



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO  
NACIONAL**

**UNIDAD COAPA**

**DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGÍA**

**Análisis Cuántico de las Propiedades Plásticas a Corto Plazo de la Sinapsis de la  
Fibra Musgosa en las Neuronas Piramidales de la Región CA3b del hipocampo**

Tesis que presenta

**M.C.P. Felipe Antonio Méndez Salcido**

Para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias en**

**Neurofarmacología y Terapéutica Experimental**

Director de la Tesis

**Dr. Emilio Javier Galván Espinosa**



“[...] the synapse is the most fantastic plastic element, enabling us to learn and change.”

Idan Segev

El contenido de esta tesis constituye en su totalidad trabajo realizado durante el programa de maestría del Departamento de Farmacobiología del CINVESTAV y fue realizado con el apoyo de la beca para maestría CONACYT No. 421697 otorgada a mí y los fondos de proyecto CONACYT CB-2011-01-166241 e INFR-2012-01-187757 otorgados a Dr. Emilio Javier Galván Espinosa. El contenido de esta tesis no ha sido enviado, total o parcialmente, a ninguna otra Universidad o institución para la obtención de ningún otro grado, diploma o certificación.

## RESUMEN

La transferencia de información en el sistema nervioso central esta mediada principalmente por sinapsis químicas. Múltiples mecanismos de regulación impactan y modifican la eficacia de esta forma de comunicación neuronal en escalas de tiempo de milisegundos a segundos, en estrecha relación con la historia actividad previa; un fenómeno denominado plasticidad sináptica a corto plazo. Estos mecanismos le confieren capacidades computacionales a los contactos sinápticos.

En este tesis se aborda el estudio de los mecanismos involucrados en la plasticidad a corto plazo del complejo de la fibra musgosa, una sinapsis icónica de la formación hipocampal, mediante la implementación de un análisis cuántico basado en fluctuaciones de amplitud de la corriente post-sináptica y se documentan las modificaciones en los parámetros elementales de neurotransmisión durante periodos de facilitación sináptica.

### Abstract

Transference of information is carried out primarily by chemical synapses in the central nervous system. Several regulatory mechanisms shape the efficacy of this form of communication between neurons in a time scale from milliseconds to seconds in an activity-dependent fashion; a phenomenon called short-term synaptic plasticity. These mechanisms convey synapses with computational properties.

Within this thesis, the mechanisms involved in short-term plasticity at the mossy fiber synaptic complex, an iconic synapse in the hippocampal formation, are studied by implementing a quantal analysis base on the fluctuation of post-synaptic current and the changes in the elemental parameters of neurotransmission during periods of facilitations are documented.

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>1.1 Introducción General</b>	<b>7</b>
<b>1.2 La Doctrina Neuronal y el Origen de la Sinapsis</b>	<b>8</b>
<b>1.3 Morfología General de la Neurona y la Sinapsis</b>	<b>10</b>
1.3.1 Soma	11
1.3.2 Dendritas	12
1.3.3 Axón	13
1.3.4 Sinapsis	14
<b>1.4 Fisiología de la Transmisión Sináptica</b>	<b>15</b>
1.4.1 Principios Elementales de Neurotransmisión	16
1.4.2 Propiedades Pasivas y Activas de las Dendritas	17
1.4.3 Plasticidad y Propiedades Computacionales de la Transmisión Sináptica	18
1.4.4 Teoría Cuántica de la Liberación del Neurotransmisor	24
1.4.5 Métodos Tradicionales de Análisis Cuántico y Metodologías Emergentes	28
<b>1.5 El Hipocampo y el Complejo Sináptico de la Fibra Musgosa</b>	<b>34</b>
<b>1.6 Hipótesis</b>	<b>41</b>
<b>1.7 Objetivos</b>	<b>42</b>
1.7.1 Objetivo general	42
1.7.2 Objetivos Específicos	42
<b>2 Metodología</b>	<b>43</b>
<b>2.1 Preparación <i>ex vivo</i> de rebanada de hipocampo</b>	<b>43</b>
<b>2.2 Registro de <i>patch-clamp</i> en modalidad de célula completa.</b>	<b>45</b>
2.2.1 Registros de Características Intrínsecas	45
2.2.2 Estimulación Sináptica	47
2.2.3 Eventos Asincrónicos	48
2.2.4 Curva de condiciones iónicas.	49
2.2.5 Dificultades Inherentes al Estudio de la Fibra Musgosa	50
<b>3 Resultados</b>	<b>52</b>
<b>3.1 Características Intrínsecas</b>	<b>52</b>
<b>3.2 Transmisión Sináptica en el Complejo de la Fibra Musgosa</b>	<b>55</b>

3.2.1 Eventos Asincrónicos	56
3.2.2 Análisis de Varianza-Media	59
<b>4 discusión</b>	<b>64</b>
<b>5 Conclusiones</b>	<b>69</b>
<b>6 Perspectivas</b>	<b>70</b>
<b>7 Referencias</b>	<b>71</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLO

AMPA	Ácido- $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpriopiónico
AP-V	Ácido 2-Amino-5-fosfonovaleriánico
CA	Cornu Ammonis
Ca <sub>local</sub>	Concentración de calcio en la terminal sináptica
C.V.	Coficiente de Variación
DCG-IV	(2S,1'R;2'R,3'R)-2-(2,3-dicarboxiciclopropil)glicina
EC	Corteza Entorrinal
EPSC	Corriente post-sináptica excitatoria
EPSP	Potencial post-sináptico excitatorio
GD	Giro Dentado
I	Corriente
N	Número de sitios de liberación
NMDA	Ácido N-metil-D-aspártico
P	Probabilidad de liberación
PA	Potencial de Acción
PA <sub>axón</sub>	Potencial de Acción Axónal
PA <sub>local</sub>	Potencial de Acción en la terminal
Q	Magnitud Cuántica
SL	Stratum Lucidum
SO	Stratum Oriens
SP	Stratum Piramidial
SR	Stratum Radiatum

## 1.1 Introducción General

El estudio del sistema nervioso central, específicamente del cerebro, ha acercado a la humanidad al entendimiento de la naturaleza de los seres vivos y de sí misma como pocos otros sistemas orgánicos. Fenómenos como el aprendizaje, la memoria, la generación del lenguaje y el fenómeno general conocido como conciencia, son actualmente concebidas como funciones propias de este sistema orgánico.

Sin embargo, su inaccesibilidad, fragilidad y asombrosa complejidad han ocasionado que la generación de incluso los principios más básicos de su constitución y función hayan sido tareas monumentales que sólo recientemente han logrado ser llevadas a cabo.

Entre las observaciones que han perdurado al escrutinio del tiempo se encuentra el papel central de la formación hipocampal, una estructura altamente conservada entre los mamíferos, en la generación de procesos mnemónicos, orientación espacial y aprendizaje. Sus características anatómicas y fisiológicas han consolidado al hipocampo como un sistema modelo para la exploración de una gran gama de tópicos; desde descripciones anatómicas y fundamentos de neurotransmisión, hasta complejas tareas cognitivas. La conectividad celular hipocampal revela una alta especialización en términos de transmisión sináptica, generando compartimentos anatómicos distintivos no sólo por sus características morfológicas sino por sus propiedades fisiológicas.

A pesar de la gran atención que ha recibido y las innumerables exploraciones realizadas, como en prácticamente la totalidad del sistema nervioso central, prevalecen grandes incógnitas tanto sobre los aspectos más elementales de su función, así como sus implicaciones globales.

A lo largo de esta tesis el lector será llevado a través de una breve recapitulación de los conceptos fundamentales que constituyen el conocimiento colectivo sobre la organización y funcionamiento de los elementos celulares del sistema nervioso, con un enfoque dirigido al estudio de la transmisión sináptica como el mecanismo central de codificación y transmisión de información en el cerebro. Posteriormente se expondrán las características particulares del hipocampo y el objeto concreto de estudio de este trabajo: el complejo sináptico de la fibra musgosa con la célula piramidal de la región CA3 del hipocampo.

## Introducción

Con la sinapsis de la fibra musgosa como ejemplo central, el lector será llevado a través de una concreta pero comprensiva revisión del fenómeno conocido como plasticidad sináptica y los mecanismos involucrados en su generación y regulación.

Se exponen de manera general los principios teóricos que fundamentan la teoría prevalente de neurotransmisión y su aplicación para el estudio de procesos de plasticidad.

Finalmente, se describen meticulosamente la metodología y el análisis utilizado para abordar la pregunta central de esta tesis: ¿Cuáles son los mecanismos detrás de la facilitación por frecuencia en el complejo de la fibra musgosa? Los resultados obtenidos se discuten tanto en un contexto experimental, así como en conjunto con los reportes previos con los cuales integran una imagen más completa de la compleja regulación de la transmisión de información en una de las sinapsis centrales de la formación hipocampal.

### 1.2 La Doctrina Neuronal y el Origen de la Sinapsis

El esquema general estructural y funcional del sistema nervioso, según el cual éste se constituye de un gran número de células independientes, con morfología y propiedades características, capaces de generar actividad eléctrica en la forma de potenciales de acción y establecen comunicación entre sí mediante contactos altamente especializados denominados sinapsis, es la culminación del trabajo pionero de múltiples científicos a lo largo de los siglos XIX y XX.

Estas observaciones establecieron las piedras angulares de la disciplina que ahora denominamos neurociencias. Este campo de actividad científica, relativamente reciente, acapara ahora el imaginario colectivo y es el enfoque de enormes esfuerzos e inversiones en todo el mundo.

La noción fundamental de que el sistema nervioso, especialmente el cerebro, está conformado de millones de células independientes y con propiedades particulares, no fue siempre una noción claramente establecida. Durante el siglo XIX prevalecían visiones contradictorias de la organización celular del cerebro.

Dos propuestas principales, defendidas enérgicamente por los exponentes más sobresalientes de su época, ofrecían explicaciones encontradas sobre los datos

## Introducción

experimentales disponibles. La teoría reticular, propuesta y vigorosamente defendida por Camilo Golgi, concebía al sistema nervioso como un continuo, un elaborado tejido constituido de múltiples compartimentos comunicados directamente por prolongaciones protoplasmáticas. Por el contrario, Ramón y Cajal, van Waldeyer-Hartz y otros, interpretaban la información morfológica como evidencia de una estructura celular, un tejido altamente complejo compuesto por millones de células independientes de morfología especializada, llamadas neuronas, cuyas prolongaciones más finas culminaban en terminaciones que establecían la comunicación entre células sin perder su autonomía (Guillery 2005).

Líneas independientes de investigación apuntaban hacia una comunicación indirecta. El trabajo de pioneros en el estudio de la actividad del tejido nervioso había establecido evidencia que apoyaba la existencia de una brecha funcional entre una célula y otra. En su forma elemental, la doctrina neuronal de Ramón y Cajal proponía un principio sencillo, la aplicación de la teoría celular al sistema nervioso (Palay & Chan-Palay 2011). Sin embargo, las observaciones anatómicas a las que se tenían acceso mediante la técnica de tinción desarrollada por Golgi, si bien permitía la observación de la morfología general de las neuronas, era incapaz de establecer definitivamente la división entre ellas.

Paralelamente, central para la doctrina neuronal, era necesario establecer la forma de comunicación entre células. Las meticulosas descripciones de la morfología neuronal y la estructura general del sistema nervioso fueron reconciliadas con las observaciones funcionales de fisiólogos y farmacólogos de la época.

Otro gran debate prevalente entre los pioneros del estudio del sistema nervioso era la forma precisa en que se transmitía información entre las neuronas. De nuevo, dos escuelas de pensamiento presentaban explicaciones divergentes; una transmisión puramente eléctrica, la cual reconciliaba la noción reticular del sistema nervioso, y una transmisión indirecta, mediada por un intermediario químico, que era consistente con la doctrina neuronal. Las observaciones de John Langley, Otto Loewi y Henry Dale, entre otros, proveyeron de los primeros indicios de que la señalización entre neuronas era de una naturaleza química (Albright et al. 2000).

