ausencia de información sobre sus efectos en la sinapsis entre las fibras musgosas y las interneuronas de CA3, desemboca en el genuino interés de estudiar el papel de este receptor en la neurotransmisión y excitabilidad de las interneuronas del hipocampo.

2. Justificación

El receptor TrkB está ampliamente expresado en el SNC, siendo la región CA3 del hipocampo su sitio de mayor expresión. De igual manera, el Factor Neurotrófico Derivado de Cerebro (BDNF), ligando endógeno de este receptor, se expresa abundantemente en las terminales sinápticas de las fibras musgosas procedentes del giro dentado.

Estudios *in vitro* han demostrado que el receptor TrkB participa en procesos de señalización y modulación de la transmisión sináptica y del disparo neuronal, y su activación es suficiente para desencadenar mecanismos transduccionales asociados a la potenciación a largo plazo (LTP).

A pesar de la relevancia del TrkB y su ligando BDNF en la modulación de la excitabilidad y plasticidad neuronal, existe muy poca información sobre los efectos de su activación en la modulación del disparo neuronal y transmisión sináptica de las interneuronas de la región CA3 del hipocampo.

Por tal razón, este proyecto busca determinar si la activación del receptor TrkB modifica el disparo neuronal y controla la fuerza de la transmisión sináptica en la sinapsis fibra musgosa-interneurona de CA3.

3. Hipótesis

- La activación del receptor TrkB, por BDNF o el agonista 7,8-DHF, modificará las propiedades biofísicas que dan forma a la excitabilidad intrínseca de las interneuronas de la región CA3.
- La activación del receptor TrkB inducirá un incremento en la fuerza de la transmisión sináptica en la sinapsis fibras musgosas - interneuronas de CA3.

4. Objetivos

4.1. Objetivos generales

- Determinar si la activación del receptor TrkB modifica el disparo neuronal de las interneuronas localizadas somáticamente en los strata *oriens* y *lucidum* de la región CA3.
- Determinar si la activación del receptor TrkB potencia la transmisión sináptica excitadora en la sinapsis fibra musgosa – interneurona de CA3.

4.2. Objetivos específicos

1. Determinar propiedades intrínsecas, patrones de disparo y características de la transmisión sináptica de las subpoblaciones de interneuronas localizadas en los strata *oriens* y *lucidum* de CA3.
2. Determinar si las interneuronas de CA3 expresan el receptor TrkB.
3. Determinar si la activación del receptor TrkB modifica el disparo de las interneuronas de los strata *oriens* y *lucidum* de CA3.
4. Determinar si la transmisión excitadora fibra musgosa-interneurona experimenta procesos de plasticidad sináptica tras la activación del receptor TrkB.

5. Material y métodos

5.1. Obtención de rebanadas de cerebro

Se utilizaron ratas de la cepa Sprague-Dawley de 4 semanas post natales (80 ± 20 g de peso) expuestas a ciclos normales de luz oscuridad, con agua y alimento *ad libitum*. Las ratas fueron profundamente anestesiadas mediante la administración de pentobarbital sódico vía intraperitoneal (60mg/kg), para ser inmediatamente decapitadas. Los encéfalos fueron removidos cuidadosamente y colocados en una solución de sacarosa helada con la siguiente composición (mM): sacarosa 210, KCl 2.8, MgSO₄ 2, Na₂HPO₄ 1.25, NaHCO₃ 26, D-glucosa 10, MgCl₂ 1 y CaCl₂ 1. Se obtuvieron rebanadas transversas que contuvieran a la formación hipocampal y corteza circundante de 385 micrómetros de grosor utilizando un vibratomo Leica VT1000S. Acto seguido, las rebanadas se colocaron en una solución de incubación con la siguiente composición (mM): NaCl 125, KCl 2.5, Na₂HPO₄ 1.25, NaHCO₃ 26, MgCl₂ 4, D-glucosa 10 y CaCl₂ 1; a 34 °C por 30 minutos y después a temperatura ambiente por al menos 60 minutos.

5.2. Registros electrofisiológicos

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las rebanadas fueron transferidas a una cámara de registro sumergida, la cual es perfundida constantemente a una velocidad de 2-3 ml/min con líquido cefalorraquídeo artificial, el cual tiene la siguiente composición (mM): NaCl 125, KCl 2.5, Na₂HPO₄ 1.25, NaHCO₃ 26, MgCl₂ 2, D-glucosa 10 y CaCl₂ 2. En algunos experimentos se adicionó BDNF (15 ng/mL o 1 nM) o 7,8-DHF (25 uM). La solución preparada se gaseó continuamente con una mezcla 95% O₂/5% CO₂ con el fin de mantener una adecuada saturación de oxígeno y un pH alrededor de 7.4. Los registros se llevaron a cabo a una temperatura de 32-33 °C. Se utilizó un microscopio Nixon FN-S2N equipado con una cámara infrarroja de contraste de interferencia para poder visualizar a las neuronas a través de un objetivo de inmersión 40x. Para acceder a las neuronas se emplearon pipetas de borosilicato, las cuales fueron estiradas con ayuda de un

puller horizontal Flaming-Brown P-97 para que tuvieran una resistencia final de 3-6 M Ω .

Para los registros de *patch clamp* las pipetas se llenaron con una solución intracelular con la siguiente composición (mM): K-MeSo₄ 135, KCl 10, NaCl 5, EGTA 1, HEPES 10, Mg-ATP 2, Na-GTP 0.4, fosfocreatina 10; la solución es ajustada a un pH de 7.2-7.3 con hidruro de cloro o hidróxido de sodio, según se necesite. La osmolaridad fue constantemente monitoreada y ajustada a 290 – 300 mOsm.

Los registros de *patch clamp* se realizaron en interneuronas visualmente identificadas cuyo soma se localizó en los estrata *lucidum* y *oriens* de la región CA3 del hipocampo. Los cuerpos celulares se encontraron entre 10 y 150 μ m de profundidad, con respecto a la superficie de la rebanada. Se determinó como *stratum lucidum* y *stratum oriens* a los 100 μ m de tejido adyacentes inmediatamente por arriba y debajo del *stratum pyramidale*, respectivamente.

Las pipetas de registro fueron rutinariamente adicionadas con biocitina al 0.2 % para permitir una subsecuente identificación morfológica de las neuronas registradas.

Los experimentos para el estudio de la excitabilidad y potencial de acción se llevaron a cabo en la modalidad de fijación de corriente, mientras que aquellos donde se evaluó la transmisión sináptica se realizaron en la modalidad de fijación de voltaje. En ambos casos, las células de interés se mantuvieron a un potencial de membrana de -60 mV.

5.2.1. Determinación de propiedades intrínsecas y de la transmisión sináptica de interneuronas de CA3

- *Resistencia de entrada, constante de tiempo y capacitancia:* Una vez abierta la célula se dejó estabilizar el sello un par de minutos. Para cada célula se realizó una relación corriente vs voltaje inyectando pulsos de corriente cuadrados desde -300 pA con incrementos de 30 pA hasta que la neurona disparó un potencial de acción. A partir de este protocolo se obtuvo la resistencia de entrada, calculada como la pendiente de los valores negativo y positivo en torno al valor de corriente igual a cero. También se obtuvo la

constante de tiempo, tau, mediante el ajuste de una función exponencial estándar a la respuesta de voltaje tras la inyección del pulso de corriente hiperpolarizante de -30 pA. La capacitancia de la membrana se obtuvo mediante el cociente de la constante de tiempo entre la resistencia de entrada (Feenstra et al. 2014).

- *Corriente rheobase y curva estímulo/respuesta:* La corriente rheobase se determinó como la intensidad de corriente inyectada necesaria para evocar un potencial de acción. Para ello se inyectaron pulsos cuadrados de corriente desde 0 hasta 300 pA en aumentos de 30 pAs con una duración de 1 segundo. A partir de este mismo protocolo se realizaron curvas de corriente inyectada vs número de potenciales de acción. Para analizar los patrones de respuesta entre las diferentes subpoblaciones de interneuronas se realizaron *raster plots*.
- *Análisis de la actividad sináptica evocada por la estimulación de la fibra musgosa:* Se realizaron registros de la actividad sináptica evocada procedente de la estimulación eléctrica de las fibras musgosas en la modalidad *fijación de voltaje* mediante el paradigma de pulsos pareados. Dicho paradigma consiste en suministrar dos estímulos eléctricos con un intervalo interestímulo de 60 ms y una frecuencia de 0.16 Hz. La intensidad del estímulo fue variable en los diferentes experimentos, siempre en el rango de 10 a 250 μ A. La fibra musgosa se estimuló usando un electrodo bipolar colocado del lado suprapiramidal del giro dentado o bien en el extremo más proximal, con respecto al hilus, del *stratum lucidum*.

Se utilizaron 2 paradigmas de inducción de plasticidad sináptica. El primero es de inducción eléctrica, lo que se logra mediante un protocolo de estimulación a alta frecuencia (HFS, por sus siglas en inglés). La HFS consiste en 3 trenes de pulsos a 100 Hz de 1 segundo de duración cada uno. Este paradigma ha sido usado ampliamente para este propósito (Galván et

al. 2008; Pelkey et al. 2005; Wu et al. 2017). El segundo paradigma fue de inducción química, el cual sustituye la aplicación de HFS por perfusión de agonistas del receptor TrkB.

Durante toda la duración de los experimentos se perfundi6 picrotoxina (25 μM) y 6cido 2-amino-5-fosfovaleri6nico (50 μM) con el objetivo de antagonizar a los receptores GABA y NMDA respectivamente, y as6 aislar el componente AMPA de la respuesta sin6ptica evocada. En los 6ltimos 5 minutos de cada experimento se expuso a la rebanada a DCG-IV (10 μM), un agonista selectivo de los receptores metabotr6picos del glutamato del grupo II, para corroborar que la respuesta observada se originara de la fibra musgosa y no de otras fuentes (Lawrence and McBain 2003). A pesar de que la inhibici6n por DCG-IV de la transmisi6n sin6ptica de la fibra musgosa en neuronas piramidales es casi completa (alrededor del 90%), en las interneuronas es variable la magnitud de la inhibici6n (Alle and Jonas 2001).

Para el paradigma de HFS se registr6 la actividad basal por 10 minutos, se realiz6 la HFS y se registr6 durante 30 minutos antes de administrar DCG-IV. Para el paradigma de inducci6n qu6mica se registr6 la actividad basal por 10 minutos, tras lo cual se perfundi6 BDNF (15 ng/mL) o 7,8-DHF (25 μM) durante 5 minutos y se registr6 durante 30 minutos antes de administrar el DCG-IV.

F6rmaco	Concentraci6n	Blanco	Efecto
BDNF/7,8-DHF	15 mgmL ⁻¹ /25 μM	Receptor TrkB	Agonistas
Picrotoxina	25 μM	Receptor GABA	Antagonista
APV	50 μM	Receptor tipo NMDA	Antagonista
DCG-IV	10 μM	Receptor mGluR grupo II	Agonista
ANA-12	50 μM	Receptor TrkB	Antagonista

5.3. Inmunohistofluorescencia

Las ratas fueron profundamente anestesiadas con pentobarbital sódico (65 mg/kg) y perfundidas con solución salina isotónica y posteriormente con PFA (4%) mediante punción en el ventrículo izquierdo del corazón. Ambas soluciones se mantuvieron frías hasta su uso. Si la perfusión fue exitosa se observa una decoloración en las extremidades del animal. El cerebro fue extraído y colocado en PFA (4%) durante 24 horas. Posteriormente el cerebro fue transferido a una solución de sacarosa al 20% hasta que se hundiera, lo que toma de 24 a 36 horas. Después se transfirió a una solución de sacarosa al 30% hasta que vuelva a hundirse. Luego se procedió a congelar el tejido mediante metilbutano. Una vez congelado, el cerebro se mantuvo en el congelador a -20°C.

Se obtuvieron rebanadas coronales de hipocampo de 50 µm de grosor con ayuda de un criostato, las rebanadas obtenidas se colocaron en solución crioprotectora (Hoffman and Le 2004) y fueron almacenadas a -20°C hasta su uso.

Después de tres lavados de 10 minutos cada uno con PBS, las rebanadas se colocaron en una solución de permeabilización y bloqueo que contiene 5% de albúmina de suero bovino (BSA) y 0.3 % de Tritón X-100 durante 120 minutos en constante agitación. Posterior a ese tiempo la solución de permeabilización y bloqueo fue retirada y se sustituyó por la solución de anticuerpos primarios (anticuerpos primarios, más 3% de BSA y 0.3% de Tritón X-100). Todas las rebanadas fueron expuestas a anticuerpos anti-GAD67 y anti-TrkB, y fueron combinados con anticuerpos anti proteínas de unión a calcio (parvalbúmina, calbindina y calretinina) de manera separada. Para todos los anticuerpos primarios se utilizó una dilución de 1:500. Las rebanadas se mantuvieron en esta solución durante 24 horas a temperatura ambiente.