Influenciado por las observaciones de Ramón y Cajal principalmente, y las observaciones fisiológicas de su equipo de trabajo y otros, Sherrington propuso que las

terminaciones libres de las neuronas deben estar directamente relacionadas con la señalización entre neuronas, estableciendo contactos puntuales para la transferencia de información a los que denominó sinapsis (Guillery 2005; Albright et al. 2000; Palay & Chan-Palay 2011). La integración de la información anatómica y funcional, culminó en la generación de un marco conceptual en el cual, los contactos sinápticos constituyen la unidad de transferencia de información en el cerebro y el sistema nervioso en general. Dicha transferencia de información es llevada a cabo mediante intermediarios químicos.

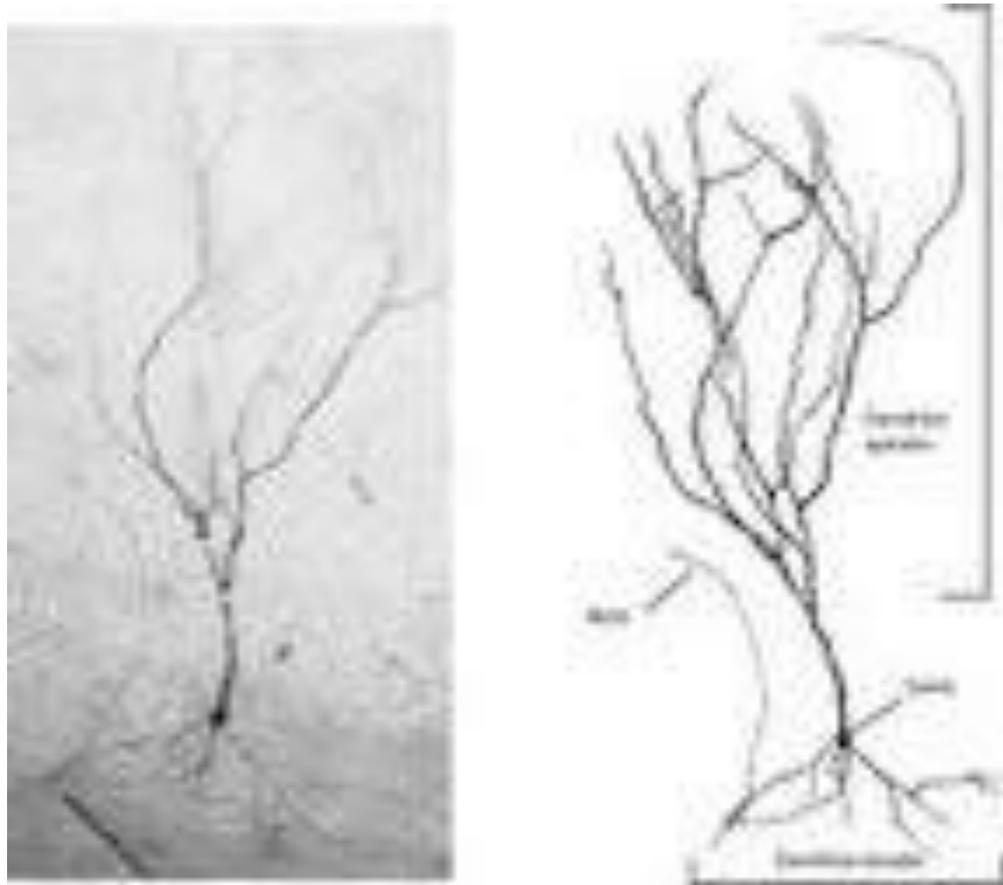
Es ahora aceptado que la principal forma de comunicación neuronal es la liberación de moléculas que median la generación de respuestas eléctricas en la célula blanco. Este proceso general es conocido como neurotransmisión química.

### 1.3 Morfología General de la Neurona y la Sinapsis

Actualmente se estima que el cerebro humano tiene un número de neuronas cercano a  $8.4^{10}$  que establecen cerca de  $10^{12}$  contactos sinápticos entre ellas y otras células efectoras, y un número similar de células gliales (Farfel et al. 2009).

La estructura de las neuronas muestra una amplia diversidad, tanto en proporciones como en morfología general. Sin embargo, varios motivos en común pueden ser identificados en la gran mayoría de ellas y la diversidad en proporciones y tamaño, así como la complejidad de su arborización y prolongaciones, fueron intuitivamente relacionadas con su función en el tejido nervioso.

De esta manera, la descripción idealizada de la neurona es la de una célula nucleada cuyo soma emite prolongaciones citoplasmáticas radialmente de diversa complejidad y longitud. Generalmente, sólo una de estas prolongaciones tendrá la estructura especializada para establecer contactos sinápticos con otras células y se le denomina axón. El resto de los procesos que emanan del soma constituyen la arborización dendrítica y su grado de ramificación, longitud y distribución está íntimamente relacionada con el número y origen de las neuronas de las cuales recibirá innervación pues es aquí donde la mayoría de los contactos sinápticos se establecen (Ilustración 1).



**Ilustración 1. Morfología general de la neurona. Reconstrucción de una célula piramidal de la región CA3b del hipocampo.**

La importancia de los procesos neuronales puede inferirse por la gran proporción del volumen y superficie neuronal dedicados a ellos. Si bien el soma puede parecer el elemento más sobresaliente de la célula, la longitud y compleja ramificación del axón y el árbol dendrítico tienden a contener más del 90% del volumen citoplasmático y la superficie membranal.

### 1.3.1 Soma

El cuerpo somático de la neurona es el centro de síntesis proteica y metabolismo de la célula. Es difícil establecer una medida promedio para el soma. En el sistema nervioso central de los vertebrados pueden encontrarse ejemplos numerosos de neuronas cuyos somas pueden tener en diámetro de 5 a 100 $\mu$ m.

De la altamente especializada morfología neuronal, el soma es tal vez la estructura que más se asemeja a otras células. Contiene todos los elementos comunes a

## Introducción

otras células nucleadas, incluyendo el núcleo, el cual ocupa la gran mayoría del volumen somático, la sustancia de Nissl, que constituye una variante especializada de retículo endoplásmico rugoso y cúmulos de ribosomas libres, el aparato de Golgi, y abundantes mitocondrias.

### 1.3.2 Dendritas

La mayoría de las neuronas presentan múltiples proyecciones dendríticas, éstas pueden distribuirse de manera ordenada surgiendo de dos o más troncos comunes acorde a la polarización celular, apical o basal, o bien, pueden surgir de un mayor número de procesos directamente del soma y distribuirse de manera radial.

Ciertos organelos celulares acompañan las porciones más proximales de las dendritas, como la sustancia de Nissl, el aparato de Golgi y mitocondrias. Sin embargo, estos rápidamente se vuelven escasos y sólo los microtúbulos, retículo endoplásmico liso y mitocondrias se proyectan más allá de las primeras divisiones.

A pesar de que las sinapsis pueden establecerse, y de hecho se establecen, en casi cualquier parte de la neurona, las dendritas presentan anexos especializados para este fin, conocidos como espinas dendríticas. La estructura interna de la espinas dendrítica es relativamente uniforme, carece de la mayoría de organelos, salvo por retículo endoplásmico liso y una compleja red de microtúbulos.

Dado que la densidad post-sináptica no es una estructura particular a la espina dendrítica, esta será discutida más adelante en el contexto del complejo sináptico.

Las propiedades pasivas (i.e. electrotónicas; inherentes a las propiedades capacitivas y resistivas de la membrana celular) y activas (i.e. conductancias iónicas adicionales activadas por voltaje, ligando o segundos mensajeros) del compartimiento dendrítico en general, y la espina dendrítica en particular, son fundamentales para el proceso de integración de los eventos de señalización distribuidos en esta amplia superficie y junto con la actividad intrínseca de la célula, dirigen su estado de excitabilidad (Rall 1969; Johnston et al. 1996; Magee 2000; Makara & Magee 2013) y serán discutidas con mayor detalle más adelante.

### 1.3.3 Axón

En términos generales, sólo un axón emerge del soma neuronal y éste tiene su origen en una región altamente poblada de canales de sodio sensibles a voltaje llamada cono axonal, el cual es considerado el sitio de generación del potencial de acción.

Múltiples divergencias de esta generalización pueden encontrarse en el sistema nervioso. Ciertas neuronas poseen múltiples procesos axonales y se ha documentado axones con origen en el tronco dendrítico. Así mismo, la generación del potencial de acción, el evento despolarizante, regenerativo y estereotípico neuronal, antes reservado para el cono axonal, ha sido documentada en ciertos procesos dendríticos con propiedades activas (Johnston et al. 1996; Magee & Johnston 1995).

Sin embargo, el axón es sin duda la estructura neuronal principal en la generación y propagación del disparo neuronal (i.e. secuencia de potenciales de acción), un fenómeno considerado ampliamente equivalente a un código digital (Prescott & Sejnowski 2008; Koch & Segev 2000).

El proceso axonal presenta múltiples ramificaciones, las cuales pueden señalar en las células de la inmediata vecindad de su neurona de origen o por el contrario, prolongarse distancias considerables hasta blancos celulares lejanos anatómicamente, dentro ó fuera del sistema nervioso central. Esta característica fundamentó una de las primeras clasificaciones de tipos neuronales realizadas por Golgi; el tipo I proyecta axones que señalizan distalmente y usualmente son mielinizados, el tipo II, por el contrario, se refiere a aquellas neuronas con procesos axonales que ramifican profusamente y señalizan localmente, son en general más finos y no mielinizados (Palay & Chan-Palay 2011).

De nuevo y en términos generales, el proceso axonal y sus ramificaciones terminan en estructuras especializadas denominadas botones sinápticos. Éstos pueden ser tantos botones únicos como ramilletes derivados de una sola proyección axonal, los cuales establecen contacto ya sea con una única célula blanco ó con múltiples blancos presentes en la región. El botón terminal, sin embargo, no es la única estructura capaz de establecer un contacto sináptico. A lo largo del axón es común observar abultamientos puntuales, llamados botones *en passant*; estas regiones contienen un complemento de maquinaria molecular similar al de los botones terminales y establecen un gran número sinapsis.

### 1.3.4 Sinapsis

El término genérico de sinapsis hace referencia a la región de contacto y transmisión de información entre neuronas. Es, sin embargo, un término que no refleja apropiadamente la complejidad y alta especialización de dicho contacto, ni las estructuras que la comprenden. El complejo sináptico involucra elementos de la neurona que emite el evento a transmitir (i.e. la neurona pre-sináptica), la célula que recibe y en la cual se genera una respuesta (i.e. neurona post-sináptica) y la estrecha brecha entre ellas.

Trátase de un botón terminal, *en passant*, ó alguna otra forma menos frecuente de terminal pre-sináptica, los elementos constitutivos necesarios para su función son comunes a todos ellos. Abundantes vesículas, generalmente de 20 a 40 nm en diámetro, segregadas en una reserva de vesículas distribuidas por el espesor de la terminal y una fracción, mucho menor numéricamente, distribuida en pequeños cúmulos adosados a regiones específicas de la densidad pre-sináptica denominadas zonas activas, estas vesículas constituyen la fracción lista para liberarse (*Readily Releasable Pool*). La zona activa es una región especializada de la densidad pre-sináptica constituida por una gran diversidad de proteínas que conforman un extenso entramado que regula minuciosamente el reclutamiento, anclaje, cebado y liberación del contenido vesicular (Harris & Weinberg 2012; Südhof 2013).

La información concerniente a la identidad y función específica de la diversidad de proteínas involucradas crece continuamente. Conjuntos de proteínas conocidos como t-SNARE, el cual incluye syntaxina y SNAP-25, y v-SNARE, incluyendo sinagtotagmina-1 y sinaptobrevina, comprenden gran parte de las proteínas involucradas en un proceso de interacción secuencial entre la membrana vesicular y la membrana plasmática de la zona activa (Südhof & Rizo 2011; Südhof 2013).

Un diverso complemento de canales iónicos, incluyendo canales de rápida activación de sodio, canales de potasio y calcio sensibles a voltaje presentes en la terminal pre-sináptica, permiten la generación local de potenciales de acción y corrientes transitorias de calcio, el proceso desencadenante de la exocitosis vesicular.