Posterior a esta incubación se realizaron 3 lavados con PBS de 10 minutos cada uno, en constante agitación. Después se adicionó la solución de anticuerpos secundarios (anticuerpos secundarios + PBS). Los anticuerpos secundarios empleados se utilizaron en una dilución 1:500. Las rebanadas se mantuvieron

incubando durante 2 horas en agitación constante. Al finalizar la incubación, se llevaron a cabo 3 lavados de 10 minutos con PBS.

Las rebanadas se montaron en portaobjetos de vidrio recubiertas con medio de montaje Vectashield adicionado con DAPI, para su posterior visualización mediante microscopía de epifluorescencia y confocal.

Las rebanadas que contuvieron neuronas marcadas con biocitina al 0.2% se fijaron entre 24 y 72 horas en PFA al 4% a 4°C. Se utilizó estraptavidina acoplada con el fluoróforo Pacific Blue para visualizar a las neuronas exitosamente marcadas.

5.4. Análisis estadístico

Los datos están expresados como la media \pm SEM; a menos que se precise de otra forma. Se realizó prueba de t para muestras pareadas o análisis de varianza de medidas repetidas, según corresponda, a menos que se indique lo contrario.

6. Resultados

Se registraron 144 interneuronas hipocampales que fueron seleccionadas con base en su localización somática. El registro se limitó a interneuronas localizadas en los *strata lucidum* y *oriens* de la región CA3b hipocampal. Tras la ruptura del gigasello se determinó una serie de propiedades intrínsecas que fueron evaluadas a un potencial de -65 ± 1 mV. La tabla 2 resume dichos valores. El potencial de membrana en reposo se encontró alrededor -65 mV, y las propiedades electrofisiológicas coincidieron con los valores previamente reportados por otros grupos de investigación (Freund and Buzsáki 1996; Pelkey et al. 2017; Spruston and Lu 1997).

144 células	PMR (mV)	R _m (MΩ)	Tau (ms)	C _m (pF)	Rheobase (pA)
<i>S. oriens</i> (FS) (n=55)	-63.2 ± 0.5	246 ± 15.8	25.2 ± 5.2	102.4 ± 24.8	63.3 ± 9.2
<i>S. lucidum</i> (FS) (n=38)	-65.1 ± 1.1	241 ± 24.2	28.3 ± 3.4	117.4 ± 17	71.2 ± 7.9
<i>S. lucidum</i> (RS) (n=51)	-65.4 ± 0.6	208.3 ± 23	33.9 ± 3.9	162.8 ± 19.9	93.7 ± 13.2

Tabla 2. Propiedades intrínsecas de interneuronas de CA3 incluidas en este estudio. FS = *fast spiking interneuron*; RS = *regular spiking interneuron*; por sus siglas en inglés.

6.1. Caracterización de los patrones de disparo y transmisión sináptica de interneuronas de CA3

Debido a la diversidad y heterogeneidad propia de las interneuronas, se utilizó el criterio de *tipo de disparo* para organizar a las células registradas en este trabajo.

Los registros revelaron al menos tres subpoblaciones claramente definidas, a saber: interneuronas localizadas en el *stratum lucidum* con disparo regular (RS-SL); interneuronas localizadas en el *stratum lucidum* con disparo rápido (FS-SL) e interneuronas localizadas en el *stratum oriens* (SO-IN). Esta última subpoblación se caracterizó por su relativa uniformidad en disparo, pues las 55 interneuronas fueron de disparo rápido.

Mediante gráficas de *raster plot*, se analizó la descarga de potenciales de acción a lo largo del tiempo (pulsos de 300 picoamperios de intensidad y de 1 segundo de duración). Estos análisis revelaron que aún dentro de una misma subpoblación de interneuronas, existe gran heterogeneidad en los patrones de disparo (figura 9).

Un porcentaje elevado de interneuronas (cerca de 75 %) expresó una conductancia entrante cuando se les inyectó un pulso cuadrado de corriente hiperpolarizante (trazos centrales de la figura 9). Las características de dicha corriente y los reportes previos acerca de este fenómeno (Anderson et al. 2011; He et al. 2014), sugieren que se trata de la corriente I_h , mediada por canales dependientes de nucleótidos cíclicos activados por hiperpolarización (HCN), canales que participan en la coordinación de la actividad eléctrica de las redes celulares en el SNC.

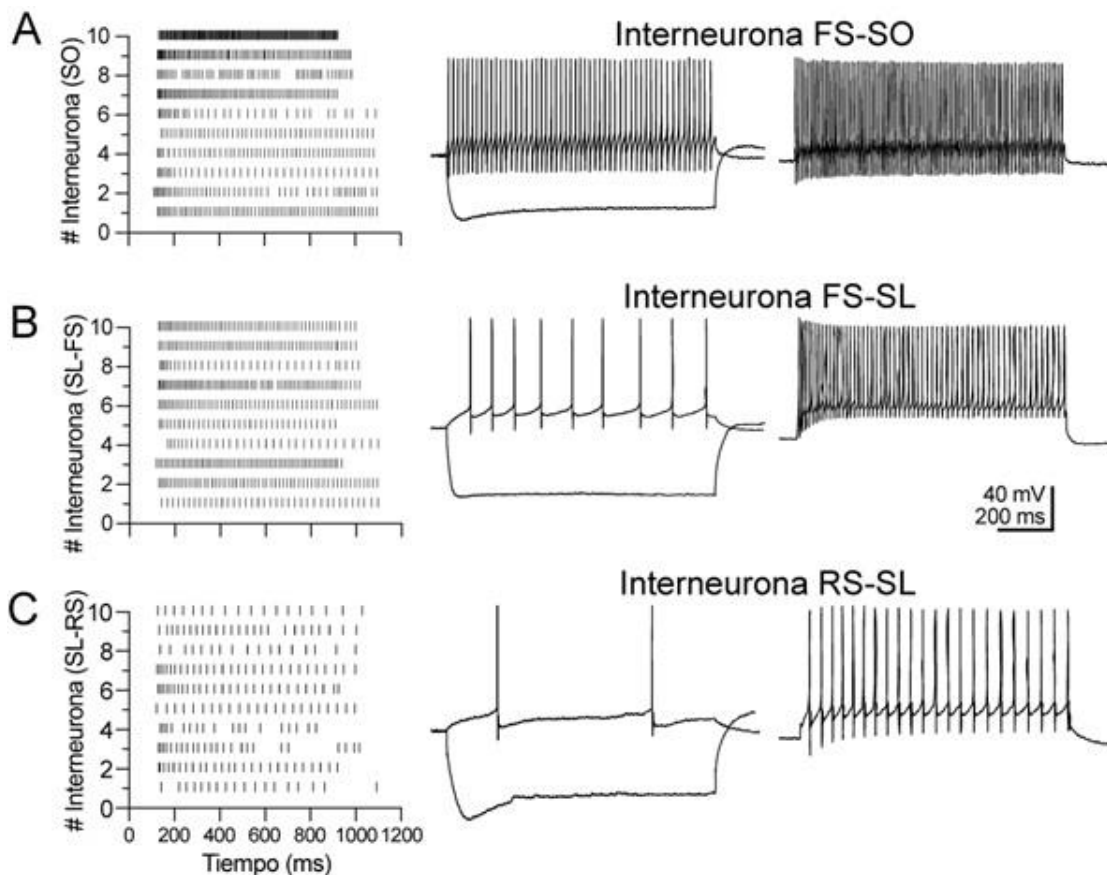


Figura 9. Características de disparo de las interneuronas de CA3. Gráficos de raster plots y trazos representativos de respuesta a pulsos de corriente en interneuronas de CA3. (A) Interneuronas del *stratum oriens*; (B) interneuronas de disparo rápido del *stratum lucidum*; (C) interneurona de disparo regular del *stratum lucidum*. En los trazos centrales se observa que ante estímulos hiperpolarizantes se activa una corriente entrante, presumiblemente una corriente I_h .

Por otra parte, la estimulación eléctrica del tracto por donde corren las fibras musgosas (*stratum lucidum*) evocó corrientes postsinápticas excitadoras (EPSC) en la mayoría de las interneuronas registradas (los registros fueron realizados en presencia de picrotoxina (25 μ M) + D-AP5 (50 μ M) para suprimir la inhibición de tipo GABA_A y bloquear los receptores NMDA, respectivamente. Si bien las características generales de los EPSC fueron similares en todas las interneuronas, la constante de tiempo de subida (*rise time*) de los EPSC en RS-SL fue mayor (1.79 ± 0.1 ms) que en las FS-SL (1.32 ± 0.11 ms), o en las SO-IN (1.42 ± 0.21). Respecto a los tiempos de decaimiento de las EPSC no hubo diferencia significativa en las tres subpoblaciones (paneles B y C de figura 10).

Para corroborar que el origen del EPSC registrado eran las fibras musgosas, se perfundió el agonista de los receptores metabotrópicos de glutamato tipo II, DCG-IV (5 μ M). La activación de dicho receptor deprime la respuesta sináptica. En todos los casos, el DCG-IV produjo una depresión del EPSC que coincide con lo reportado en la literatura (figura 10).

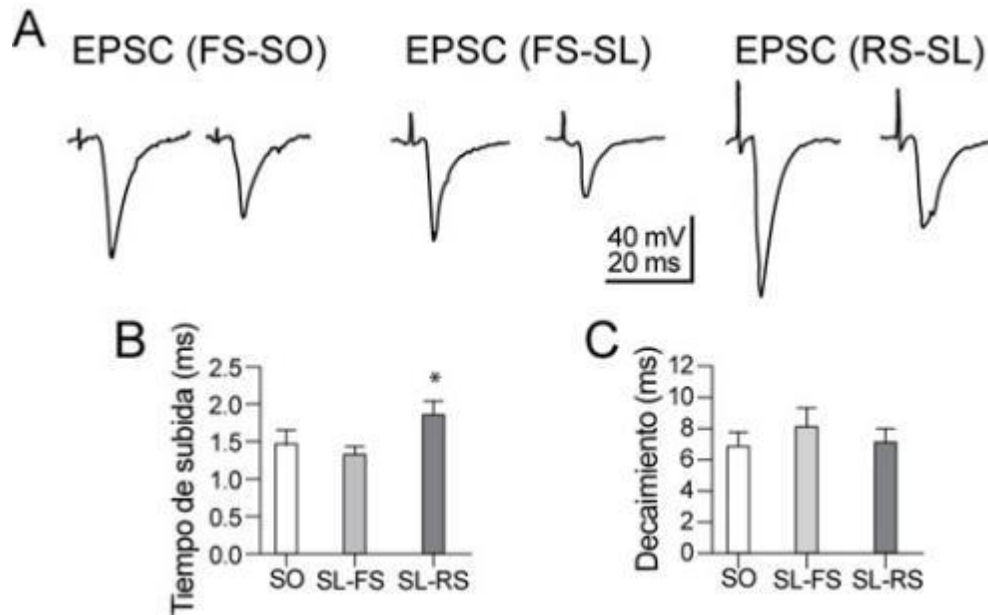


Figura 10. Características de los EPSCs evocados en las interneuronas de CA3. (A) Trazos de EPSCs representativos evocados por estimulación eléctrica de la fibra musgosa. Cada par de EPSCs representan antes y después de la perfusión de DCG-IV. Se puede apreciar la sensibilidad de las respuestas a la perfusión de DCG-IV por la disminución en la amplitud de los EPSCs. (B) Promedio de los tiempos de subida y (C) de decaimiento de los EPSCs registrados. * $p < 0.05$.

6.2. Las interneuronas de CA3 expresan el receptor TrkB

Reportes previos han documentado la presencia del RNA mensajero del BDNF en neuronas piramidales del hipocampo (Scharfman and Maclusky 2014). Respecto al receptor TrkB, se ha detectado su expresión en las fibras musgosas (McNamara 2014), en neuronas piramidales (Minichiello et al. 1999) y en interneuronas del giro dentado (Nieto-Gonzalez and Jensen 2013). Sin embargo, no hay reportes acerca de su expresión en las interneuronas de CA3.

Se realizaron inmunohistofluorescencias (IHF) para identificar si las interneuronas son inmunopositivas a TrkB. Para verificar que la inmunorreactividad fuera específicamente en interneuronas, se realizó un doble inmunomarcaje con GAD-67. Al mismo tiempo se realizó marcaje para proteínas de unión a calcio, parvalbúmina (PV), calbindina (CB) y calretinina (CR).

Un análisis preliminar de las mismas, muestra que una subpoblación de interneuronas del *stratum oriens* positivas a PV + GAD-67 expresa el receptor TrkB. En el *stratum lucidum*, se encontraron subpoblaciones de interneuronas positivas tanto a PV, como a CB y CR que fueron inmunoreactivas al receptor TrkB. En conjunto, estos datos indican que el receptor TrkB se localiza distribuido en interneuronas de ambos estrata de la región CA3 (Figuras 11, 12 y 13).