El aparente espacio entre la terminal pre-sináptica y la densidad post-sináptica, llamada hendidura sináptica, está lejos de ser verdadero espacio libre. La inspección por microscopia electrónica revela que en realidad el espacio de aproximadamente 20 nm esta densamente poblado por material electro-denso, lo que sugiere una alta

concentración de material protéico (Harris & Weinberg 2012). Recientemente, parte de este material ha sido identificado como proteínas de anclaje que mantienen una precisa alineación entre las zonas activas de la pre-sinapsis y los racimos de receptores de la post-sinapsis (Tang et al. 2016).

La densidad post-sináptica contiene múltiples receptores, de los cuales, una buena parte son canales iónicos activados por ligando. Estas moléculas sufren cambios conformacionales que permiten o limitan el paso de iones a través de ellas desde el espacio extracelular al interior de la célula. La velocidad de estos cambios y la duración de cada estadio es una característica particular para cada uno de estos receptores, pero son altamente influenciados por la interacción con el neurotransmisor específico liberado por la pre-sinapsis.

Adicionalmente se encuentran otros receptores acoplados a diversas vías de señalización y proteínas de andamiaje que activamente regulan el tamaño de la espina dendrítica, sus propiedades eléctricas y metabólicas, y mantienen una comunicación constante y transporte de moléculas desde y hasta el soma.

### 1.4 Fisiología de la Transmisión Sináptica

A pesar de la confirmación de la existencia de uniones comunicantes que permiten la continuidad eléctrica y citoplasmática entre neuronas, consistente con la teoría reticular, por mucho, tanto numérica como funcionalmente, la neurotransmisión química es el fenómeno prototípico de comunicación neuronal.

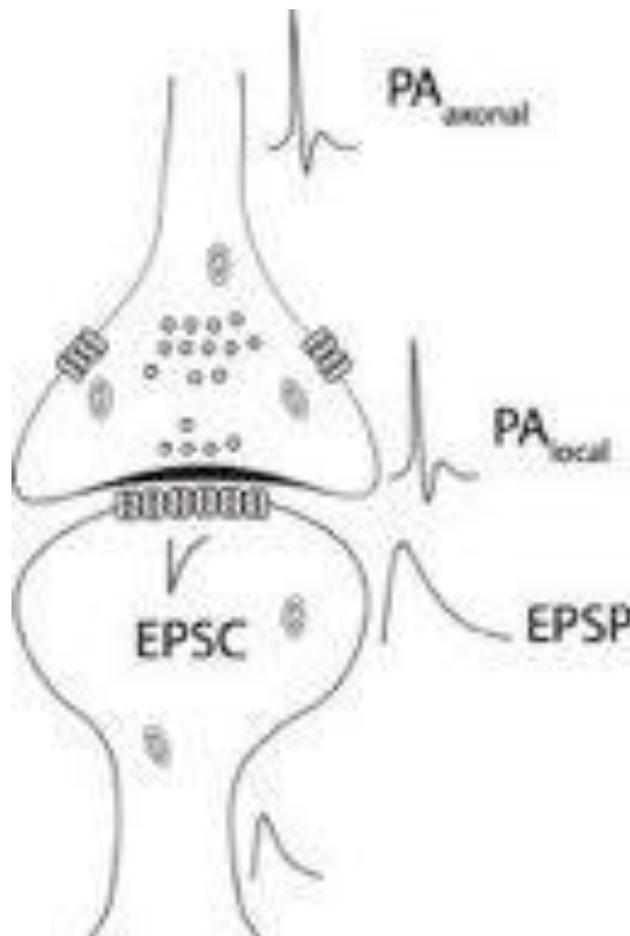
En la presente sección se expondrán los principios fisiológicos elementales de la transmisión sináptica; las observaciones experimentales pioneras que llevaron a la formulación de la teoría prevalente de la liberación de neurotransmisor, décadas antes de la verificación de la existencia de estructuras como vesículas o canales iónicos; el fenómeno de regulación de la eficacia en la transmisión, denominado plasticidad sináptica y sus implicaciones funcionales con un énfasis a la plasticidad a corto plazo; y los métodos novedosos de análisis desarrollados para el estudio de los mecanismos fisiológicos detrás de los fenómenos plásticos.

### 1.4.1 Principios Elementales de Neurotransmisión

El soma y el cono axonal son sitios donde la integración de la actividad sináptica y la excitabilidad intrínseca de la neurona determinan el patrón y frecuencia de disparo. El potencial de acción, el fenómeno idiosincrático del tejido excitable, producido por la súbita apertura de canales de sodio y una variedad de canales de potasio activados por voltaje en el cono axonal, es idealmente transmitido de manera regenerativa hasta la terminal axónica.

Este proceso no es infalible ni se encuentra exento de modificaciones producidas tanto por las estructuras y características propias de la neurona misma, como por la actividad de neuronas adyacentes. Los puntos de ramificación axonal son especialmente proclives a generar fallos en la conducción.

De producirse una efectiva conducción hasta la terminal pre-sináptica, la despolarización producida por el potencial de acción producirá la activación transitoria de múltiples tipos de canales permeables a calcio y sensibles a voltaje, principalmente los tipo P/Q y N, produciendo una corriente transitoria de calcio (Sjöström & Nelson 2002; Jackman & Regehr 2017).



**Ilustración 2 . Neurotransmisión química.**

Este flujo intra-terminal de calcio se encuentra altamente regulado y es el evento esencial desencadenante del proceso de fusión y liberación del neurotransmisor (Miledi & Katz 1968; Katz & Miledi 1965; Miledi & Katz 1967). La elevación de la concentración de calcio ( $Ca_{local}$ ) en la terminal muestra un efecto cooperativo sobre la movilización y fusión vesicular (Dodge & Rahamimoff 1967; Smith & Augustine 1988; Edwards 2007).

## Introducción

El contenido vesicular es liberado al espacio sináptico y difunde rápidamente hasta la membrana post-sináptica. El neurotransmisor entonces interactúa de manera específica con los receptores disponibles, muchos de ellos canales iónicos, los cuales, sufren modificaciones conformacionales que modifican su permeabilidad a iones específicos, produciendo una corriente generalmente entrante de moléculas cargadas eléctricamente. El evento final de esta transferencia de carga es la modificación transitoria del potencial de la membrana post-sináptica (Albright et al. 2000; Jackman & Regehr 2017).

El efecto del neurotransmisor liberado termina cuando este es degradado por mecanismos enzimáticos en el espacio extracelular, recapturado por la terminal pre-sináptica o un componente astrocítico, o difunde en el espacio extra-celular.

El reservorio vesicular es renovado mediante el reciclaje del elemento membranal vesicular que se ha fusionado con la membrana plasmática. Las vesículas recién formadas son posteriormente repletadas de neurotransmisor generalmente mediante un transporte acoplado a un gradiente de protones (Lin & Scheller 2000; Edwards 2007).

### 1.4.2 Propiedades Pasivas y Activas de las Dendritas

El potencial post-sináptico generado por la activación de canales iónicos es posteriormente conducido por el árbol dendrítico y sufre modificaciones determinadas principalmente por las propiedades electrotónicas de la célula.

El modelo prevalente de las propiedades eléctricas dendríticas, y neuronales en general, es el de un espacio multicompartimental con un componente capacitivo y uno resistivo en paralelo determinados por la membrana plasmática y un componente resistivo axial determinado principalmente por la composición citoplasmática y el diámetro del compartimento (Rall 1969; Rall 1977).

En un compartimento regular con las mismas propiedades, un evento despolarizante producido por la inyección de corriente, similar a la producida por la activación de canales iónicos, disminuirá de amplitud de manera exponencial conforme aumente la distancia desde su origen, así mismo la cinética del potencial cambia, enlenteciéndose.

## Introducción

En un cuerpo multicompartimental, las diferencias en diámetro de los procesos que constituyen los múltiples compartimentos añaden fuentes adicionales de resistencia a la propagación de un potencial. Esto aplica para toda ramificación dendrítica, pero es especialmente evidente en las espinas dendríticas. La morfología común de una espina dendrítica es comparada frecuentemente con un hongo, con un proceso abultado que constituye la terminal post-sináptica conectado mediante un conducto mucho más estrecho a la rama dendrítica. La estrechez de este proceso es un punto de alta resistencia que se opone al flujo de la corriente producida en la densidad post-sináptica e induce atenuación significativa del potencial sináptico (Spruston et al. 1994).

A este modelo general de la conducción en dendritas se deben agregar observaciones más recientes que documentan la existencia de canales iónicos de sodio y calcio activados por voltaje en las dendritas de neuronas de múltiples regiones del sistema nervioso central (Magee & Johnston 1995; Johnston et al. 1996; Schwandt et al. 1997; Kampa et al. 2007).

### 1.4.3 Plasticidad y Propiedades Computacionales de la Transmisión Sináptica

#### 1.4.3.1 Plasticidad Sináptica

Al fenómeno general de modificación fisiológica en la eficacia de la transmisión sináptica se le denomina plasticidad. Las propiedades plásticas de las sinapsis fueron reconocidas desde las primeras exploraciones experimentales como aumento o disminución de la respuesta evocada en diversas preparaciones. Los cambios observados en la eficacia de la transmisión, además de ser características particulares de la sinapsis estudiada, están en función del patrón de la actividad y las condiciones experimentales, especialmente la concentración relativa de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  (Katz & Miledi 1965; Katz & Miledi 1966b; Miledi & Katz 1968; Stevens & Wang 1995).

Los mecanismos celulares detrás de las propiedades plásticas y sus implicaciones funcionales han sido por décadas objeto de intenso estudio. El cambio relativo en la eficacia de la transmisión y la temporalidad del fenómeno han sido la base para la clasificación general de estas modificaciones en plasticidad a corto plazo y plasticidad a largo plazo.

## Introducción

### Plasticidad Sináptica a Corto Plazo

La plasticidad sináptica a corto plazo se refiere a cambios en la transmisión en una escala temporal de milisegundos a pocos minutos y es generalmente estudiada mediante el uso de protocolos de estimulación como el pulso pareado ó trenes de estímulos a determinadas frecuencias. Las tres formas más comunes de plasticidad a corto plazo son: facilitación, depresión y potenciación.

*Depresión.* La depresión de la transmisión sináptica implica la disminución en amplitud de los eventos evocados subsecuente a la activación repetitiva. Si consideramos que la liberación de neurotransmisor depende de la existencia de vesículas ancladas y listas para ser liberadas en la zona activa, la depresión de la respuesta ante la liberación repetida es un proceso intuitivo en tanto que la disponibilidad de estas vesículas disminuye. La tasa de depresión y recuperación de la transmisión están por lo tanto íntimamente ligadas a la fracción de vesículas listas para ser liberadas y su recuperación tras la depleción (Stevens & Wang 1995; Debanne et al. 1996; Waldeck et al. 2000; Schneggenburger et al. 2002; Chen et al. 2004).

*Facilitación.* La facilitación sináptica es en muchos sentidos el proceso inverso a la depresión. No sólo resiste la tendencia a la depresión con la sostenida liberación de vesículas de neurotransmisor, sino además produce un aumento de la respuesta post-sináptica ante la estimulación repetitiva.

La facilitación es el fenómeno central del presente proyecto, particularmente una forma especial de facilitación dependiente de la frecuencia específica de estimulación. Por lo tanto, los mecanismos e implicaciones funcionales de la plasticidad a corto plazo se enfocarán en esta forma de plasticidad.

*Potenciación a Corto Plazo.* La potenciación a corto plazo involucra dos fenómenos descritos muy semejantes que en múltiples preparaciones son indistinguibles y en general comparten características generales; la *potenciación post-tetánica* y la *aumentación* (Zucker & Regehr 2002; Fioravante & Regehr 2011; Jackman & Regehr 2017). Ambas son formas de facilitación, caracterizadas por un sostenido aumento de la respuesta evocada con una duración de pocos minutos inducido por un intenso periodo de activación sináptica.