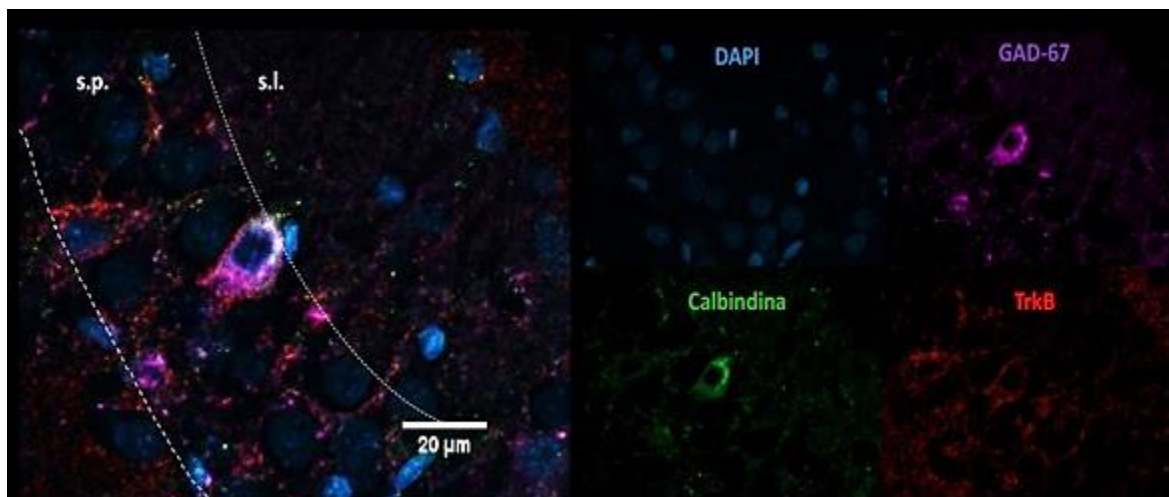


Figura 11. Inmunohistoquímica de CA3 mostrando coexpresión de calbindina, GAD-67 y TrkB en interneurona. Imagen representativa de interneurona localizada en el borde entre el *stratum pyramidale* y el *stratum lucidum*.

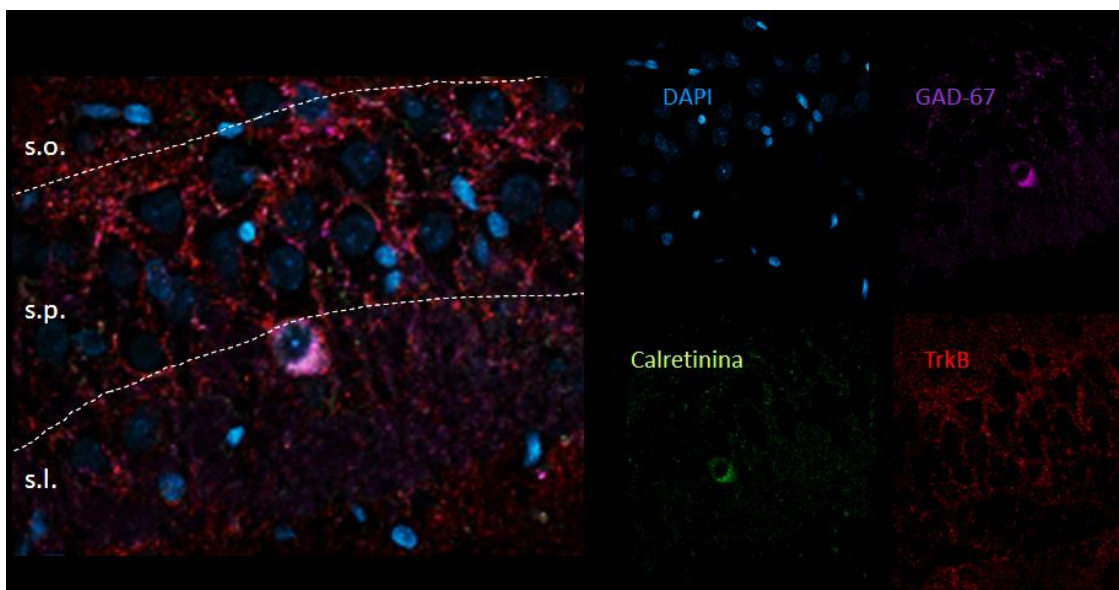


Figura 12. Inmunohistoquímica de CA3 mostrando coexpresión de calretinina, GAD-67 y TrkB en interneurona. Imagen representativa de interneurona localizada en el *stratum lucidum*.

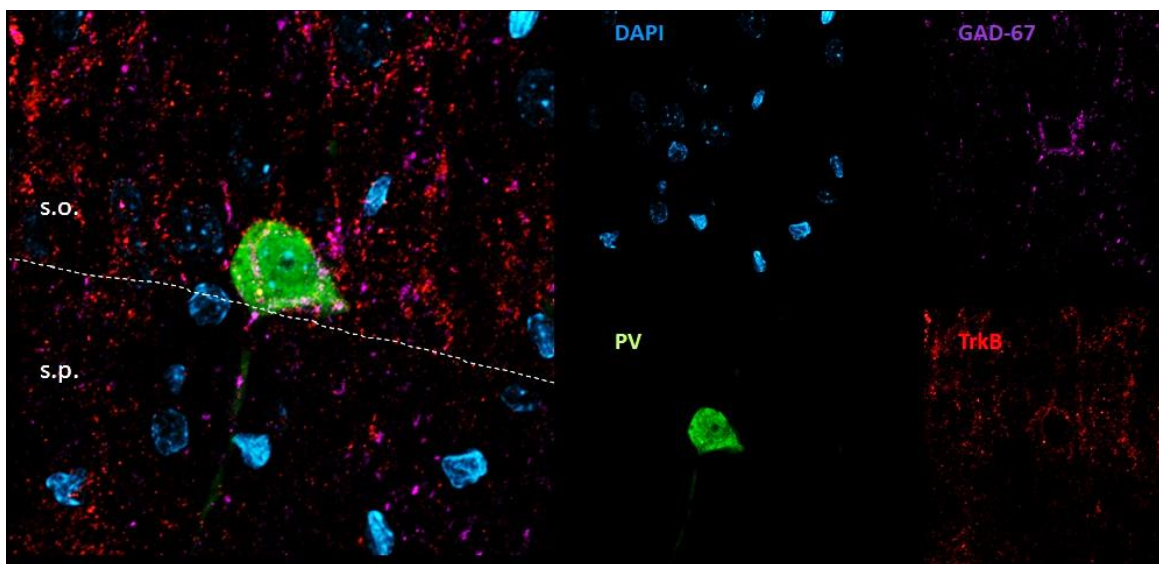


Figura 13. Inmunohistoquímica de CA3 mostrando coexpresión de parvalbúmina, GAD-67 y TrkB en interneurona. Imagen representativa de interneurona localizada en el *stratum oriens*.

6.3. La activación del receptor TrkB no modifica el disparo de las interneuronas de CA3

Considerando los reportes acerca de las acciones del TrkB sobre el disparo en neuronas hipocampales e interneuronas del giro dentado (Kafitz et al. 1999; Marongiu, Imbrosci, and Mittmann 2013; Nieto-gonzalez and Jensen 2013), se investigó si la activación del TrkB modificar el disparo en interneuronas de CA3. Para este análisis, las interneuronas fueron mantenidas en fijación de corriente a 60 ± 1 mV. Se inyectaron pulsos cuadrados de corriente con incrementos de 30 pA y duración de 1 segundo, aplicados a una frecuencia de 0.16 Hz. Tras la obtención del disparo basal, se perfundió BDNF (15 ng/mL) o 7,8-DHF (25 μ M). El 7,8-DHF es un agonista de TrkB que presenta mayor afinidad que el BDNF (Street 2014).

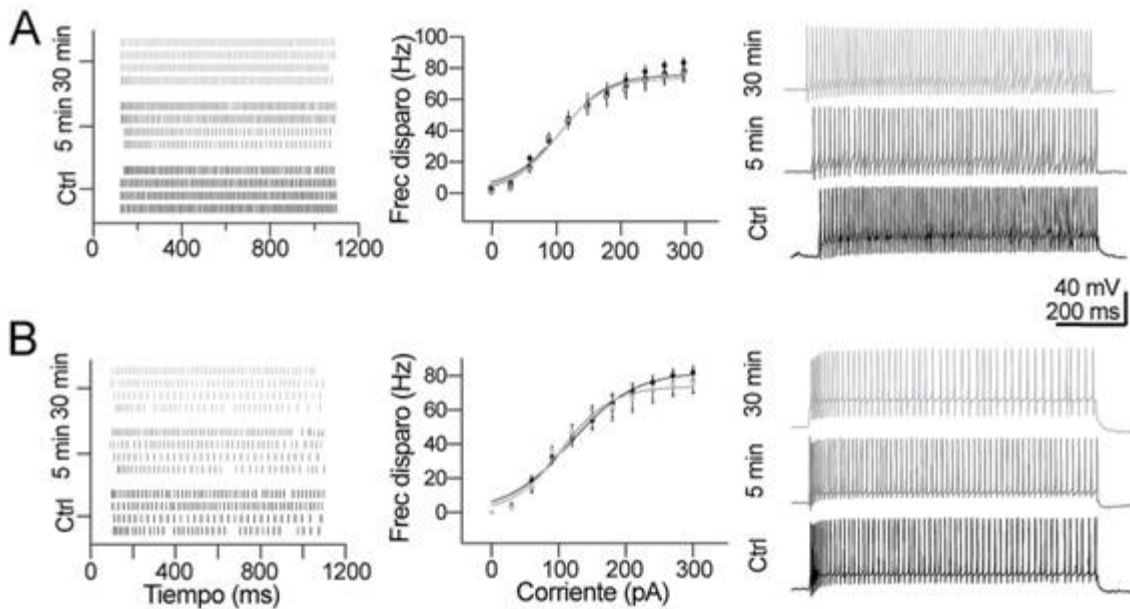


Figura 14. La activación de TrkB no modifica el disparo de interneuronas del s. oriens. (A) La estimulación del receptor TrkB con BDNF no induce cambios en los patrones ni en la frecuencia de disparo de interneuronas del s. oriens. (B) Lo mismo ocurre cuando la estimulación se realiza con el agonista específico del receptor TrkB, el 7,8-DHF. Los trazos representativos (A y B) corresponden respuestas a pulsos de corriente de 270 pA. $n = 8$, $p > 0.05$, ANOVA de medidas repetidas.

El análisis del disparo se realizó visualmente con *raster plots*, para los cuales se utilizó el estímulo de 270 pA. Nuestros resultados mostraron que ni las SO-IN ($n = 16$), las SL – FS-IN ($n = 16$) ni las SL – RS-IN ($n = 16$) mostraron alteraciones en la frecuencia después de la perfusión de BDNF o 7,8-DHF (figuras de la 14 a la 16).

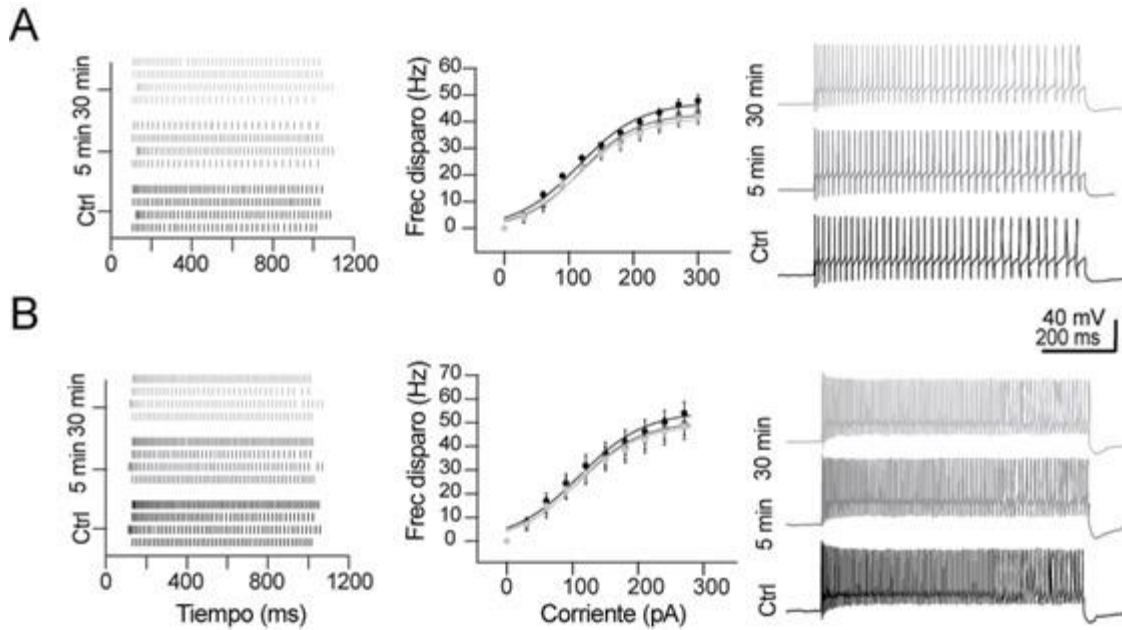


Figura 15. La activación de TrkB no modifica el disparo de interneuronas de disparo rápido del *s. lucidum*. (A) La estimulación del receptor TrkB con BDNF no induce cambios en los patrones ni en la frecuencia de disparo de FS–SL. (B) Lo mismo ocurre cuando la estimulación se realiza con el agonista específico del receptor TrkB, el 7,8-DHF. Los trazos representativos (A y B) corresponden respuestas a pulsos de corriente de 270 pA. $n = 8$, $p > 0.05$, ANOVA de medidas repetidas.