### Plasticidad Sináptica a Largo Plazo

## Introducción

El aumento de la eficacia de la transmisión sináptica capaz de perdurar horas, días o semanas es conocido como potenciación a largo plazo, y representa uno de los fenómenos más estudiados en neurofisiología. Junto con su contra-parte, la depresión a largo plazo, son ampliamente considerados mecanismos neurobiológicos de aprendizaje y memoria (Bliss & Lomo 1973; Albright et al. 2000; Lomo 2003; Whitlock et al. 2006; Neves et al. 2008; Mayford et al. 2012; Luscher & Malenka 2012; Nicoll 2017).

Tanto la potenciación como la depresión a largo plazo pueden ser inducidas mediante diversos patrones de activación pre-sináptica. Sin embargo, los mecanismos subyacentes a estos procesos plásticos han sido documentados tanto pre- como post-sinápticamente (Kobayashi et al. 1996; Toth et al. 2000; Luscher & Malenka 2012). Así mismo, mediadores químicos son capaces de inducir directamente estos fenómenos al activar vías transduccionales relacionadas con la síntesis o reclutamiento de receptores, o la regulación de la liberación de neurotransmisores y neuromoduladores (Huang & Kandel 1996; Contractor et al. 2001; Rodríguez-Moreno & Sihra 2004; Kerchner & Nicoll 2008).

### 1.4.3.2 Mecanismos Celulares de Facilitación

A pesar de ser un fenómeno ubicuo tanto en el sistema nervioso central como en el periférico y ser un regulador esencial de la transmisión de información entre neuronas, la plasticidad sináptica a corto plazo ha escapado en gran parte al escrutinio experimental y el entendimiento general de este fenómeno por mucho tiempo se fundamentó principalmente en construcciones teóricas. Sin embargo, investigaciones relativamente recientes han arrojado luz sobre la dinámica de estos procesos y los mecanismos celulares subyacentes. A continuación se presentan los principales hallazgos en el estudio de la facilitación.

La teoría del calcio residual prevaleció durante décadas como una explicación apropiada para la facilitación, el principal argumento sostiene que la presencia de calcio “activo” remanente en la terminal pre-sináptica después de un evento despolarizante aportaba un aumento significativo a la señalización de calcio, y por lo tanto liberación de neurotransmisor, del evento subsecuente (Miledi & Katz 1968). Mediciones más recientes de este calcio residual han determinado que la concentración de calcio en la terminal pre-sináptica después de un evento es estrictamente regulada por mecanismos de recaptura, extrusión o unión y su aportación a la concentración alcanzada por un

## Introducción

evento subsecuente es mínima e incapaz de explicar un aumento significativo en la liberación de neurotransmisor (Zucker & Regehr 2002; Jackman & Regehr 2017).

La existencia de múltiples sensores de calcio en la terminal pre-sináptica ha sido propuesta para la explicación de diversos fenómenos, desde la liberación espontánea de vesículas (Geppert et al. 1994; Xu-Friedman & Regehr 1999; Bacaj et al. 2013) y regulación de las reservas vesiculares (Stevens & Sullivan 1998; Schneggenburger et al. 2002; Sara et al. 2005; Alabi & Tsien 2012), hasta la facilitación sináptica (Südhof 2012; Bacaj et al. 2013; Südhof & Rizo 2011; Südhof 2013).

*Facilitación de la fusión vesicular.* Existen, en efecto, diversas proteínas en la terminal con distintas afinidades al calcio, dinámicas de acción y un papel mayor o menor en la facilitación como sinaptotagmina 7 y munc-18 y 13 (Südhof 2012; Jackman & Regehr 2017). El modo propuesto mediante el cual estos sensores adicionales podrían facilitar la liberación de neurotransmisor es actuando de manera cooperativa con el principal sensor de calcio, la sinaptotagmina-1, favoreciendo la interacción molecular entre la membrana vesicular y la plasmática y disminuyendo el requerimiento energético de la fusión y exocitosis.

Un mecanismo adicional de estos sensores de calcio es la denominada *facilitación de calcio mediada por calcio*, en la cual estas moléculas activadas por calcio interactúan con los propios canales de calcio sensibles a voltaje modulando su conductancia. Esta modulación ha sido relacionada principalmente por canales de calcio tipo P, los cuales presentan un motivo estructural denominado IM en el extremo carboxilo que se ha propuesto podría interactuar con moléculas activadas por calcio, como calmodulina, y modificar la corriente de calcio (Jackman & Regehr 2017). Adicionalmente, el flujo de calcio puede modular otros canales iónicos responsables de la regulación del potencial de la terminal, lo que puede modificar de manera indirecta la corriente de calcio (Funabashi et al. 2010).

El tipo y densidad de canales iónicos en el botón pre-sináptico determina la amplitud, duración y dinámica de los potenciales de acción generados localmente. Ante la activación repetida la forma general del potencial puede ser modificada, específicamente una prolongación de su duración ha sido documentada en ciertas sinapsis como las terminales hipofisiarias (Jackson et al. 1991) y la fibra musgosa del hipocampo (Geiger & Jonas 2000).

## Introducción

Esta prolongación del potencial de acción produce un incremento de la corriente de calcio al aumentar el periodo de activación de los canales de calcio.

*Regulación activa de la probabilidad de liberación.* La facilitación es una característica de sinapsis con baja probabilidad de liberación. Múltiples mecanismos relacionados con este fenómeno tienen como objetivo mantener activamente estas condiciones bajas de liberación.

Una característica común de los canales de calcio de la terminal es su inhibición por una variedad de factores relacionados con su propia activación, diversas proteínas G y mediante señalización vía neuromoduladores. En el hipocampo, la señalización vía receptores purinérgicos inhibe la activación de canales de calcio sensibles a voltaje (Moore et al. 2003; Gundlfinger, Leibold, et al. 2007; Gundlfinger, Bischofberger, et al. 2007).

La elevación del calcio intra-terminal puede ser prevenida por una alta concentración de amortiguadores de calcio. En este modelo, la disponibilidad de estos amortiguadores mantiene una baja probabilidad inicial de liberación al secuestrar el calcio entrante. Una estimulación repetida satura el sistema de amortiguación permitiendo el alza de la concentración y el consecuente aumento de la liberación (Zucker & Regehr 2002; Fioravante & Regehr 2011; Jackman & Regehr 2017).

*Sinapsis Silentes.* Una idea intrigante propuesta como un mecanismo adicional de plasticidad tanto a largo como a corto plazo es la existencia de contactos sinápticos cuya eficacia es efectivamente nula, pero capaces de ser activadas y contribuir funcionalmente a procesos de facilitación y potenciación (Sastry & Bhagavatula 1996; Malenka & Nicoll 1997; Atwood & Wojtowicz 1999; Voronin & Cherubini 2004).

A este tipo de sinapsis se les denomina sinapsis silentes. Mecanismos tanto pre-sinápticos como post-sinápticos han sido descritos para este tipo de sinapsis y su potencial activación.

La sinapsis silente por excelencia es aquella cuya densidad post-sináptica contiene únicamente ó mayormente receptores tipo NMDA, estos receptores presentan un bloqueo por magnesio a potenciales de membrana cercanos al potencial en reposo de la mayoría de las células (Voronin & Cherubini 2004; Kerchner & Nicoll 2008). Este bloqueo impide la generación de una respuesta post-sináptica aún ante la apropiada liberación de neurotransmisor. Sin embargo, la inserción de canales iónicos que no presentan este tipo de bloqueo, como los AMPA, o la despolarización de la membrana

## Introducción

post-sináptica mediante otros mecanismos, liberan el bloqueo de estos canales, convirtiéndolas en sinapsis funcionales (Tong et al. 1996; Voronin et al. 2004). Este tipo de sinapsis silente es abundante durante el desarrollo y maduración del sistema nervioso central.

Pre-sinápticamente, un contacto sináptico puede permanecer silente si la zona activa no presenta vesículas ancladas y cebadas para su pronta liberación. Una rápida regulación del tamaño de la reserva de vesículas lista para ser liberada controlada por las concentraciones de calcio intracelular ha sido descrita para algunas sinapsis (Stevens & Sullivan 1998; Dobrunz 2002; Thanawala & Regehr 2013). Así mismo, ciertas zonas activas pueden localizarse relativamente lejos de los dominios de canales de calcio; en esta situación, el decaimiento rápido de la corriente de calcio, impide la activación de la fusión y exocitosis terminal (Smith & Augustine 1988). Un incremento de la corriente transitoria de calcio ó un enlentecimiento de su caída pueden ser suficientes para lograr la difusión de calcio hasta estos sitios y producir la liberación vesicular.

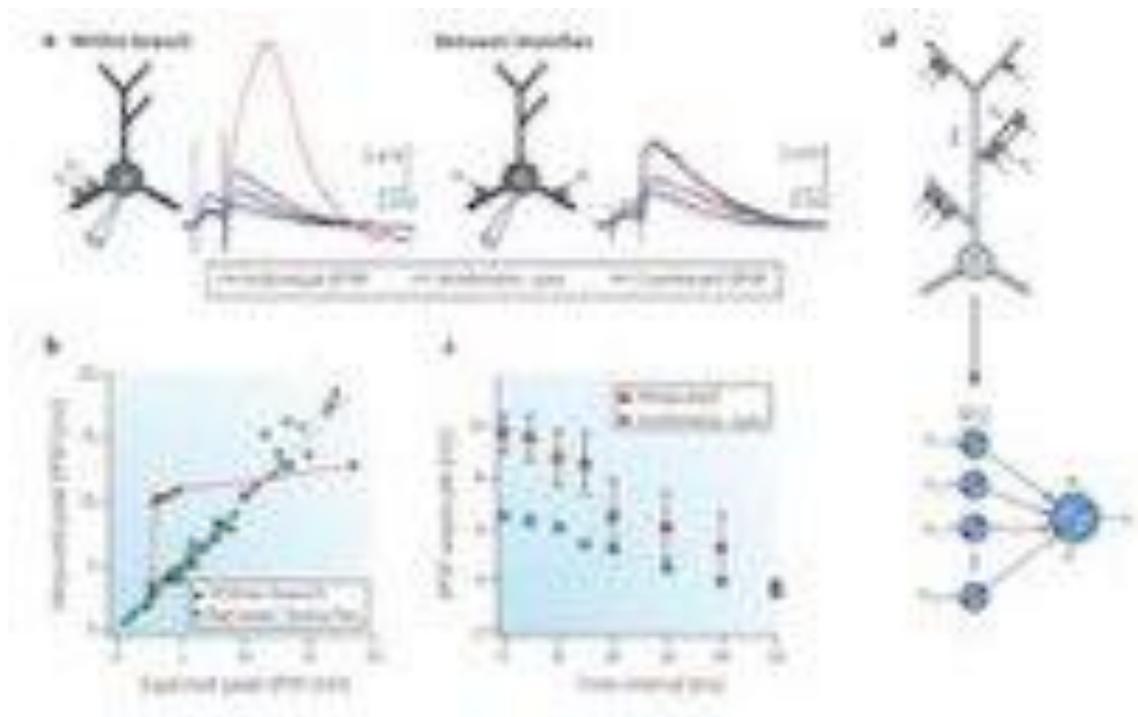
### 1.4.3.3 Cómputo Sináptico e Implicaciones Funcionales de la Plasticidad a Corto Plazo

El impacto de cada evento sináptico individual en la excitabilidad global de la neurona es el producto de la compleja interacción de todos los factores presentados hasta ahora; la magnitud original de la corriente post-sináptica, la distancia desde el soma, las modificaciones impuestas por las propiedades pasivas y activas dendríticas, y la posible sumación espacial y temporal con otros eventos sinápticos (Koch et al. 1996; Magee 2000; Spruston 2008; Silver 2010).

Una idea generalizada pero errónea, es considerar la transmisión sináptica como un relevo pasivo y lineal de la información entre neuronas. Por el contrario, la señal transmitida en un contacto sináptico del sistema nervioso central es constantemente variable y se encuentra fuertemente determinada por la historia previa de activación tanto en sus componentes pre- como post-sinápticos (Katz & Miledi 1966b; Abbott & Regehr 2004; Di Maio 2008).