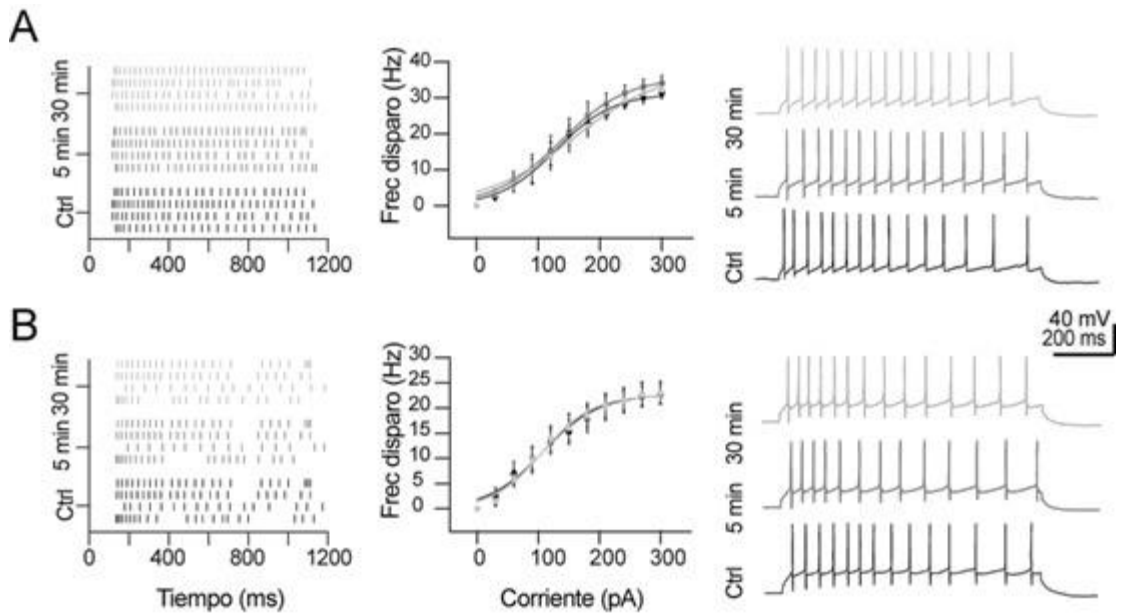


Figura 16. La activación de TrkB no modifica el disparo de interneuronas de disparo regular del *stratum lucidum*. (A) La estimulación del receptor TrkB con BDNF no induce cambios en los patrones ni en la frecuencia de disparo de RS–SL. (B) Lo mismo ocurre cuando la estimulación se realiza con el agonista específico del receptor TrkB, el 7,8-DHF. Los trazos representativos (A y B) corresponden respuestas a pulsos de corriente de 270 pA. $n = 8$, $p > 0.05$, ANOVA de medidas repetidas.

Para determinar si la actividad de este receptor modifica las propiedades cinéticas del potencial de acción de las interneuronas de CA3 se realizaron diagramas de fase o *phase plots*, los cuales se obtienen graficando la velocidad de cambio del potencial de membrana vs el voltaje de membrana neuronal. Esa aproximación matemática nos permite evaluar cambios en las corrientes iónicas que subyacen las distintas fases del potencial de acción. Sin embargo, la activación de TrkB no modificó la forma de los potenciales de acción ni sus respectivos diagramas de fase (ver figura 15). En conjunto, estos resultados sugieren que la activación del receptor TrkB no modifica la actividad de canales iónicos y posibles mecanismos celulares que dan forma a las propiedades pasivas y activas de las interneuronas de CA3.

A pesar de estos resultados, falta analizar si la activación del receptor TrkB modula la amplitud de la conductancia I_h mediada por los canales HCN en interneuronas de CA3.

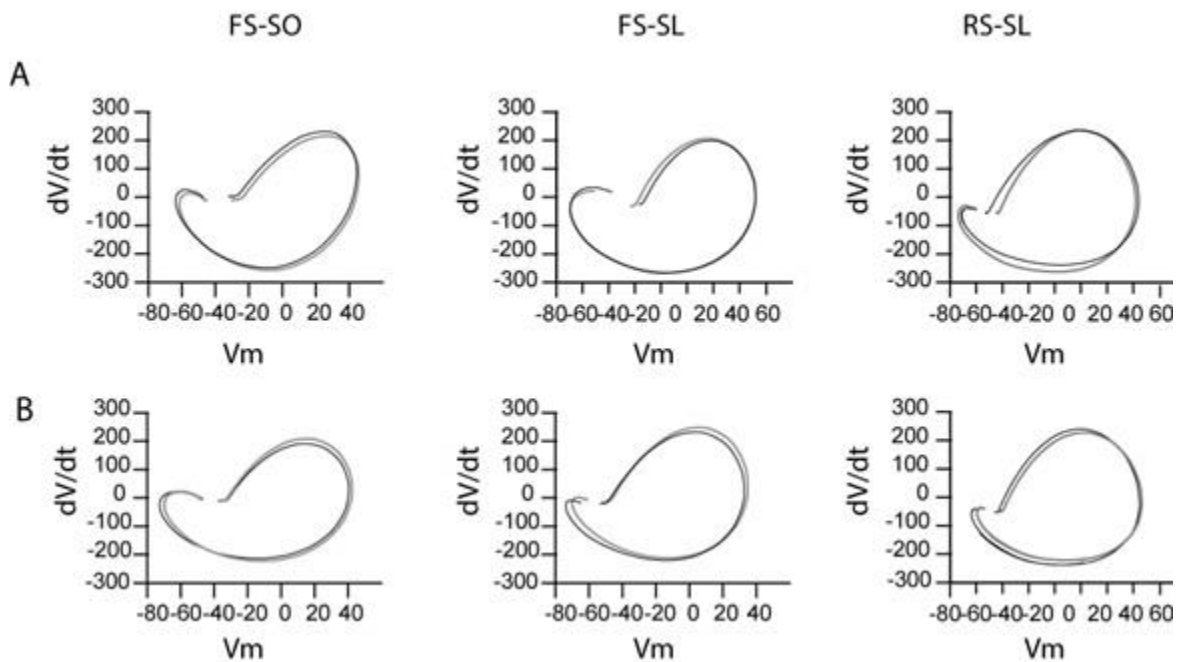


Figura 17. La activación de TrkB no modifica la cinética del potencial de acción en interneuronas de CA3. En cada panel se grafica el segundo potencial de acción antes (negro) y después (gris) de la perfusión de BDNF (A) o 7,8-DHF (B). (A) La perfusión de BDNF no indujo modificaciones en los diferentes parámetros cinéticos del potencial de acción en ninguna de las tres subpoblaciones de interneuronas registradas. (B) La estimulación del receptor TrkB 7,8-DHF, tampoco modifica los parámetros cinéticos del potencial de acción en las interneuronas registradas. FS-SO = Interneurona del *stratum oriens*; FS-SL = interneurona de disparo rápido del *stratum lucidum*; RS-SL = interneurona de disparo regular del *stratum lucidum*. n=8; los parámetros evaluados fueron amplitud, umbral de disparo, velocidad de despolarización y velocidad de repolarización

6.4. La activación del receptor TrkB modifica la fuerza de la transmisión sináptica de las interneuronas de CA3

La siguiente serie de experimentos tuvieron como finalidad corroborar las formas de plasticidad sináptica reportadas para interneuronas de CA3. Por ejemplo, es bien sabido que la estimulación eléctrica a alta frecuencia (HFS, por sus siglas en inglés) de las fibras musgosas induce depresión a largo plazo en interneuronas del *stratum lucidum* (Toth et al. 2000). Es de destacar que a pesar de la cantidad de trabajos que han reportado LTD en interneuronas del SL, al día de hoy no hay reportes que hayan asociado esta forma de depresión (por HFS) con las propiedades activas de las interneuronas (tipo de disparo). De igual manera, no hay información disponible de los efectos de la HFS ni estudios de correlación entre tipo de plasticidad y tipo de disparo en interneuronas del *stratum oriens*.

Interneuronas del stratum oriens.

Se obtuvo una basal estable de EPSCs de 10 minutos de duración (en presencia de picrotoxina (25 μ M) + D-AP5 (50 μ M)) seguido de HFS (100 Hz, repetido 3 veces; con un intervalo entre cada tren de 10 segundos) y se continuó el registro por 35 min más. En 3 de 4 interneuronas la aplicación de HFS indujo una disminución de la amplitud de las EPSC (54.69 ± 3.64 % con respecto al control; n = 3 interneuronas; $p < 0.001$; prueba de t pareada). En la última interneurona registrada de este grupo, la HFS no causó cambios en la amplitud de las EPSC (101.72 % con respecto al control; n = 1 interneurona). Concluido el tiempo de registro se perfundi6 DCG-IV para corroborar el origen de la respuesta. La perfusión caus6 una depresión sináptica (39.87 ± 4.53 % con respecto al basal). En el panel A de la figura 16 se observa el promedio de las 4 células registradas.

Interneuronas del stratum lucidum.

En el SL la HFS no modific6 la amplitud de las EPSCs en 3 de 4 interneuronas de disparo rápido registradas, mientras que en una indujo depresión sináptica transitoria (89.64 ± 5.23 % con respecto al basal n = 4; $p > 0.05$; prueba de t pareada). Las interneuronas de disparo regular del SL no expresaron ninguna forma

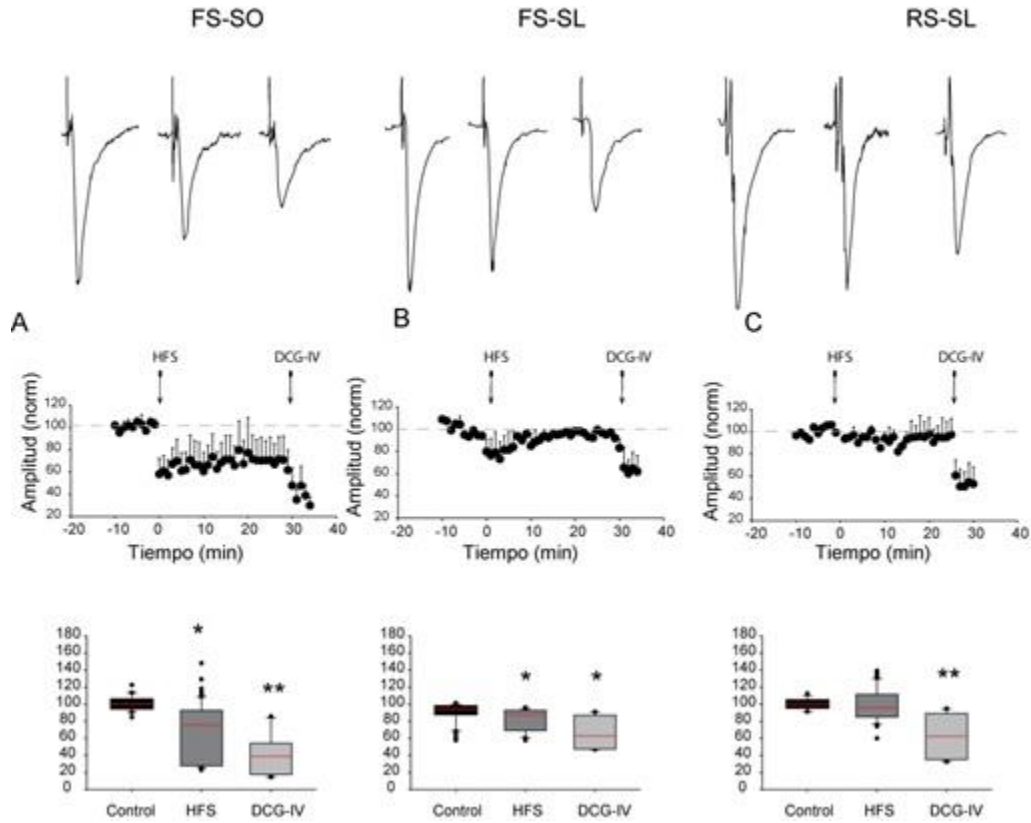


Figura 18. La estimulación eléctrica a alta frecuencia de la fibra musgosa no induce LTP en interneuronas de CA3.

(A) La sinapsis FM - SO-IN experimenta LTD tras la HFS. (B) y (C) La sinapsis MF - SL-IN no experimenta plasticidad tras la HFS, solo una de 4 interneuronas FS-SL presentó LTD. Cada gráfico representa el promedio de 4 células. Los paneles superiores son cursos temporales de la amplitud de las EPSCs con respectivos trazos representativos. * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$.

de plasticidad tras la HFS (95.82 ± 5.88 % con respecto al basal $n = 4$; $p > 0.05$; prueba de t pareada). Una vez concluido el periodo de registro se perfundió DCG-IV. En todos los casos se indujo depresión de la respuesta sináptica (FS-SL: 67.07 ± 6.54 respecto al basal; RS-SL: 62.56 ± 2.91 respecto al basal) (panel B y C de figura 16) en una magnitud que está en concordancia con lo reportado previamente para las interneuronas de CA3b (Toth et al. 2000).

En conjunto, estos experimentos corroboran que la forma predominante de plasticidad sináptica expresada en interneuronas del SL es la depresión o la ausencia de plasticidad sináptica.

De manera preliminar, nuestros experimentos sugieren que a la forma dominante de plasticidad en la sinapsis FM – SO-IN es la depresión a largo plazo. Debido a la relevancia de esta última observación, se requiere aumentar la muestra experimental.

A continuación, se determinó si la estimulación directa del receptor TrkB (perfundiendo BDNF o el agonista 7,8-DHF) produce cambios en la transmisión sináptica en la sinapsis FM – interneurona de CA3.

Para esto, los experimentos fueron divididos en subgrupos de acuerdo con la clasificación previamente descrita; a saber: se registraron interneuronas de disparo regular (RS) e interneuronas de disparo rápido (FS) localizadas en ambos estrata hipocampales.

Interneuronas de disparo regular del stratum lucidum.

Tras la identificación del tipo de disparo, las interneuronas fueron mantenidas en fijación de voltaje a -60 mV. Se obtuvo una basal de EPSCs (en presencia de picrotoxina y D-AP5), se perfundió BDNF o 7,8-DHF por 5 minutos y se continuó el registro por 30 minutos más antes de perfundir DCG-IV. La perfusión de ambos agonistas produjo un aumento de la amplitud de las EPSCs (amplitud de las EPSCs tras la perfusión de BDNF = 159.38 ± 2.92 % con respecto al basal; $p < 0.001$; $n = 6$; con 7,8-DHF = 228.54 ± 5.87 % con respecto al basal; $p < 0.001$; $n = 8$) (ver figura 17)

Al finalizar el periodo de registro se perfundió DCG-IV. En todas las interneuronas registradas, la respuestas sináptica potenciada experimentó una depresión parcial (depresión en presencia de BDNF = 73.62 ± 9.65 % con respecto al basal; en presencia de 7,8-DHF 85.03 ± 9.23 % respecto al basal).

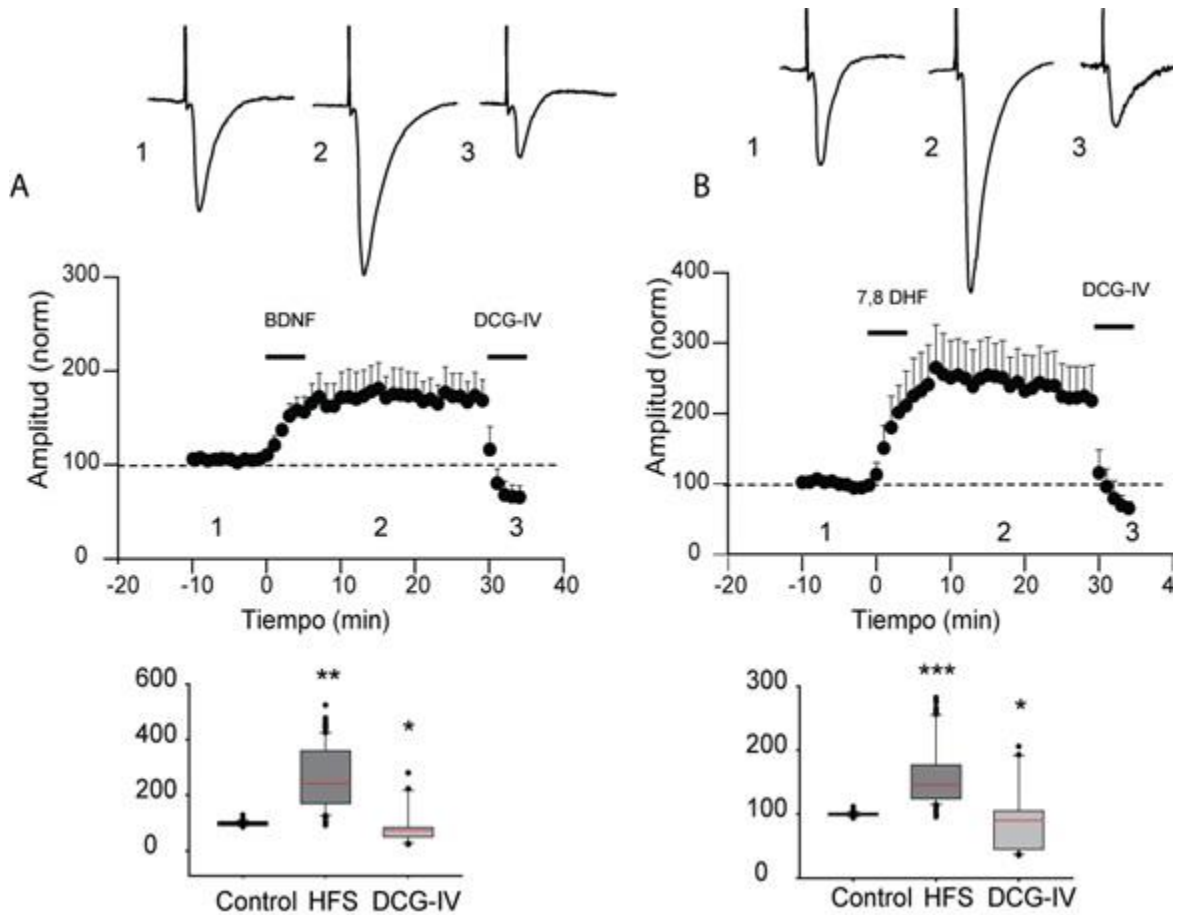


Figura 19. La estimulación de TrkB induce potenciación de la transmisión sináptica en la sinapsis FM – RS-SL. La perfusión de BDNF (A) como de 7,8-DHF (B) indujo una pronunciada potenciación de la transmisión sináptica en las interneuronas de disparo regular del SL. Cada gráfico representa el promedio de 6 (A) y 8 (B) células. En los paneles superiores se observa el cambio en la amplitud de las respuestas a lo largo del experimento y trazos de EPSCs representativos antes (1) y después (2) de la perfusión de BDNF o 7,8-DHF, así como después de perfundir DCG-IV. La sensibilidad a DCG-IV confirma que el origen de los EPSCs procede de la estimulación de la fibra musgosa. ** = $p < 0.001$; * = $p < 0.05$.

Interneuronas de disparo rápido del stratum lucidum

En marcada diferencia con lo observado en interneuronas de disparo regular, las interneuronas de disparo rápido no expresaron potenciación sináptica tras la perfusión de BDNF o 7,8-DHF (amplitud de EPSCs en presencia de BDNF 98.12 ± 1.29 % respecto al basal; $p < 0.05$; $n = 5$; con 7,8-DHF 89.98 ± 0.81 % con respecto al basal; $p < 0.01$; $n = 5$) (ver figura 18). En cada uno de los casos, las EPSCs fueron sensibles a DCG-IV (depresión sináptica parcial en el subgrupo de BDNF = $80.14 \pm$

4.88 % respecto al basal, en el subgrupo de 7,8-DHF 57.88 ± 1.81 % respecto al basal).

En conjunto, los experimentos en interneuronas del *stratum lucidum* sugieren que la activación del receptor TrkB con su agonista endógeno (BDNF) o uno sintético (7,8-DHF), produce un efecto diferencial. Mientras que la sinapsis entre las fibras musgosas y las interneuronas de disparo rápido es virtualmente insensible a la activación del receptor, la sinapsis formada con las interneuronas de disparo regular experimenta una marcada potenciación sináptica.

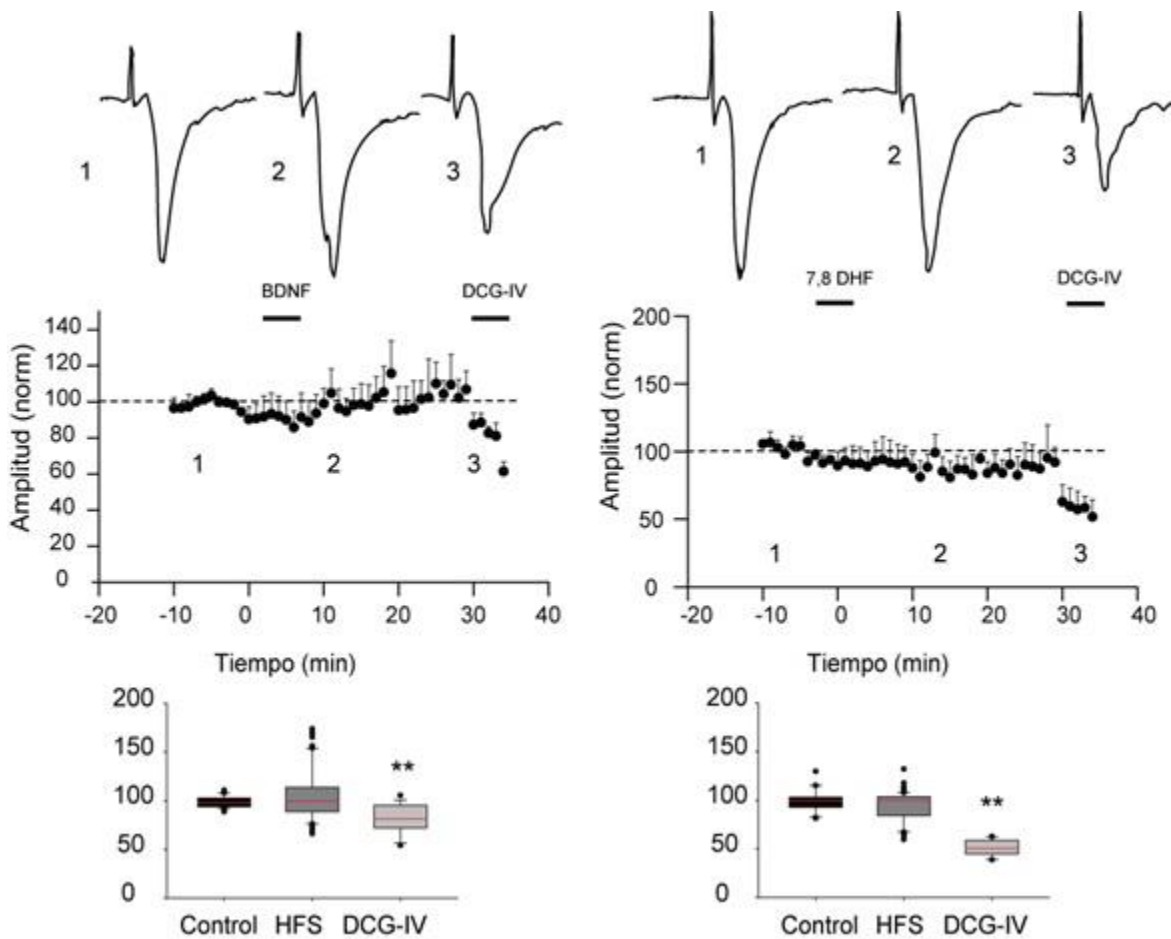


Figura 20. La estimulación de TrkB no induce plasticidad en interneuronas de disparo rápido del *s. lucidum*. A diferencia de las interneuronas de disparo regular, las FS-SL no experimentan plasticidad sináptica tras la perfusión de BDNF (A) o 7,8-DHF (B). La sensibilidad a DCG-IV confirma el origen de las corrientes registradas. Cada gráfico representa el promedio de 5 células. Los paneles superiores son cursos temporales de la amplitud de los EPSCs con respectivos trazos representativos. ** = $p < 0.01$.

Interneuronas del stratum oriens

Como se describió previamente, todas las interneuronas registradas en el SO de CA3 fueron de disparo rápido. En estas interneuronas, la activación del TrkB (con BDNF o 7,8-DHF) tuvo diferentes efectos. Un primer grupo de interneuronas registradas (n = 6) no experimentó modificación significativa en la amplitud de las EPSC tras la perfusión de BDNF o 7,8-DHF (amplitud tras la perfusión de BDNF 108.03 ± 0.74 % respecto al basal; $p > 0.05$; n = 3; con 7,8-DHF 105.8 ± 2.33 respecto al basal; $p > 0.05$; n = 3). Sin embargo 3 interneuronas registradas experimentaron potenciación sináptica (143.66 ± 3.22 % con respecto al basal; $p < 0.01$; n = 3). En la figura 19 se observa el promedio de las células registradas.