Las propiedades plásticas a corto plazo de las sinapsis centrales les proveen de la capacidad de respuesta no lineal ante el patrón de estimulación enviado desde el soma; amplificación (facilitación) o atenuación (depresión). El comportamiento de un contacto sináptico es, por lo tanto, equivalente a un transductor que convierte una señal digital (i.e. disparo neuronal) en una señal analógica (i.e. potencial electrotónico)

transformada y modulada con precisión (Koch et al. 1996; Koch 1997; Koch & Segev 2000; Di Maio 2008; Abbott & Nelson 2000; Abbott & Regehr 2004).



**Ilustración 3. Aspectos computacionales de las sinapsis y dendritas. Tomado de Silver 2010.**

Estas mismas propiedades se extienden a las ramas dendríticas, donde además se genera la integración de la señalización originada en múltiples contactos sinápticos (Zador 2000; Silver 2010) Ilustración 3.

### 1.4.4 Teoría Cuántica de la Liberación del Neurotransmisor

#### 1.4.4.1 Observaciones Experimentales Fundamentales del Modelo Cuántico

El modelo cuántico de la liberación del neurotransmisor fue originalmente propuesto para la descripción del proceso de neurotransmisión química en la placa neuromuscular de la rana, donde la respuesta contráctil del músculo es evocada por la activación de receptores ionotrópicos tras la liberación de acetilcolina (Katz & Miledi 1965).

Una observación elemental fue la aparición de pequeños potenciales espontáneos en la membrana post-unional, sin requerir la estimulación de la fibra nerviosa. La amplitud de estos eventos era más bien uniforme y no era posible registrar eventos despolarizantes de menor magnitud, espontáneos o evocados, por lo que se

## Introducción

concluyó que éste debería ser el potencial electrotónico mínimo; el potencial miniatura o unitario. Posteriormente, se observó que la amplitud de los potenciales evocados correspondían cercanamente a múltiplos integrales de la amplitud del potencial miniatura (Del Castillo & Katz 1954; Martin 1966). De alguna forma el potencial sináptico incrementaba en magnitudes determinadas y uniformes.

La liberación de una sola molécula de acetilcolina es claramente incapaz de generar potencial alguno. Investigaciones posteriores demostraron que el número de moléculas necesarias para producir el potencial unitario se encontraban entre  $10^3$ - $10^4$ , lo que indicaba que la liberación de la neurotransmisión era llevada a cabo mediante exocitosis de paquetes con un contenido relativamente uniforme. Estas observaciones fueron posteriormente replicadas en múltiples preparaciones, desde la unión neuromuscular en invertebrados hasta el sistema nervioso central de mamíferos, décadas antes de la documentación morfológica de la existencia de vesículas en la terminal pre-sináptica.

### 1.4.4.2 Formalización del Modelo Cuántico de Liberación y Transmisión Sináptica

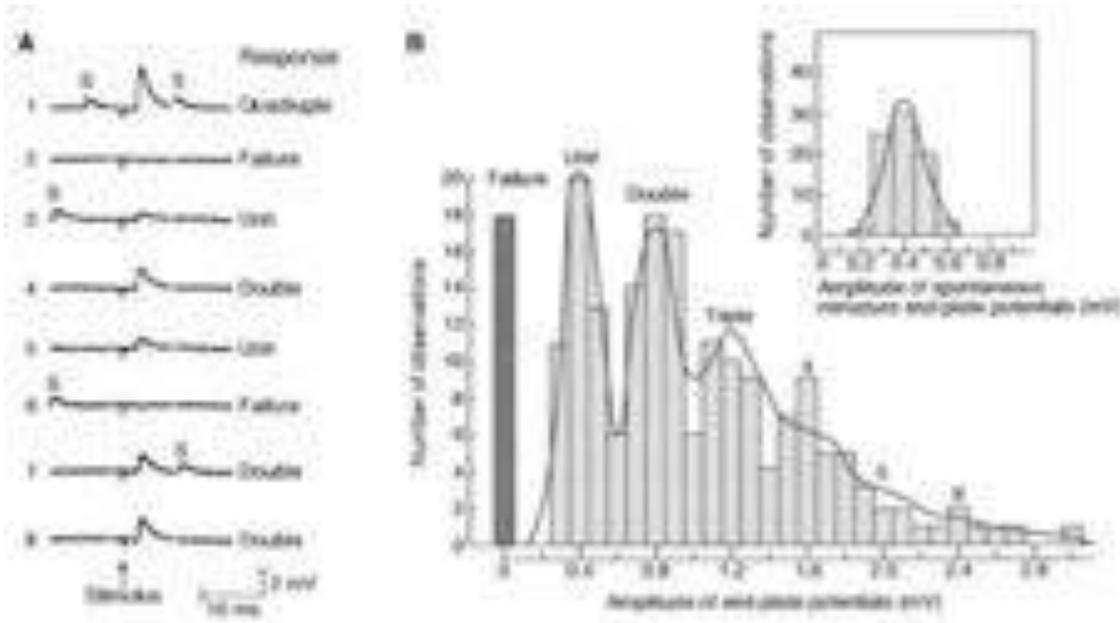
Las exploraciones que llevaron a la concepción de paquetes de neurotransmisor también proveyeron cierto entendimiento sobre los modelos matemáticos que podrían describir tal proceso.

El abordaje experimental crucial fue la modulación del proceso de liberación mediante la manipulación de las concentraciones extracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  (Del Castillo & Katz 1954; Katz & Miledi 1965; Miledi & Katz 1967). Al aproximarse a condiciones en las cuales la amplitud del potencial evocado era similar a la amplitud del potencial unitario, ninguna disminución subsecuente era producida. En cambio, un número creciente de fallos en la evocación del evento sináptico era registrado.

En estas condiciones, el evento sináptico se presenta de una manera de todo ó nada, equiparable a un experimento de Bernoulli. Por lo tanto, una aproximación al modelo binomial fue probado para la descripción de las observaciones obtenidas y organizadas en histogramas de frecuencias de amplitudes de miles de eventos sinápticos evocados; considerando  $N$  como el número de posibles sitios de liberación y  $P$  la probabilidad de éxito individual de cada uno de ellos. Sin embargo, no se contaba con estimaciones experimentales para estos parámetros.

## Introducción

Dado que en condiciones iónicas normales, la estimulación de la fibra nerviosa evoca una respuesta post-sináptica fielmente, una suposición subsecuente fue que al disminuir la liberación de neurotransmisor, éste se encontraría en exceso con respecto a la probabilidad de éxito en la transmisión. En términos generales, de cumplirse esta suposición:  $N \gg P$  y el modelo binomial podría ser reducido a una distribución de Poisson donde  $M = NP$  sería el único parámetro a estimar (del Castillo & Katz 1954; Martin 1966; Korn & Faber 1991; Bekkers 1994).



**Ilustración 4. Observaciones elementales que llevaron al desarrollo de la teoría cuántica de la neurotransmisión. Tomada de Albright et al. 2000.**

Las implicaciones de tal aproximación ponían de manifiesto un marco teórico que apoyaba la naturaleza cuántica de la neurotransmisión.

Los fenómenos que pueden describirse con una distribución de Poisson cumplen ciertas características: los eventos sólo pueden ocurrir de manera íntegra ó fallar por completo, no presentan fracciones ó respuestas graduales, todo evento es independiente de los demás, la tasa de presentación de eventos es constante si las condiciones permanecen constantes, sólo un evento puede ocurrir en determinado punto en el tiempo y espacio, entre otras.

## Introducción

La ventaja crucial del modelo de Poisson es que reduce los parámetros  $N$  y  $P$  a uno solo  $M$ . Lo cual permitió una verificación directa de las estimaciones matemáticas; siendo  $M$  el producto de  $N$ , el número de vesículas disponibles, y  $P$ , la probabilidad de una liberación exitosa;  $M$  refleja el número promedio de paquetes que componen cada evento de transmisión exitoso.

Si un evento miniatura corresponde a la respuesta unitaria,  $Q$ , de la que se compondrán los eventos de mayor amplitud, todo evento sináptico puede ser descrito formalmente como el producto de esta magnitud mínima, el número de paquetes disponibles y la probabilidad individual de éxito:

$$I = Q * N * P$$

### 1.4.4.3 Análisis Cuántico en Sinapsis Centrales

A pesar de que las sinapsis centrales presentan las mismas características principales tanto morfológica como fisiológicamente, la aplicación de estos modelos y aproximaciones experimentales se ha visto limitada por múltiples obstáculos técnicos y analíticos.

Como se mencionó, los estudios pioneros en neurotransmisión se realizaron a preparaciones de sinapsis periféricas, específicamente la placa neuromuscular. Dichas estructuras presentan ciertas características favorables para el estudio de los eventos sinápticos elementales que frecuentemente están ausentes en las sinapsis centrales.

- Amplia relación señal/ruido, mientras que en la placa neuromuscular el potencial post-sináptico es producido por miles de canales iónicos, en la sinapsis centrales este número puede reducirse a sólo unas decenas, comprometiendo su detección (Faber & Korn 1991; Jonas et al. 1993; Bekkers 1994).
- Uniformidad y accesibilidad de la sinapsis, estructuras similares a la placa neuromuscular presentan dimensiones y organización que permiten su estimulación y registro de manera muy selectiva y directa. En cambio en sinapsis centrales, los contactos sinápticos son comúnmente inaccesibles instrumentalmente, el caso más común es tener que confiar en el registro de eventos sinápticos desde el soma. Dada la amplia variabilidad en la localización de los contactos

## Introducción

sinápticos en la compleja arborización dendrítica de las neuronas centrales, el registro de estos eventos desde el soma se ve comprometido por modificaciones artefactuales derivadas de las propiedades pasivas y activas de las dendritas discutidas previamente (Korn & Faber 1991; Bekkers 1994; Spruston et al. 1994; Makara & Magee 2013).

- Selectividad y certeza de la aferencia estimulada. En el sistema nervioso periférico la distribución de las proyecciones axonales que inervan el blanco de interés es relativamente identificable y susceptible de disección y aislamiento. En el sistema nervioso central, el laberíntico trayecto y pequeñas dimensiones de la mayoría de los procesos axonales no mielinizados puede hacer imposible su identificación y aislamiento en una preparación *ex vivo* que conserve apropiadamente la conectividad. Aunado a esto, aun cuando logre preservarse la inervación, generalmente es inevitable que se encuentre inmersa en una compleja red de miles de proyecciones de diversos orígenes (von Kitzing et al. 1994; Henze et al. 2000).

### 1.4.5 Métodos Tradicionales de Análisis Cuántico y Metodologías Emergentes

#### 1.4.5.1 Limitaciones de los métodos tradicionales

Durante décadas la identificación de picos equidistantes, “cuánticos”, en el histograma de amplitudes y la subsecuente aplicación de modelos estadísticos capaces de describir una distribución subyacente prevaleció como el método estándar para realizar un análisis cuántico (Del Castillo & Katz 1954; Jonas et al. 1993; von Kitzing et al. 1994).

Sin embargo, las características propias de esta aproximación la hacen susceptible a múltiples artefactos y perturbaciones que pueden obstaculizar su aplicación.

La elaboración de un histograma con picos identificables requiere frecuentemente la recolección de miles de eventos sinápticos, una tarea no sólo ardua sino que requiere largos periodos de registro estable, que pueden resultar inapropiados para preparaciones frágiles, ó en su defecto una alta frecuencia de estimulación, capaz de inducir fenómenos fisiológicos que modifiquen las características basales de la

## Introducción

sinapsis (Faber & Korn 1991; Jonas et al. 1993; Bekkers 1994; Isaacson & Walmsley 1995; Lawrence et al. 2004). Así mismo, la cantidad de datos y el tiempo requerido para su obtención hacen que difícilmente pueda aplicarse este método para la comparación de directa en un mismo experimento de distintas condiciones como procesos plásticos ó manipulaciones farmacológicas.

Más recientemente, la validez misma de la identificación de picos equidistantes ha sido cuestionada y se ha sugerido que es sensible a artefactos estadísticos, incluyendo el tamaño de la muestra (Walmsley 1995).

### 1.4.5.2 Análisis Cuánticos Parciales

El modelo cuántico de la neurotransmisión, más allá de representar una de las descripciones fisiológicas más intuitivas y avanzadas para su época, provee un marco conceptual ampliamente aceptado por su utilidad en la interpretación de una amplia variedad de fenómenos encontrados en el estudio de la transmisión sináptica.

Las limitaciones mencionadas del método convencional de análisis cuántico pronto llevaron al desarrollo de aproximaciones alternas que permiten la indagación indirecta de algunos aspectos de las propiedades cuánticas. Un motivo común entre estos métodos es la atención puesta a las modificaciones de la amplitud promedio y la magnitud de la variación de las respuestas sinápticas.

La estimulación por pulso pareado es una de las herramientas más antiguas en electrofisiología, consiste en la administración de dos estímulos con un intervalo determinado entre ellos. Es ampliamente aceptado como un método de manipulación de la probabilidad de liberación, produciendo facilitación en ciertas sinapsis y depresión en otras, manifestadas como el aumento o disminución, respectivamente, de la amplitud del segundo evento con respecto al primero. Una modificación del cociente de estas amplitudes es generalmente interpretado como un cambio en contenido cuántico producido por un mecanismo pre-sináptico, más comúnmente un modificación en la probabilidad de liberación. (Del Castillo & Katz 1954; Miledi & Katz 1968; Hess et al. 1987; Walmsley 1995; Salin et al. 1996; Debanne et al. 1996; Huang & Kandel 1996; Oleskevich et al. 2000; Waldeck et al. 2000).

Derivado directamente del modelo binomial, el análisis del coeficiente de variación,  $C.V.^2$ , de las amplitudes de los eventos evocados constituye otro método

## Introducción

parcial de análisis cuántico. Definido de la siguiente manera, partiendo de la definición de media ( $\mu$ ) y varianza ( $\sigma^2$ ) para la distribución binomial:

$$\mu = qnp$$

$$\sigma^2 = q^2np * (1 - p)$$

$$C.V. = \frac{\sqrt{q^2np * (1 - p)}}{qnp}$$

$$C.V.^{-2} = \frac{np}{(1 - p)}$$

El análisis del coeficiente de variación brinda información sobre un parámetro únicamente determinado por factores pre-sinápticos (Clements 1990; Kerchner & Nicoll 2008). Sin embargo, los resultados arrojados con este método pueden ser difíciles de interpretar y su validez ha sido cuestionada para sinapsis complejas (Faber & Korn 1991).

Las modificaciones de la magnitud cuántica pueden en teoría deberse tanto a procesos pre-sinápticos como post-sinápticos dependiendo de las características específicas de la sinapsis. Una sinapsis, como el caso de la placa neuromuscular, en la cual la disponibilidad de receptores es amplia comparado con la liberación promedio de neurotransmisor, el tamaño cuántico puede ser regulado por el contenido vesicular de neurotransmisor (Burgoyne & Barclay 2002). Por el contrario, en sinapsis donde la saturación de los receptores sea fácilmente alcanzable, como es el caso en muchas sinapsis centrales, modificaciones del tamaño cuántico tenderán a manifestarse como cambios en el número de canales disponibles en la densidad post-sináptica o sus propiedades (Kerchner & Nicoll 2008).

Sin importar el origen del mecanismo involucrado, las modificaciones de la magnitud cuántica pueden ser estimadas mediante una medición directa de eventos unitarios, ya sea mediante el bloqueo de la generación de potenciales de acción (Del Castillo & Katz 1954; Isaacson & Walmsley 1995), disminuyendo al mínimo la probabilidad de liberación (Katz & Miledi 1966a; Bekkers & Stevens 1995) o mediante la inducción de liberación asincrónica al sustituir el  $Ca^{2+}$  de la solución extracelular por  $Sr^{2+}$  (Goda & Stevens 1994; Li et al. 1995; Bekkers & Clements 1999) o  $Cd^{2+}$  (Isaacson & Walmsley 1995).

### 1.4.5.3 Análisis de Fluctuaciones

En la búsqueda de métodos analíticos capaces de estimar todos los parámetros cuánticos y preferentemente estudiar sus modificaciones tras manipulaciones fisiológicas, farmacológicas, etc., nuevas aproximaciones se han alejado del problemático histograma de amplitudes y colocan la variabilidad de la respuesta sináptica al centro del proceso analítico.

Partiendo de métodos desarrollados para el estudio de las corrientes de canales únicos, dos novedosas propuestas han sido presentadas casi simultáneamente para la estimación de parámetros cuánticos a partir de la relación entre la amplitud media y la varianza de las repuestas evocadas.

Una observación clásica de la estimulación sináptica, es la fluctuación en la amplitud de la respuesta post-sináptica independientemente de la estabilidad de las condiciones experimentales. En el contexto del modelo cuántico, estas fluctuaciones son interpretadas como variaciones en el contenido cuántico y su magnitud está directamente determinada por la probabilidad de liberación. Esta magnitud de fluctuación, definida como la varianza de la respuesta sináptica ( $\sigma^2$ ) se encontrará al mínimo en condiciones extremas de probabilidad de liberación, tanto mínima probabilidad; donde un gran porcentaje de eventos fallarán en provocar una respuesta y aquellas respuestas exitosas tendrán un contenido cuántico muy cercano a 1 y por lo tanto una amplitud cercana a la magnitud unitaria, como máxima probabilidad; donde la liberación será eficaz y cercana a la máxima posible. Por otro lado, la varianza en la respuesta será máxima en el rango medio de probabilidad de liberación, donde las respuestas sinápticas podrán estar generadas por un rango amplio de contenido cuántico (Silver et al. 1998; Clements & Silver 2000; Clements 2003; Silver 2003).

Formalmente, la relación entre la amplitud media y la varianza del evento sináptico queda definida de la siguiente manera:

$$\bar{I} = QNP$$

$$\sigma^2 = Q^2NP(1 - P)$$

Sustituyendo y simplificando:

## Introducción

$$\sigma^2 = \bar{I}Q - \bar{I}^2/N$$

Por lo tanto, la relación de la amplitud media y la varianza de una respuesta sináptica puede ser descrita apropiadamente por una función parabólica.

$$y = A\bar{x} - B\bar{x}^2$$

Donde  $y$  sustituye a la varianza y  $\bar{x}$  a la amplitud media de la corriente post-sináptica obtenida en diversas condiciones iónicas. Los parámetros libres  $A$  y  $B$  son utilizados para la estimación del resto de los parámetros cuánticos de la siguiente manera:

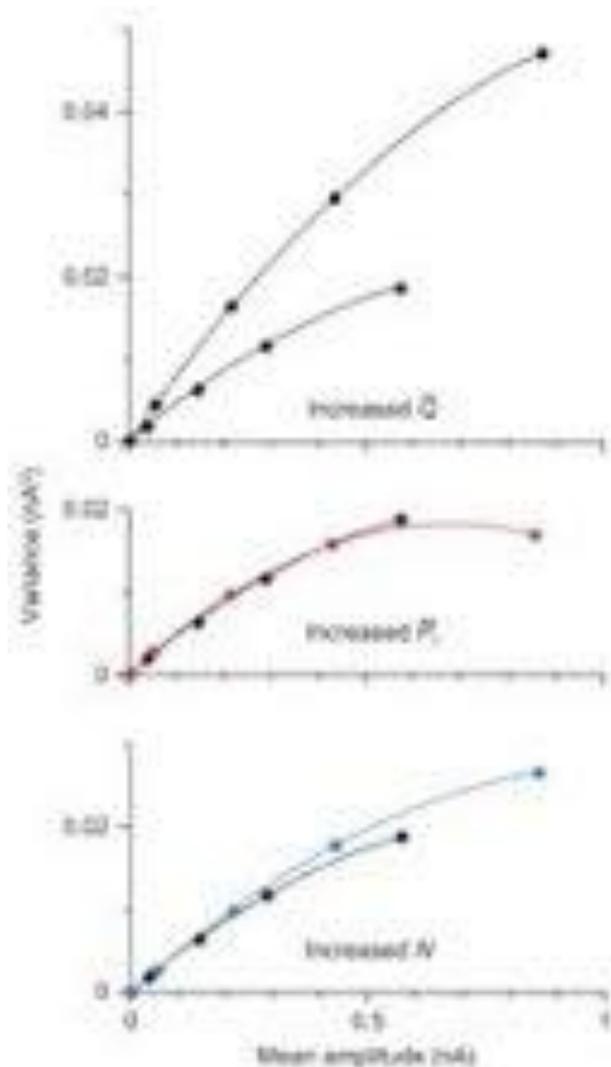
$$\bar{Q}_w = A/(1 + CV_1)$$

$$\bar{Pr}_w = \bar{x}(B/A)(1 + CV_1)$$

$$N_{min} = 1/B$$

El término  $CV_1$  es un factor de ajuste derivado de la variación intrínseca de la magnitud cuántica. En múltiples preparaciones se ha estimado alrededor de 0.2-0.3. Es también posible determinarlo experimentalmente si se conocen las fuentes principales de variabilidad.

Una ventaja adicional del análisis de varianza-media es la implementación gráfica del modelo. La curva construida por dicha representación gráfica presenta modificaciones identificables acordes a los cambios subyacentes en los parámetros individuales; una



**Ilustración 5. Análisis de varianza-media.**

## Introducción

modificación en  $Q$  inducirá un cambio en la pendiente de inicio de la curva, modificaciones en  $P$  únicamente producirán un desplazamiento de los puntos obtenidos sobre la misma parábola, cambios en  $N$  producen la construcción de una parábola con similar pendiente inicial pero distinta curvatura (Ilustración 5).

En términos generales, de presentarse cambios simultáneos en más de un parámetro, su impacto individual puede, aun así, ser identificado.

Este modelo inicial se apega a las propiedades del modelo binomial simple. Sin embargo, las sinapsis centrales muestran una amplia diversidad morfológica que está íntimamente ligada a procesos de plasticidad a corto y largo plazo. Este tipo de sinapsis puede presentar fuentes adicionales de variabilidad que modifiquen la relación entre la varianza y la media.

Partiendo del mismo principio, el método propuesto por Silver denominado análisis de fluctuación de múltiple probabilidad (MPFA) (Silver 2003) presenta un modelo al cual pueden subsecuentemente añadirse términos para representar fuentes adicionales de variabilidad.

$$y = \bar{Q} \bar{x} - \frac{\bar{x}^2}{N} (1 + CV_{Pr})$$

En su forma inicial, el método de Silver sólo contiene un parámetro más,  $CV_{Pr}$ , introducido para representar heterogeneidad en la probabilidad de liberación entre sitios activos. Este es un fenómeno documentado en ciertas sinapsis del sistema nervioso central (Rosenmund et al. 1993; Dobrunz & Stevens 1997). Sin embargo, no se cuenta con una descripción formal, ni las suficientes observaciones para generalizar un valor a este parámetro. El modelo asume que la familia beta de funciones continuas puede aproximar la dispersión producida por dicha heterogeneidad:

$$CV_{Pr} = \sqrt{\frac{1 - \bar{P}_r}{\bar{P}_r + \alpha}}$$

## Introducción

MPFA introduce factores adicionales que toman en cuenta múltiples fuentes de variabilidad en la magnitud cuántica que distorsionan de manera distinta la parábola general de la relación varianza-media.

$CV_I$ , variabilidad intra-sitio, surge de múltiples fuentes; asincronía en la liberación, variabilidad en el contenido vesicular de neurotransmisor, la naturaleza estocástica de la apertura de los canales iónicos y modificaciones transitorias de la respuesta del canal al neurotransmisor como saturación o desensibilización. Este tipo de variabilidad incrementa linealmente con la liberación de neurotransmisor, por lo tanto es máxima cuando la probabilidad de liberación se aproxima a 1.

$CV_{II}$ , la variabilidad inter-sitio, surge igualmente de múltiples fuentes; diversidad en la distancia electrotónica de los contactos sinápticos, heterogeneidad en la densidad y tipo de receptores en cada densidad post-sináptica, excentricidad de las zonas activas y diferencias en la geometría de la sinapsis.