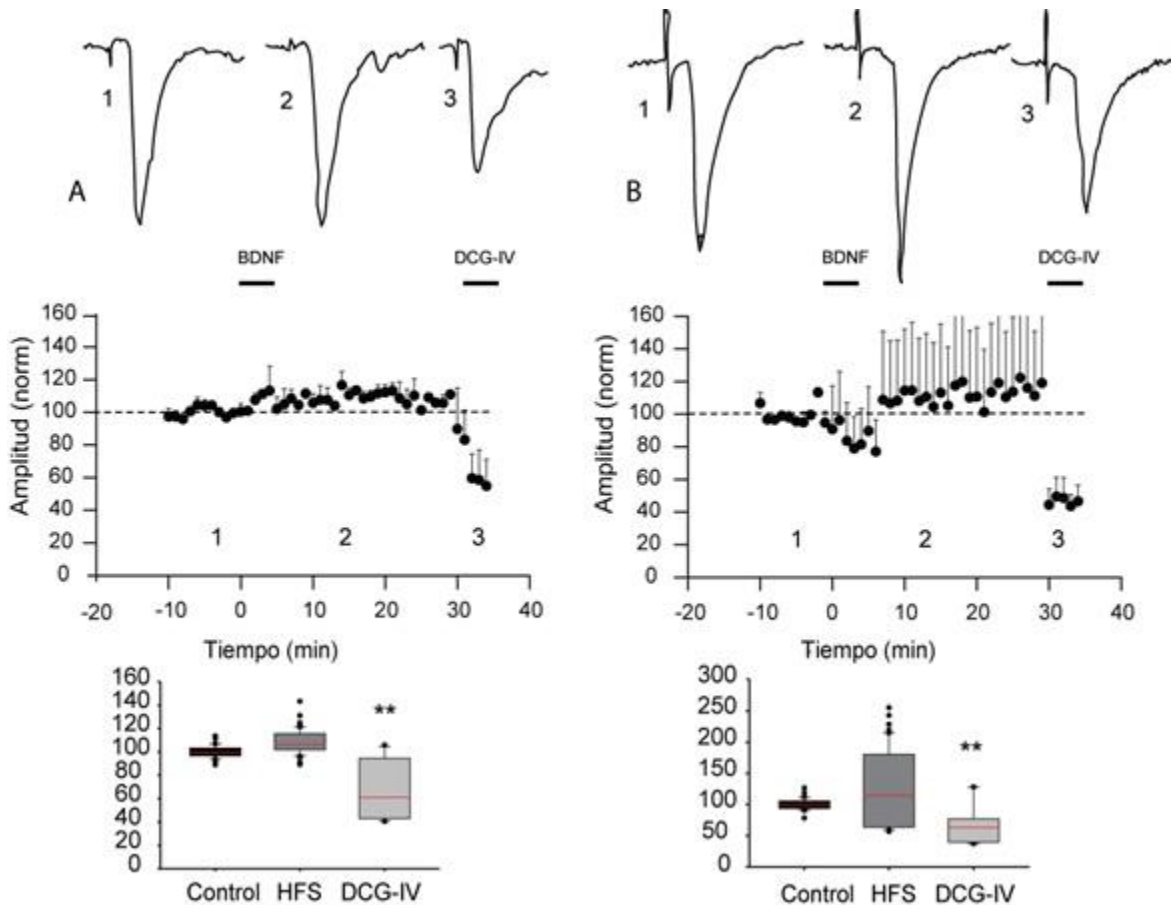


Figura 21. La activación del receptor TrkB induce diferentes fenómenos en interneuronas del *stratum oriens*. Mientras que la mayoría de las interneuronas del SO no expresa plasticidad sináptica tras la perfusión de BDNF (3 de 4) o 7,8-DHF (3 de 5), algunas sí presentaron potenciación de la transmisión sináptica. Los cursos temporales de A y B representan el promedio de las respuestas en todas las interneuronas del SO registradas (BDNF n = 4; 7,8-DHF n = 5). ** = $p < 0.01$.

Estos experimentos sugieren que ciertas interneuronas localizadas en el *stratum oriens* de CA3 expresan el receptor TrkB, y que este es capaz de inducir procesos de plasticidad sináptica, corroborando una vez más, la heterogeneidad de este grupo neuronal. O bien, que ciertas sinapsis entre las FM y las interneuronas de este estrato de CA3 son sensibles a la activación de este receptor, más no todas.

Un fenómeno que observamos en los registros electrofisiológicos de las interneuronas del SO es que la perfusión de BDNF dio lugar a respuestas polisinápticas y en algunos casos actividad epileptiforme. Las células que desarrollaron este fenómeno fueron descartadas del análisis debido a que no cumplieron con el requisito de permanecer monosinápticas. Las implicaciones biológicas de esta fenomenología no son abordadas en este trabajo, pero no cabe duda que podrían tener relevancia considerando lo ya reportado por algunos grupos de investigación acerca de la participación del receptor TrkB en la actividad epileptiforme en el lóbulo temporal (Mcnamara 2012). Sin embargo, lo anterior excede las dimensiones y propósitos de esta tesis.

6.5. El bloqueo farmacológico del receptor TrkB previene la inducción de potenciación en la sinapsis entre las FM y las interneuronas de disparo regular del *stratum lucidum*

El siguiente grupo de experimentos tuvo como finalidad demostrar la participación directa del receptor TrkB en la potenciación sináptica. Estos experimentos estuvieron restringidos a interneuronas de disparo regular del *stratum lucidum*, ya que este grupo neuronal experimentó potenciación sináptica (tras la perfusión de agonistas del receptor TrkB) de manera consistente. Para descartar la posible activación de receptores adicionales de neurotrofinas, la estimulación del TrkB fue realizada en presencia del agonista específico del TrkB en lugar de BDNF.

Tras la obtención de un basal estable de EPSCs durante 10 minutos en fijación de voltaje y en presencia de picrotoxina y D-AP5, se perfundió 7,8-DHF (25 μ M) de manera simultánea que el antagonista selectivo del receptor TrkB, ANA-12 (50 μ M)

(Ma et al. 2016; Xiwei Zheng, Cong Bi, Marissa Brooks 2015) por 5 minutos, tras este periodo se eliminaron las drogas y se continuó registrando durante 30 minutos más antes de perfundir DCG-IV.

De manera consistente, la inclusión de ANA-12 durante la perfusión de 7,8-DHF, abolió la potenciación sináptica de las interneuronas de disparo regular (96.90 ± 0.53 % respecto al basal; $p > 0.05$; $n = 3$).

Este experimento demuestra que la potenciación de la transmisión sináptica excitadora en interneuronas de disparo regular del SL es mediada por la activación y subsecuente señalización intracelular del receptor TrkB. Dado que el 7,8-DHF es un agonista altamente selectivo de TrkB, reduce considerablemente la posible participación de otros receptores de la familia Trk, como son TrkA y TrkC (Cazorla et al. 2011), así como la posible participación del receptor de la forma inmadura del BDNF, el p75.

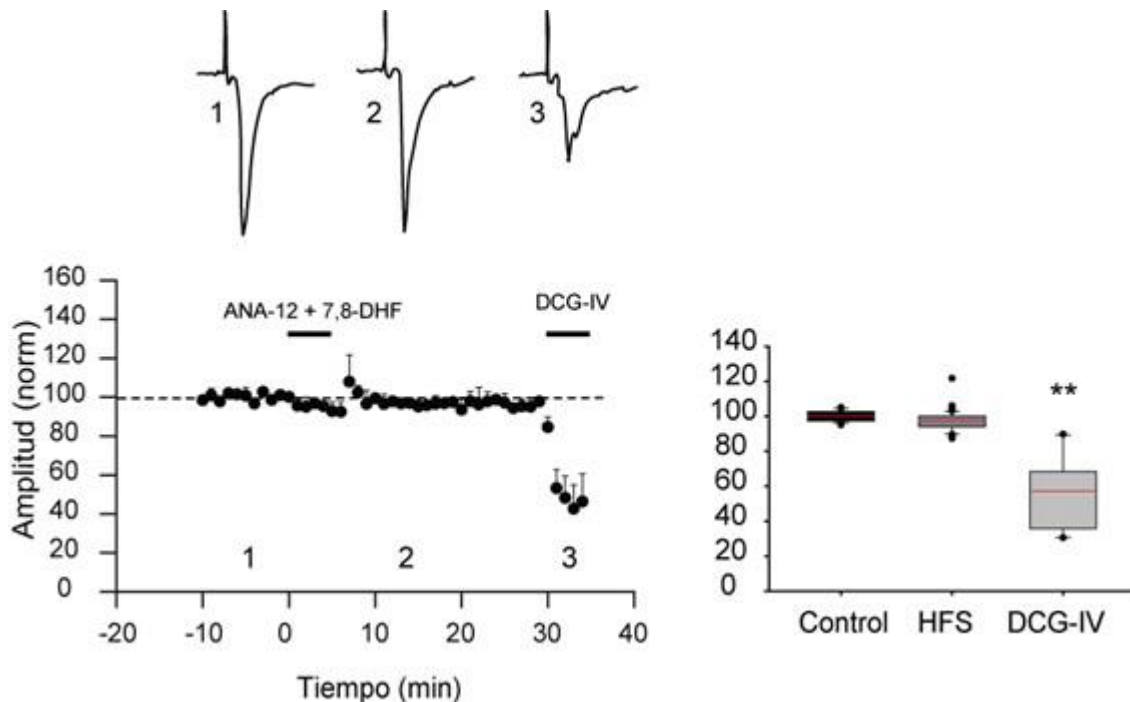


Figura 22. La LTP en las interneuronas de disparo regular del *stratum lucidum* es dependiente de la activación de receptor TrkB. La LTP inducida por la perfusión de 7,8-DHF fue abolida en presencia de ANA-12, un antagonista selectivo de TrkB. El panel de la izquierda es un curso temporal de la amplitud de los EPSCs, junto con trazos representativos antes (1) y después (2) de la perfusión de 7,8-DHF, así como después de perfundir DCG-IV (3). $n = 3$; ** = $p < 0.01$

7. Discusión

En esta tesis de investigación se obtuvieron sólidas evidencias de que ciertas subpoblaciones de interneuronas de la región CA3 del hipocampo expresan al receptor TrkB. También se muestra que la activación del receptor TrkB por su agonista endógeno (BDNF) o exógeno (7,8-DHF) induce efectos diferenciales en las interneuronas localizadas en el *stratum lucidum* y *stratum oriens* del hipocampo. Mientras que la transmisión excitadora de la FM en interneuronas de disparo rápido del SL es insensible a la estimulación del receptor TrkB, las interneuronas de disparo regular experimentan potenciación sináptica sostenida.

Por otra parte, las interneuronas del *stratum oriens* pueden expresar potenciación, ser insensibles o incluso, presentar hiper-excitabilidad tras la estimulación del receptor, lo que sugiere que la activación del receptor TrkB modula la excitabilidad del *stratum oriens*, aunque de forma más compleja. Dado que la potenciación observada tras la estimulación del receptor TrkB con 7,8-DHF fue bloqueada en presencia del antagonista selectivo, ANA-12, nuestros experimentos demuestran que los efectos observados son debidos exclusivamente a la activación de este receptor de neurotrofinas.

7.1. Propiedades intrínsecas y sinápticas de las interneuronas de CA3

A pesar de que se han publicado diferentes propuestas para clasificar interneuronas (Freund and Buzsáki 1996; Pelkey et al. 2017), los criterios propuestos son rebasados continuamente. La enorme diversidad funcional, y heterogeneidad a nivel morfológico, neuroquímico y electrofisiológico siguen siendo un reto para quienes intentan caracterizar fenómenos fisiológicos en subgrupos específicos de estas células. A pesar de esta limitación, decidimos utilizar criterios electrofisiológicos para subdividir a las interneuronas incluidas en este trabajo.

Las interneuronas registradas tanto en el SL como en el SO fueron agrupadas de acuerdo con sus patrones de disparo y propiedades intrínsecas (Figura 9). Adicionalmente se intentó utilizar el criterio de la expresión de proteínas de unión a

calcio. Identificamos interneuronas de disparo rápido tanto en el *stratum lucidum* como en el *stratum oriens*, las cuales alcanzan frecuencias de disparo de hasta 200 Hz. Así como interneuronas de disparo regular en el SL con frecuencias de disparo que no superan los 40 Hz ante inyecciones de corriente despolarizante de 300 pA. Así mismo, identificamos divergencias en cuanto a la expresión de conductancias como la corriente I_h , una conductancia observable con inyecciones de corriente hiperpolarizante durante la elaboración de la curva I-V. Sin excepción, todas las SO-IN presentaron esta corriente catiónica mixta. No así, las SL-IN que fueron más heterogéneas en cuanto a la expresión de esta conductancia. La diversidad en la expresión de los canales HCN en interneuronas de hipocampo ha sido previamente descrita (Anderson et al. 2011; Maccaferri and McBain 1996).

Los ensayos de inmunohistofluorescencia revelaron una proporción elevada de interneuronas positivas a parvalbúmina, una proteína de unión a calcio típica de interneuronas de disparo rápido (Jonas 2014). Mientras que la presencia de interneuronas positivas a calbindina o calretinina fue menor (imágenes no mostradas). Esto coincide con nuestros resultados electrofisiológicos, ya que de 144 interneuronas, 93 tuvieron un fenotipo de disparo rápido, lo que representa un 65 % del total. A pesar de que no estuvimos en la posibilidad de realizar análisis de inmunofluorescencia en interneuronas caracterizadas electrofisiológicamente, es válido asumir que las interneuronas de disparo rápido registradas en este estudio son positivas a parvalbúmina.

De igual manera, nuestros registros confirmaron que la cinética de los EPSCs es diferente a pesar de ser evocados en las fibra musgosas. Las interneuronas de disparo regular presentaron la constante de tiempo de subida de los EPSC más prolongada con respecto a los EPSCs de las SL-FS y SO-IN (Figura 10). Este resultado confirma los reportes previos que demostraron la diversidad en la composición de los receptores AMPA en interneuronas de CA3 (Jonas et al. 2004; Stincic and Frerking 2015; Tóth and McBain 1998).