La incorporación de estos términos adicionales convierte el modelo en un modelo multinomial de la forma:

$$y = \left[ \bar{Q}\bar{x} - \frac{\bar{x}^2}{N} \right] (1 + CV_{II}^2) + \bar{Q}\bar{x}CV_I^2$$

De nuevo, no existen generalizaciones que puedan aplicarse a estos parámetros y abordajes experimentales específicos deben aplicarse para su determinación independiente.

Diversas combinaciones de estos parámetros pueden construirse para la descripción de relaciones de media y varianza complejas.

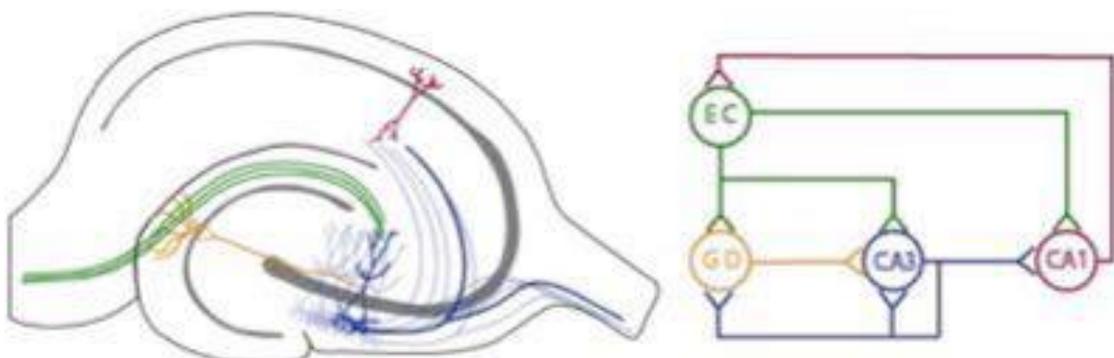
## 1.5 El Hipocampo y el Complejo Sináptico de la Fibra Musgosa

## Introducción

La formación hipocampal es una estructura altamente conservada en los mamíferos e incluye la corteza entorrinal, el giro dentado, el hipocampo propiamente (también llamado cornu ammonis y dividido en tres regiones CA1, CA2, CA3), el subículum y parasubiculum.

Los impedimentos cognitivos asociados a lesiones en esta estructura (Squire 2009), el descubrimiento de la potenciación a largo plazo (Bliss & Lomo 1973; Lomo 2003; Neves et al. 2008), la revelación de neuronas en el hipocampo que codifican específicamente para el reconocimiento de lugares (O'Keefe & Dostrovsky 1971; Eichenbaum et al. 1999), dirección, velocidad de movimiento, localización de pistas y metas y otros aspectos de la navegación espacial (Sarel et al. 2017) han consolidado el estudio sistemático del hipocampo como un núcleo esencial en tareas de aprendizaje, memoria y orientación espacial (McGaugh 2000; Burgess et al. 2002; Eichenbaum 2004; Whitlock et al. 2006).

El hipocampo presenta una citoarquitectura altamente organizada que ha permitido un profundo análisis de su conectividad y las propiedades individuales de los niveles sinápticos que lo integran. Visto a través de su eje transversal, el giro dentado, hipocampo y subiculum se componen por una única capa densamente celular, inmersa entre capas con escasa población neuronal. La organización celular es tal, que la conectividad básica del hipocampo pudo ser inferida a partir de estudios anatómicos relativamente primitivos expuesta en el modelo del circuito trisináptico, postulado por Ramón y Cajal, según el cual la información integrada en la corteza entorrinal es transmitida al giro dentado, posteriormente al área CA3 del hipocampo y subsecuentemente al área CA1.



**Ilustración 6. Anatomía y conectividad básicas del hipocampo.**

## Introducción

Estudios posteriores han integrado un circuito hipocampal mucho más complejo con múltiples vías alternas y sub-circuitos redundantes que establecen redes auto-asociativas y mecanismos de control inter-dependientes (Amaral & Witter 1989; Amaral 1993; Rebola et al. 2017).

La región CA3 del hipocampo presenta una conectividad intrínseca especialmente rica. Las neuronas piramidales de esta región establecen numerosos contactos sinápticos entre sí, distribuidos tanto en regiones apicales como basales de la arborización dendrítica, constituyendo la llamada red auto-asociativa de CA3. Además, reciben inervación en sus procesos dendríticos apicales distales por la vía perforante, los axones provenientes de la corteza entorrinal. Sin embargo, la sinapsis más distintiva tanto por sus propiedades sinápticas como por su rol principal en el funcionamiento del circuito hipocampal, es la establecida por las células granulares del giro dentado en las neuronas piramidales de CA3.

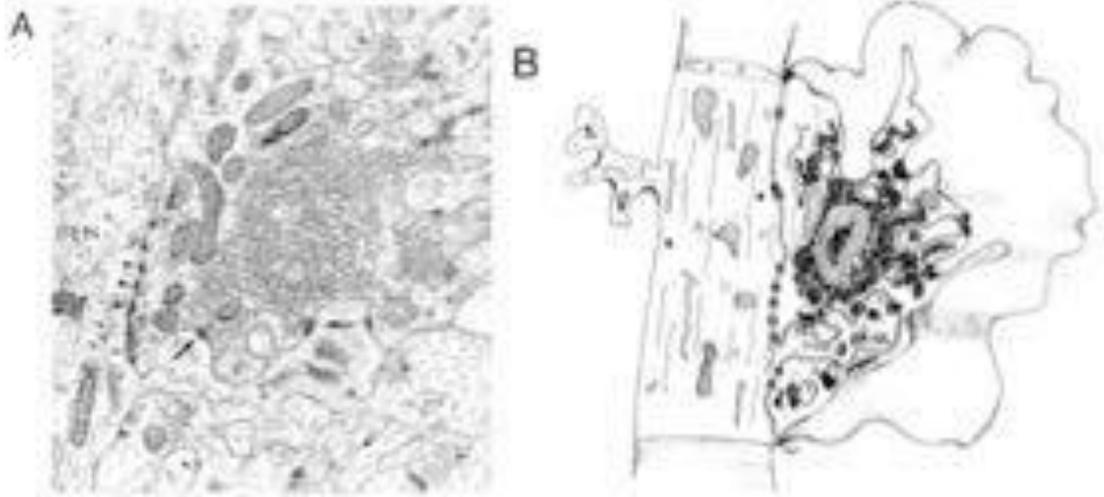
### El Complejo de la Fibra Musgosa

Las proyecciones axonales de las células granulares del giro dentado reciben el nombre distintivo de fibras musgosas por su conspicua apariencia a la inspección microscópica similar al musgo. Estas fibras son axones no mielinizados de alrededor de 1µm de diámetro, atraviesan el hilus, la región entre el giro dentado y el cornu ammonis, y se organizan en un paquete compacto de fibras que constituye el *stratum lucidum*.

A lo largo de su trayecto, la fibra musgosa establece contactos sinápticos con múltiples blancos celulares; numéricamente, las interneuronas del hilus y los distintos estratos de CA3 son su principal blanco (Acsády et al. 1998). Sin embargo, la sinapsis que establecen con las neuronas piramidales de CA3 es la más ampliamente estudiada debido a su complejidad morfológica y propiedades sinápticas que determinan su rol preponderante en la transformación de la información proveniente de la corteza entorrinal y su transmisión al circuito hipocampal (Rollenhagen & Lübke 2010; Evstratova & Tóth 2014).

La fibra musgosa presenta botones terminales particulares, denominados botones gigantes, de aproximadamente 5-10µm de diámetro que establecen contactos sinápticos con espinas dendríticas igualmente especializadas, llamadas eminencias espinosas, localizadas en el tronco principal de la dendrita apical de las neuronas

piramidales de CA3. A esta sinapsis constituye el complejo sináptico de la fibra musgosa. Cada botón gigante emite 3-5 proyecciones, denominadas extensiones filopodiales, que inervan principalmente interneuronas circundantes y recientemente se ha reportado que pueden contactar neuronas piramidales (Martin et al. 2017).



**Ilustración 7. Morfología del complejo sináptico de la fibra musgosa. Tomado de Henze *et al.*, 2000. A. Microfotografía electrónica donde se muestra la sinapsis de la fibra musgosa en la eminencia espinosa (S) de la neurona piramidal, denotando las zonas de unión, puncta adherentia, (cabezas de flecha) y algunos contactos sinápticos (flechas). B, Esquema representativo de A.**

Los botones de la fibra musgosa contienen un gran número de vesículas, alrededor de 25,000; de las cuales se estima que solamente 1,400 constituyen la reserva lista para ser liberada (Henze et al. 2000). Esta abundante población de vesículas es diversa en tamaño y contenido; la gran mayoría está constituida por vesículas de núcleo claro y contienen glutamato, ATP y zinc. Ciertos reportes indican la posibilidad de co-localización de glutamato y GABA en dichas vesículas (Beltrán et al. 2012), y median la neurotransmisión rápida excitatoria. La gran mayoría son vesículas pequeñas de 30-40 nm de diámetro pero existe un sub-población con diámetros de hasta 200nm y se correlacionan con los reportes de eventos miniatura gigantes en la fibra musgosa (Henze et al. 2002). Una subpoblación de vesículas de núcleo denso contienen una variedad de neuromoduladores y neuropéptidos incluyendo colecistocinina, encefalina, dinorfina y neuropéptido Y. Aunque la compleja morfología del botón gigante hace difícil la

## Introducción

obtención de sinapsis íntegras, estudios morfológicos reportan numerosas zonas activas, 18-45 en algunos reportes (Henze et al. 2000; Rollenhagen & Lübke 2010).

El botón gigante de la fibra musgosa expresa receptores glutamatérgicos, gabaérgicos y purinérgicos que median efectos moduladores importantes de su transmisión. Adicionalmente, una densidad alta de canales iónicos activados por voltaje, incluyendo canales de rápidos de sodio y diversidad de canales de potasio y calcio, aseguran la generación de potenciales de acción en la terminal y modulación de la corriente de calcio en periodos de actividad sostenida (Geiger & Jonas 2000; Evstratova & Tóth 2014).

Estas características se traducen en propiedades sinápticas altamente dinámicas para el procesamiento y transferencia de información.

### Transmisión Sináptica de la Fibra Musgosa

El complejo sináptico de la fibra musgosa establece contactos excitadores glutamatérgicos mediados principalmente por receptores tipo AMPA con un pequeño componente NMDA (Jonas et al. 1993). Posteriormente, una corriente mediada por receptores de kainato, fue identificada (Cossart et al. 2002).

Todos los contactos de la fibra musgosa se distribuyen uniformemente en las primeras 100µm de la dendrita proximal, por lo que el efecto de la atenuación electrotónica es relativamente uniforme. Así mismo, la cinética de los eventos sinápticos es rápida; tiempo al pico alrededor de 1 ms y constantes de decaimiento de 3-9 ms (Jonas et al. 1993; Salin et al. 1996).

Pocos trabajos han abordado la determinación de los parámetros cuánticos de esta sinapsis. La exploración, tal vez, más exhaustiva se realizó con una aproximación tradicional ajustando un modelo binomial a histogramas de amplitudes (Jonas et al. 1993). Trabajos subsecuente sobre estos datos determinaron una amplitud cuántica,  $Q$ , de 7-12pA, con un coeficiente de variación de 0.22, correspondiente a la activación de 16-65 receptores tipo AMPA/kainato, probabilidad de liberación,  $P$ , alrededor de 0.20-0.28 y 8-22 sitios de liberación,  $N$  (von Kitzing et al. 1994). El contenido cuántico,  $M$ , de un evento promedio de la fibra musgosa en condiciones iónicas normales fue de 2-16.

## Introducción

En un estudio más reciente se demostró la aplicación del modelo de varianza-media al estudio de la fibra musgosa. A pesar de ciertas limitaciones en este trabajo se estimaron los siguientes parámetros cuánticos:  $Q = 30\text{pA}$ ,  $P = 0.3$  y  $N = 11$  (Lawrence et al. 2004).