Dada la diversidad en la composición y expresión de receptores AMPA en las sinapsis de las fibras musgosas en las interneuronas de la región CA3, es válido

preguntarse si existe una correlación con la mayor expresión funcional de receptores TrkB. Una cuestión que exige mayor investigación.

7.2. La expresión del receptor TrkB en las interneuronas de CA3

Trabajos previos reportaron la presencia de TrkB en diferentes tipos neuronales del sistema nervioso central (Du et al. 2003; McNamara 2014; Minichiello et al. 2002; Xenos et al. 2017). Sin embargo, es de resaltar que a la fecha no hay reportes acerca de la expresión de este receptor en interneuronas de CA3, particularmente en aquellas somáticamente localizadas en los estrata *oriens* y *lucidum*.

Los resultados preliminares que obtuvimos con los ensayos de inmunohistofluorescencia indican que el receptor TrkB se localiza abundantemente en las neuronas piramidales de CA3, pero también en las interneuronas de esta región hipocampal (figuras 11 a 13). Logramos identificar neuronas positivas a GAD-67 y TrkB en estratos extrapiramidales, lo que confirma la noción de que se trata de interneuronas.

Con estos datos en nuestras manos, procedimos a identificar si la activación del receptor TrkB induce modificaciones a nivel electrofisiológico en las interneuronas de CA3.

7.3. Modificaciones en las propiedades del disparo de las interneuronas de CA3 por el receptor TrkB

Con anterioridad, se reportó que la perfusión de BDNF es capaz de modificar el disparo neuronal. Un primer reporte demostró que la perfusión exógena de esta neurotrofina incrementa la frecuencia de disparo de neuronas hipocampales en cultivo (Levine 1995). Otro reporte concluyó que disminuye la excitabilidad y frecuencia de disparo de interneuronas del giro dentado mantenidas *ex vivo* (Nieto-gonzalez and Jensen 2013). La modulación del disparo ha sido atribuida a que el

TrkB puede estar modulando las conductancias (de canales iónicos) que participan en la excitabilidad (Blum et al. 2002).

A diferencia de estos reportes, nosotros no encontramos cambios en la frecuencia ni en los patrones temporales de disparo de las interneuronas de CA3 durante la perfusión exógena de BDNF o del agonista selectivo 7,8-DHF (Figuras 14 a 16). Tampoco encontramos cambios en la cinética del potencial de acción de estas células (figura 17). La ausencia de modulación de estos parámetros sugiere que la activación del receptor TrkB no participa en el control de las corrientes iónicas que subyacen el disparo de las interneuronas de CA3.

7.4. El efecto de la activación del receptor TrkB en la transmisión sináptica de las fibras musgosas en interneuronas de CA3

La consecuencia inmediata de la unión del BDNF con el receptor TrkB es la activación de diferentes vías de señalización intracelular, muchas de ellas involucradas en fenómenos de plasticidad estructural y sináptica (Benmansour et al. 2008; Edelmann, Leßmann, and Brigadski 2014; Hartmann and Heumann 2001; Leal, Bramham, and Duarte 2017). A pesar de esto, existe muy poca información acerca del papel que ejerce la activación de las diferentes vías de segundos mensajeros (activadas por el sistema BDNF/TrkB) y su papel en la fuerza de la transmisión sináptica.

Nuestros resultados revelaron de manera consistente que la perfusión de BDNF (15 ng/mL) no modifica la amplitud de los EPSCs evocados por estimulación de las FM en interneuronas de disparo rápido del SL (figura 21). La ausencia de plasticidad se replicó en presencia del agonista específico del receptor TrkB, el 7,8-DHF. A diferencia de estos resultados, las interneuronas de disparo regular del *stratum lucidum* mostraron potenciación de los EPSCs evocados; efecto que se replicó con el agonista 7,8-DHF (Figura 19). Un trabajo previo de nuestro laboratorio (Tecuatl et al; 2018), utilizando la técnica de western blot, determinó que en la región CA3, la activación del receptor TrkB activa las vías de señalización intracelular PI3K-Akt

y Ca^{2+} -CaMKII y reduce la actividad de la vía ERK/MAPK. Tanto las vías de Akt como la vía de CaMKII participan de manera crítica en la inducción de muchas formas de plasticidad sináptica en el hipocampo (Leal et al. 2017; Leal, Comprido, and Duarte 2014; Polnau et al. 2006; Shonesy et al. 2014). Por tal razón, los siguientes experimentos deben estar encaminados a demostrar farmacológicamente, si una de estas tres vías juega un papel crítico en la inducción de LTP en las interneuronas de CA3 por activación del receptor TrkB.

De manera sistemática, los registros electrofisiológicos de este trabajo, fueron realizados con el protocolo de pulsos pareados, razón por la cual, se pudo determinar el índice de facilitación antes y después de la potenciación sináptica. Nuestros resultados mostraron que esta proporción se mantuvo relativamente constante antes y después de la potenciación (variación no significativa menor al 20%). Dado que el índice de facilitación no cambió significativamente tras la LTP, este dato sugiere (aunque no confirma) que el locus de la LTP es postsináptico, es decir, debido a la activación del receptor TrkB en la interneurona registrada y no en la terminal presináptica.

Aun así, se requieren más experimentos para confirmar o descartar esta hipótesis. Por ejemplo, si la pipeta de registro estuviera cargada con BAPTA (para quelar el calcio intracelular) y la aplicación exógena de BDNF o 7,8-DHF es incapaz de inducir potenciación, confirmaría el origen postsináptico del fenómeno plástico. Si el fenómeno se sigue presentando significaría que la terminal presináptica (a saber, la fibra musgosa) expresa receptores TrkB que controlan la liberación de glutamato.

Un experimento adicional que contribuiría a resolver este problema sería mantener a la interneurona en un potencial muy negativo (-100 mV) durante la perfusión de los agonistas del receptor TrkB. La hiperpolarización causaría inactivación de canales de calcio dependientes de voltaje involucrados en la potenciación Hebbiana (Galván et al. 2008). Si la inactivación neuronal suprime la inducción de potenciación por activación del receptor TrkB, este experimento apoyaría la noción de que el mecanismo celular responsable de la LTP se encuentra localizado a nivel postsináptico.

Estos experimentos se encuentran en curso y son fundamentales para demostrar el mecanismo celular que subyace a la potenciación de la transmisión excitadora proveniente de las fibras musgosas en las interneuronas de disparo regular del *stratum lucidum* por la activación del receptor TrkB.

Si bien nuestros resultados sugieren de manera importante la participación directa del receptor TrkB neuronal en el fenómeno de LTP observado en la sinapsis entre las fibras musgosas y las interneuronas de disparo regular del *stratum lucidum*, no debemos descartar otras posibilidades. Una de esas posibilidades es la participación de la astrogliia residente en el hipocampo. Previamente se ha demostrado que los astrocitos expresan de manera funcional al receptor TrkB (Climent et al. 2000) y que son capaces de responder a BDNF en el medio extracelular. Sin duda, la participación de la glia, y particularmente de los astrocitos, puede ser crucial en las consecuencias sinápticas asociadas a la perfusión de agonistas del receptor TrkB. Por lo que es menester profundizar el papel glial en la potenciación sináptica observada en nuestros experimentos.

8. Conclusión

Mediante análisis electrofisiológicos *ex vivo* y aproximaciones de inmunofluorescencia, hemos encontrado pruebas consistentes que sugieren que el receptor TrkB está presente en interneuronas de CA3. Y que, además, su activación es selectiva. Demostramos que la activación de TrkB causa potenciación en la sinapsis entre las fibras musgosas y las interneuronas de disparo regular del *stratum lucidum*. Nuestros datos aportan evidencias que corroboran la gran complejidad y diversidad de las respuestas fisiológicas mediadas por este grupo de células del hipocampo.

9. Perspectivas

- Determinar el locus de inducción de la LTP inducida por el receptor TrkB en interneuronas de disparo regular del *stratum lucidum*.
- Identificar, en función de marcadores moleculares, el subgrupo de interneuronas que expresa dicha potenciación sináptica.
- Elucidar los mecanismos intracelulares que subyacen la potenciación sináptica inducida por el receptor TrkB.
- Estudiar si las propiedades de sumación e integración sináptica se ven modificadas por la estimulación del receptor TrkB en interneuronas de CA3.
- Estudiar la posible participación de la astrogliá en los fenómenos de plasticidad sináptica dependientes del receptor TrkB.

Bibliografía

- Aaron, G. B., K. S. Wilcox, and M. A. Dichter. 2003. "Different Patterns of Synaptic Transmission Revealed between Hippocampal CA3 Stratum Oriens and Stratum Lucidum Interneurons and Their Pyramidal Cell Targets." *Neuroscience* 117(1):169–81.
- Airaksinen, Matti S. and Mart Saarma. 2002. "The GDNF Family: Signalling, Biological Functions and Therapeutic Value." *Nature Reviews Neuroscience* 3(5):383–94.
- Alle, Henrik and Peter Jonas. 2001. "PTP and LTP at a Hippocampal Mossy Fiber-Interneuron Synapse." 98(25).
- Andersen, P., T. V. P. Bliss, and K. K. Skrede. 1971. "Lamellar Organization of Hippocampal Excitatory Pathways." *Experimental Brain Research* 13(2):222–38.
- Anderson, Warren D., Emilio J. Galván, Jocelyn C. Mauna, Edda Thiels, and Germán Barrionuevo. 2011. "Properties and Functional Implications of Ih in Hippocampal Area CA3 Interneurons." *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* 462(6):895–912.
- Benmansour, Saloua et al. 2008. "Influence of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) on Serotonin Neurotransmission in the Hippocampus of Adult Rodents." *European Journal of Pharmacology* 587(1–3):90–98.
- Berghuis, Paul et al. 2006. "Brain-Derived Neurotrophic Factor Selectively Regulates Dendritogenesis of Parvalbumin-Containing Interneurons in the Main Olfactory Bulb Through the PLC γ Pathway."
- Berridge, Michael J. 2009. "Neuronal Signalling." *Cell Signaling Biology* 1–91.
- Biarç, Jordane, Robert J. Chalkley, A. L. Burlingame, and Ralph A. Bradshaw. 2013. "Dissecting the Roles of Tyrosines 490 and 785 of TrkA Protein in the Induction of Downstream Protein Phosphorylation Using Chimeric Receptors." *Journal of Biological Chemistry* 288(23):16606–18.

- Blum, Robert, Karl W. Kafitz, and Arthur Konnerth. 2002. "Neurotrophin-Evoked Depolarization Requires the Sodium Channel Na V 1 . 9."
- Cappaert, Natalie L. M., Niels M. Van Strien, and Menno P. Witter. 2015. *Hippocampal Formation*. Fourth Edi. Elsevier Inc. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-374245-2.00020-6>).
- Cazorla, Maxime et al. 2011. "Identification of a Low-Molecular Weight TrkB Antagonist with Anxiolytic and Antidepressant Activity in Mice." *Journal of Clinical Investigation* 121(5):1846–57.
- Climent, Eva, Âa Sancho-tello, Rosa Min, Domingo Baretino, and Consuelo Guerri. 2000. "Astrocytes in Culture Express the Full-Length Trk-B Receptor and Respond to Brain Derived Neurotrophic Factor by Changing Intracellular Calcium Levels : Effect of Ethanol Exposure in Rats." 288:53–56.
- Devin K. Binder, Helen E. Scharfman. 2004. "BDNF." 22(3):123–31.
- Du, Jing et al. 2003. "Regulation of TrkB Receptor Tyrosine Kinase and Its Internalization by Neuronal Activity and Ca²⁺influx." *Journal of Cell Biology* 163(2):385–95.
- Dudek, Serena M. and Mark F. Bear. 1992. "Homosynaptic Long-Term Depression in Area CA1 of Hippocampus and Effects of N-Methyl-D-Aspartate Receptor Blockade." 89(May):4363–67.
- Edelmann, Elke, Volkmar Leßmann, and Tanja Brigadski. 2014. "Pre- and Postsynaptic Twists in BDNF Secretion and Action in Synaptic Plasticity." *Neuropharmacology* 76(PART C):610–27. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.05.043>).
- Feenstra, Bjarke et al. 2014. "Common Variants Associated with General and MMR Vaccine-Related Febrile Seizures." *Nature Genetics* 46(12):1274–82. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1038/ng.3129>).
- Freund, T. F. and G. Buzsáki. 1996. "Interneurons of the Hippocampus." *Hippocampus* 6(4):347–470.

- Galván, Emilio J., Eduardo Calixto, and Germán Barrionuevo. 2008. "Bidirectional Hebbian Plasticity at Hippocampal Mossy Fiber Synapses on CA3 Interneurons." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 28(52):14042–55. Retrieved (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2660276&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>).
- Galván, Emilio J., Kathleen E. Cosgrove, and Germán Barrionuevo. 2011. "Multiple Forms of Long-Term Synaptic Plasticity at Hippocampal Mossy Fiber Synapses on Interneurons." *Neuropharmacology* 60(5):740–47. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2010.11.008>).
- Gibon, Julien and Philip A. Barker. 2017. "Neurotrophins and Proneurotrophins: Focus on Synaptic Activity and Plasticity in the Brain." *Neuroscientist* 23(6):587–604.
- Gutierrez, Rafael. 2017. "Target-Dependent Compartmentalization of the Corelease of Glutamate and GABA from the Mossy Fibers." 37(235):701–14.
- Harris, Eric W. and W. C. Carl. 1986. "Long-Term Potentiation of Guinea Pig Mossy Fiber Responses Is Not Blocked by N-Methyl D-Aspartate Antagonists." 7:1–6.
- Hartmann, Matthias and Rolf Heumann. 2001. "Synaptic Secretion of BDNF after High-Frequency Stimulation of Glutamatergic Synapses." 20(21):5887–97.
- He, Chao, Fang Chen, Bo Li, and Zhian Hu. 2014. "Neurophysiology of HCN Channels: From Cellular Functions to Multiple Regulations." *Progress in Neurobiology* 112:1–23.
- Henze, D. A., N. N. Urban, and G. Barrionuevo. 2000. "The Multifarious Hippocampal Mossy Fiber Pathway: A Review." *Neuroscience* 98(3):407–27.
- Hoffman, Gloria E. and Wei Wei Le. 2004. "Just Cool It! Cryoprotectant Anti-Freeze in Immunocytochemistry and in Situ Hybridization." *Peptides* 25(3):425–31.
- Jonas, Peter. 2014. "Fast-Spiking, Parvalbumin + GABAergic Interneurons: From Cellular Design to Microcircuit Function." 345(6196).

- Jonas, Peter, Josef Bischofberger, Desdemona Fricker, and Richard Miles. 2004. "Interneuron Diversity Series : Fast in , Fast out – Temporal and Spatial Signal Processing in Hippocampal Interneurons." 27(1):30–40.
- Joseph-Hernandez, Sylvia, Sean Jmaeff, Iulia Pirvulescu, Tahar Aboukassim, and H. Uri Saragovi. 2017. "Neurotrophin Receptor Agonists and Antagonists as Therapeutic Agents: An Evolving Paradigm." *Neurobiology of Disease* 97:139–55. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2016.08.004>).
- Kafitz, Karl W., Christine R. Rose, Hans Thoenen, and Arthur Konnerth. 1999. "Neurotrophin-Evoked Rapid Excitation through TrkB Receptors." 401(October).
- Kang, Hyejin and Erin M. Schuman. 1995. "Long-Lasting Neurotrophin-Induced Enhancement of Synaptic Transmission in the Adult Hippocampus." 267(March):0–5.
- Kaplan, David R., Freda D. Miller, David R. Kaplan, Freda D. Miller, and Freda D. Miller. 2000. "Neurotrophin Signal Transduction in the Nervous System." *Current Opinion in Neurobiology* 10(3):381–91. Retrieved (c:%5CDocuments and Settings%5COwner%5CMy Documents%5CReferences%5CJournals Articles%5C934.pdf%5Cninternal-pdf://930-0783310081/930.pdf).
- Konnerth, Arthur. 2004. "From Modulator to Mediator : Rapid Effects of BDNF on Ion Channels." *BioEssays* 1185–94.
- Lawrence, J. Josh and Chris J. McBain. 2003. "Interneuron Diversity Series: Containing the Detonation - Feedforward Inhibition in the CA3 Hippocampus." *Trends in Neurosciences* 26(11):631–40.
- Leal, G., C. R. Bramham, and C. B. Duarte. 2017. *BDNF and Hippocampal Synaptic Plasticity*. 1st ed. Elsevier Inc. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/bs.vh.2016.10.004>).
- Leal, Graciano, Diogo Comprido, and Carlos B. Duarte. 2014. "BDNF-Induced Local Protein Synthesis and Synaptic Plasticity." *Neuropharmacology* 76(PART

- C):639–56. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.04.005>).
- Levine. 1995. “Brain-Derived Neurotrophic Factor Rapidly Enhances Synaptic Transmission in Hippocampal Neurons via Postsynaptic.” 92(August):8074–77.
- Lindahl, Maria, Mart Saarma, and Päivi Lindholm. 2017. “Unconventional Neurotrophic Factors CDNF and MANF: Structure, Physiological Functions and Therapeutic Potential.” *Neurobiology of Disease* 97:90–102. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2016.07.009>).
- Lisman, J. E. 1999. “Relating Hippocampal Circuitry to Function: Recall of Memory Sequences by Reciprocal Dentate-CA3 Interactions.” *Neuron* 22(2):233–42.
- Ma, Min et al. 2016. “Adjunctive Treatment of Brexpiprazole with Fluoxetine Shows a Rapid Antidepressant Effect in Social Defeat Stress Model: Role of BDNF-TrkB Signaling.” *Scientific Reports* 6(September):1–12. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1038/srep39209>).
- Maccaferri, Gianmaria, Jean-claude Lacaille, and Albert Einstein. 2003. “Interneuron Diversity Series : Hippocampal Interneuron Classifications – Making Things as Simple as Possible , Not Simpler.” 26(10):564–71.
- Maccaferri, Gianmaria and Chris J. Mcbain. 1996. “The Hyperpolarization-Activated Current (I_h) and Its Contribution to Pacemaker Activity in Rat CA1 Hippocampal Stratum Oriens-Alveus Interneurons.” 119–30.
- Maccaferri, Gianmaria, Katalin To, and Chris J. Mcbain. 1998. “Target-Specific Expression of Presynaptic Mossy Fiber Plasticity.” 279(February).
- Marongiu, Daniele, Barbara Imbrosci, and Thomas Mittmann. 2013. “Modulatory Effects of the Novel TrkB Receptor Agonist 7 , 8-Dihydroxy Fl Avone on Synaptic Transmission and Intrinsic Neuronal Excitability in Mouse Visual Cortex in Vitro.” *European Journal of Pharmacology* 709(1–3):64–71. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.03.044>).
- McBain, Chris J. 2001. “Interneurons Unbound.” *Nature Reviews Neuroscience* 2(1):11–23.

- Mcnamara, James O. 2012. "Temporal Lobe Epilepsy and the BDNF Receptor , TrkB Jasper ' s Basic Mechanisms of the Epilepsies." *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies* 1–29.
- McNamara, James O. 2006. "Localization of Brain-Derived Neurotrophic Factor to Distinct Terminals of Mossy Fiber Axons Implies Regulation of Both Excitation and Feedforward Inhibition of CA3 Pyramidal Cells." 24(50):11346–55.
- McNamara, James O. 2014. "The Cellular and Synaptic Location of Activated TrkB in Mouse Hippocampus During Limbic Epileptogenesis." *Jornal of Comparative Neurology* 521(3):499–521.
- Minichiello, Liliana et al. 1999. "Essential Role for TrkB Receptors in Hippocampus-Mediated Learning University of Heidelberg." 24:401–14.
- Minichiello, Liliana. 2009. "TrkB Signalling Pathways in LTP and Learning." *Nature Reviews Neuroscience* 10(12):850–60. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1038/nrn2738>).
- Minichiello, Liliana, Anna Maria Calella, Diego L. Medina, Tobias Bonhoeffer, and Martin Korte. 2002. "Mechanism of TrkB-Mediated Hippocampal Long-Term Potentiation." *Neuron* 36:121–37.
- Nicoll, Roger a and Dietmar Schmitz. 2005. "Synaptic Plasticity at Hippocampal Mossy Fibre Synapses." *Nature Reviews. Neuroscience* 6(11):863–76. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16261180>).
- Nieto-Gonzalez, Jose Luis and Kimmo Jensen. 2013. "BDNF Depresses Excitability of Parvalbumin-Positive Interneurons through an M-Like Current in Rat Dentate Gyrus." *PLoS ONE* 8(6).
- Patapoutian, Ardem and Louis F. Reichardt. 2001. "Trk Receptors : Mediators of Neurotrophin Action." 281–86.
- Pelkey, Kenneth A. et al. 2017. "Hippocampal GABAergic Inhibitory Interneurons." *Physiological Reviews* 97(4):1619–1747. Retrieved (<http://physrev.physiology.org/lookup/doi/10.1152/physrev.00007.2017>).

- Pelkey, Kenneth A., Gabriela Lavezzari, Claudia Racca, Katherine W. Roche, and Chris J. McBain. 2005. "MGlur7 Is a Metaplastic Switch Controlling Bidirectional Plasticity of Feedforward Inhibition." *Neuron* 46(1):89–102.
- Polnau, Dorit G. et al. 2006. "Hippocampal Long-Term Potentiation Is Supported by Presynaptic and Postsynaptic Tyrosine Receptor Kinase B-Mediated Phospholipase C α Signaling Annette Ga." 26(13):3496–3504.
- Rebola, Nelson, Mario Carta, and Christophe Mulle. 2017. "Operation and Plasticity of Hippocampal CA3 Circuits: Implications for Memory Encoding." *Nature Reviews Neuroscience* 18(4):209–21. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1038/nrn.2017.10>).
- Rollenhagen, Astrid and Joachim H. R. Lübke. 2010. "The Mossy Fiber Bouton: The 'Common' or the 'Unique' Synapse?" 2(March):1–9.
- Scharfman, Helen E. and Neil J. Maclusky. 2014. "Differential Regulation of BDNF, Synaptic Plasticity and Sprouting in the Hippocampal Mossy Fiber Pathway of Male and Female Rats." *Neuropharmacology* 76(PART C):696–708. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.04.029>).
- Shonesy, Brian C., Nidhi Jalan-Sakrikar, Victoria S. Cavener, and Roger J. Colbran. 2014. "CaMKII: A Molecular Substrate for Synaptic Plasticity and Memory." *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 122:61–87.
- Spruston, Nelson and Joachim Lu. 1997. "Interneurons in the Stratum Lucidum of the Rat Hippocampus: An Anatomical Analysis." 440(March):427–40.
- Stincic, Todd L. and Matthew E. Froking. 2015. "Different AMPA Receptor Subtypes Mediate the Distinct Kinetic Components of a Biphasic EPSC in Hippocampal Interneurons." *Frontiers in Synaptic Neuroscience* 7(May):1–11. Retrieved (http://www.frontiersin.org/Synaptic_Neuroscience/10.3389/fnsyn.2015.00007/abstract).
- Street, Michael. 2014. "Biochemical and Biophysical Investigation of Brain-Derived Neurotrophic Factor Mimetic 7,8-Dihydroxyflavone in Binding and Activation of

TrkB Receptor.”

Switon, Katarzyna, Katarzyna Kotulska, Aleksandra Janusz-Kaminska, Justyna Zmorzynska, and Jacek Jaworski. 2016. “Molecular Neurobiology of MTOR.” *Neuroscience* 341:112–53. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.11.017>).

Tecuatl et al; 2018. “TrkB-Mediated Activation of the Phosphatidylinositol-3- Kinase / Akt Cascade Reduces the Damage Inflicted by Oxygen – Glucose Deprivation in Area CA3 of the Rat Hippocampus.” 47(September 2017):1096–1109.

Tóth, K. and C. J. McBain. 1998. “Afferent-Specific Innervation of Two Distinct AMPA Receptor Subtypes on Single Hippocampal Interneurons.” *Nature Neuroscience* 1(7):572–78.

Toth, K., G. Soares, J. J. Lawrence, E. Philips-Tansey, and C. J. McBain. 2000. “Differential Mechanisms of Transmission at Three Types of Mossy Fiber Synapse.” *The Journal of Neuroscience* 20(22):8279–89. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11069934>).

Williams, Emma-jane and Patrick Doherty. 1999. “3-Kinase in a Neuronal Cell Survival Pathway.” 280:272–80.

Wu, Han Fang et al. 2017. “Soluble Epoxide Hydrolase Inhibitor and 14,15-Epoxyeicosatrienoic Acid-Facilitated Long-Term Potentiation through CAMP and CaMKII in the Hippocampus.” *Neural Plasticity* 2017.

Xenos, Dionysios et al. 2017. “Loss of TrkB Signaling in Parvalbumin-Expressing Basket Cells Results in Network Activity Disruption and Abnormal Behavior.” *Cerebral Cortex* (March):1–15. Retrieved (<http://academic.oup.com/cercor/article/doi/10.1093/cercor/bhx173/4084668/Loss-of-TrkB-Signaling-in-ParvalbuminExpressing>).

Xiwei Zheng, Cong Bi, Marissa Brooks, and David S. Hage. 2015. “The Small-Molecule TrkB Agonist 7, 8-Dihydroxyflavone Decreases Hippocampal Newborn Neuron Death After Traumatic Brain Injury.” *Anal Chem.* 25(4):368–

79.

Yin, Yong, Gerald M. Edelman, and Peter W. Vanderklis. 2001. "The Brain-Derived Neurotrophic Factor Enhances Synthesis of Arc in Synaptoneurosomes."

Yuan, Mei et al. 2017. "Somatostatin-Positive Interneurons in the Dentate Gyrus of Mice Provide Local- and Long-Range Septal Synaptic Inhibition." 1–25.