Dos aspectos comunes en los resultados de estos estudios son la notoriamente baja probabilidad de liberación, incluso en condiciones de alta concentración de calcio extracelular, y el modesto número de sitios de liberación comparado con los datos de estudios morfológicos.

La baja probabilidad de liberación en esta sinapsis parece estar mediada por una inhibición tónica de los canales de calcio pre-sinápticos mediante la activación de receptores A1 de adenosina (Gundlfinger, Bischofberger, et al. 2007). El bloqueo de esta señalización purinérgica, incrementa de manera importante la actividad tanto espontánea como evocada.

Más conspicuo resulta el número de sitios de liberación estimados que se encuentran en los rangos inferiores de los reportes anatómicos. Una posibilidad intrigante es que múltiples sitios de liberación se encuentren inactivos en condiciones basales y su reclutamiento pueda ser inducido por actividad sostenida, contribuyendo a las propiedades plásticas de esta sinapsis. Ciertos trabajos de potenciación a largo plazo indican un aumento en el número de sitios de liberación comparado con las condiciones previas a la potenciación, sugiriendo la existencia de sinapsis silentes en el complejo de la fibra musgosa (Reid 2004; Voronin et al. 2004).

### Plasticidad a Corto Plazo de la Fibra Musgosa

El complejo sináptico de la fibra musgosa presenta peculiares formas de plasticidad a corto plazo. Su baja probabilidad de liberación en condiciones basales es contrastada con su capacidad de evocar eficazmente potenciales de acción en la neuronas piramidales que contacta, lo que le ha llevado a ser considerada la sinapsis detonadora ó “maestra” de la región CA3 del hipocampo (Urban et al. 2001; Jaffe & Gutiérrez 2007). Este amplio rango de modulación se traduce en una amplia facilitación por pulso pareado, pronunciada facilitación por frecuencia en rangos acordes a la frecuencia de disparo de las neuronas granulares *in vivo* y potenciación post-tetánica de extensa duración; lo que en conjunto le brindan una robusta capacidad para la codificación rápida de memorias (Rebola et al. 2017).

## Introducción

La facilitación que experimenta la transmisión de la fibra musgosa ante cambios en la frecuencia de estimulación es de lo más interesante por su estrecha relación con los ritmos de actividad generada en el hipocampo y sus asociaciones con procesos cognitivos. El disparo tónico del giro dentado ( $<0.05\text{Hz}$ ) media una transmisión de baja fidelidad, con múltiples fallos y eventos sinápticos de baja amplitud; y el cambio a ritmos de baja frecuencia (1-4Hz) produce una facilitación progresiva hasta alcanzar varias veces la amplitud inicial. Finalmente, trenes de alta frecuencia registrados *in vivo* en el giro dentado se relacionan con periodos de potenciación de la fibra musgosa. Este comportamiento le confiere a la fibra musgosa propiedades similares a las de un amplificador de altas frecuencias.

La dinámica y amplitud de la facilitación por frecuencia sugieren un mecanismo mixto de facilitación. El efecto sobre el pulso pareado indica que una elevación de la probabilidad de liberación es insuficiente para explicarlo, pues una vez que ambos pulsos alcanzan una amplitud similar aún experimentan mayor facilitación. Diversos sistemas de neurotransmisión, incluyendo auto-receptores glutamatérgicos tipo kainato, purinérgicos y metabotrópicos glutamatérgicos se han relacionado con las propiedades plásticas de la fibra musgosa (Henze et al. 2000; Contractor et al. 2001; Moore et al. 2003).

Sin embargo, quedan por ser definidos en términos funcionales las modificaciones inducidas por el cambio en frecuencia de activación en el proceso global de transmisión en la fibra musgosa. El acercamiento aquí propuesto se basa en el estudio de la transmisión sináptica en el contexto de la teoría cuántica de neurotransmisión y tiene como objetivo determinar las modificaciones en los parámetros cuánticos de la transmisión sináptica en el complejo de la fibra musgosa en su estado basal y durante la facilitación por baja frecuencia.

## 1.6 Hipótesis

¿Cuáles son los cambios en los parámetros cuánticos de neurotransmisión detrás de la facilitación por frecuencia?

El complejo sináptico de la fibra musgosa presenta robustas propiedades regulatorias de su transmisión sináptica a corto plazo; facilitación por pulso pareado, facilitación por frecuencia y aumentación, que le confieren capacidades computacionales acordes a la codificación rápida de procesos mnemónicos y de aprendizaje.

Diversos sistemas de neurotransmisión se han relacionado con estas propiedades plásticas, incluyendo auto-receptores glutamatérgicos, inhibición tónica mediada por adenosina y retro-transmisión mediante canabinoides. Su compleja morfología indica la existencia de numerosas zonas activas distribuidas de manera irregular que establecen contacto con múltiples densidades post-sinápticas en la eminencia espinosa y, al menos en ciertas ocasiones, otras espinas dendríticas menor, y una abundante reserva de vesículas. Estudios recientes de potenciación a largo plazo indican la posibilidad de la existencia de sinapsis silentes en este complejo.

El presente proyecto tiene como objetivo la implementación de un análisis cuántico completo basado en el método de fluctuaciones para determinar los cambios en los parámetros cuánticos detrás de la facilitación por frecuencia de la fibra musgosa y la probable demostración de sinapsis silentes que son reclutadas transitoriamente durante este fenómeno.

## 1.7 Objetivos

### 1.7.1 Objetivo general

Implementar el análisis de varianza-media como método para la determinación de las modificaciones en los parámetros cuánticos de neurotransmisión detrás de la facilitación por frecuencia en el complejo de la fibra musgosa.

### 1.7.2 Objetivos Específicos

1. Estimar la magnitud cuántica mediante el análisis de eventos asincrónicos inducidos por estroncio como una medida independiente al análisis de varianza-media.
2. Implementar el análisis de varianza-media y desarrollar protocolos específicos que permitan la obtención de datos suficientes para la estimación de parámetros cuánticos en condiciones basales y al inducir facilitación por un cambio en la frecuencia de estimulación.
3. Determinar las modificaciones en los parámetros cuánticos de la neurotransmisión en la fibra musgosa en condiciones basales y durante la facilitación inducida por baja frecuencia de estimulación (1-4Hz).

## 2 METODOLOGÍA

Todos los experimentos se realizaron con apego a las guías éticas institucionales y a la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999. Tomando todas las medidas necesarias para impedir el sufrimiento animal.

Para la realización de este proyecto se utilizó la preparación *ex vivo* de rebanadas transversales hipocampales obtenidas de ratas Sprague-Dawley de 20-27 días de edad. Se realizaron registros electrofisiológicos de corrientes post-sinápticas mediante la técnica de *patch-clamp* en su modalidad de célula completa.

La preparación del tejido y los protocolos experimentales específicos se detallan a continuación.

### 2.1 Preparación *ex vivo* de rebanada de hipocampo

Para el preparación *ex vivo* de la rebanada transversal de hipocampo se anestesió a la rata con una dosis letal de pentobarbital sódico (aprox. 150mg/kg) vía intra-peritoneal. Se verifica el plano anestésico y se precede a decapitación con tijera de Mayo.

Rápidamente, tras la decapitación, se remueve el tejido blando de la región dorsal del cráneo, se realizan dos cortes laterales partiendo del foramen magno y un corte perpendicular a la línea media en la porción más rostral del cráneo en la región

## Metodología

que separa las órbitas. Se realiza un corte caudo-rostral partiendo del foramen magno y siguiendo la línea media hasta el corte previo en la región orbito frontal.

En este punto se procede a separar las hojas de la bóveda craneana del cerebro tirando de ellas con un movimiento hacia arriba y afuera. Debe tenerse cuidado de vigilar la separación de las meninges, o de lo contrario cortarlas, pues pueden tirarse junto con el cráneo y producir lesiones en el encéfalo.

Una vez expuesto el cerebro, se le remueve del piso y se le deja caer en una solución cefalorraquídea modificada a base de sacarosa (en mM: 210 sacarosa, 2.8 KCl, 2 MgSO<sub>4</sub>, 1.25 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 10 dextrosa, 1 MgCl<sub>2</sub>, 1 CaCl<sub>2</sub>, pH= 7.4) enfriada a punto de congelación y gaseada continuamente con carbógeno, donde permanecerá alrededor de 1 minuto.

Posteriormente, el cerebro se coloca sobre una superficie lisa y regular y se secciona gran parte de lóbulos frontales y el cerebelo, se realiza una incisión por la línea media y cada hemisferio es colocado sobre la cara medial. Se realiza un corte perpendicular con respecto a la superficie de corte y sobre el eje rostro-caudal del hemisferio para remover la porción más apical de la corteza. Para el registro de la fibra musgosa, la correcta ejecución de este corte es imprescindible para preservar la escasa conectividad entre el giro dentado y la región CA3 del hipocampo (Bischofberger et al. 2006).

Cada hemisferio cerebral es posteriormente colocado sobre su cara dorsal en la platina para tejido, fijado en su posición con cianoacrilato y sumergido de nuevo en la solución de sacarosa con burbujeo continuo. Se realizan cortes transversales de aproximadamente 385µm de espesor a una velocidad de avance de 3-6mm/min y frecuencia de oscilación de 100Hz utilizando un vibratomo (VT1000-S Leica Biosystems, Alemania).

Las rebanadas obtenidas se transfieren a la cámara de incubación que contiene aproximadamente 100ml de solución extracelular (en mM: 125 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 4 MgCl<sub>2</sub>, 10 glucosa, 0.4 ácido ascórbico, 1CaCl<sub>2</sub>, pH = 7.4) a 33-35°C durante 30min y posteriormente a temperatura ambiente durante 1 horas antes de ser registradas.

## 2.2 Registro de *patch-clamp* en modalidad de célula completa.

Para el registro electrofisiológico, se coloca la rebanada en una cámara de inmersión y se irriga constantemente a una velocidad de 2-3mm/min con una solución extracelular que contiene en mM: 125 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 4 MgCl<sub>2</sub>, 10 glucosa, 0.4 ácido ascórbico, 1 CaCl<sub>2</sub>, pH = 7.4, gaseada continuamente con carbógeno. Las pipetas fueron elaboradas a partir de capilares de borosilicato con diámetros: externo de 1.5mm e interno de 0.86mm (Sutter Instruments, California, EE.UU.), utilizando un estirador de micropipetas (Modelo: P-97, Sutter Instruments, California, EE.UU.), con una resistencia de 2-4MΩ.

Las células registradas fueron identificadas visualmente antes de proceder a su registro mediante videomicroscopia de contraste por interferencia diferencial (microscopio Eclipse FN1, Nikon, Tokio, Japón, cámara DAGE-MTI, Illinois, EE.UU.)

Todos los registros se realizaron utilizando un amplificador Axopatch 200b (Molecular Devices LLC, California, EE.UU.), filtrados a 10kHz y digitalizados a 20-40kHz (Digidata 1322A, Molecular Devices LLC, California, EE.UU.). Los registros fueron analizados utilizando pClamp (v10), Stimfit (v0.14.13) (Guzman et al. 2014) y rutinas programadas en Python (v3.6.2).

Los fármacos picrotoxina, APV (ácido DL-2-amino-5-fosfonopentanoico), biocitina y todas las sales de las soluciones fueron adquiridas de Sigma-Aldrich (Misuri, EE.UU.) DCG\_IV ((2*S*,2'*R*,3'*R*)-2-(2',3'-Dicarboxycyclopropyl)glycine) fue adquirido de Tocris (Tocris Cookson, Bristol, Reino Unido).

Los resultados presentados se realizaron con tres protocolos de registro; registros de características intrínsecas, eventos asincrónicos inducidos por estroncio y curva de condiciones iónicas.

### 2.2.1 Registros de Características Intrínsecas

Durante la adquisición y dominio de la técnica de registro, se realizaron registros de células piramidales de la región CA3 del hipocampo con el objetivo de lograr familiaridad con la región y verificación de la estabilidad y viabilidad de los

## Metodología

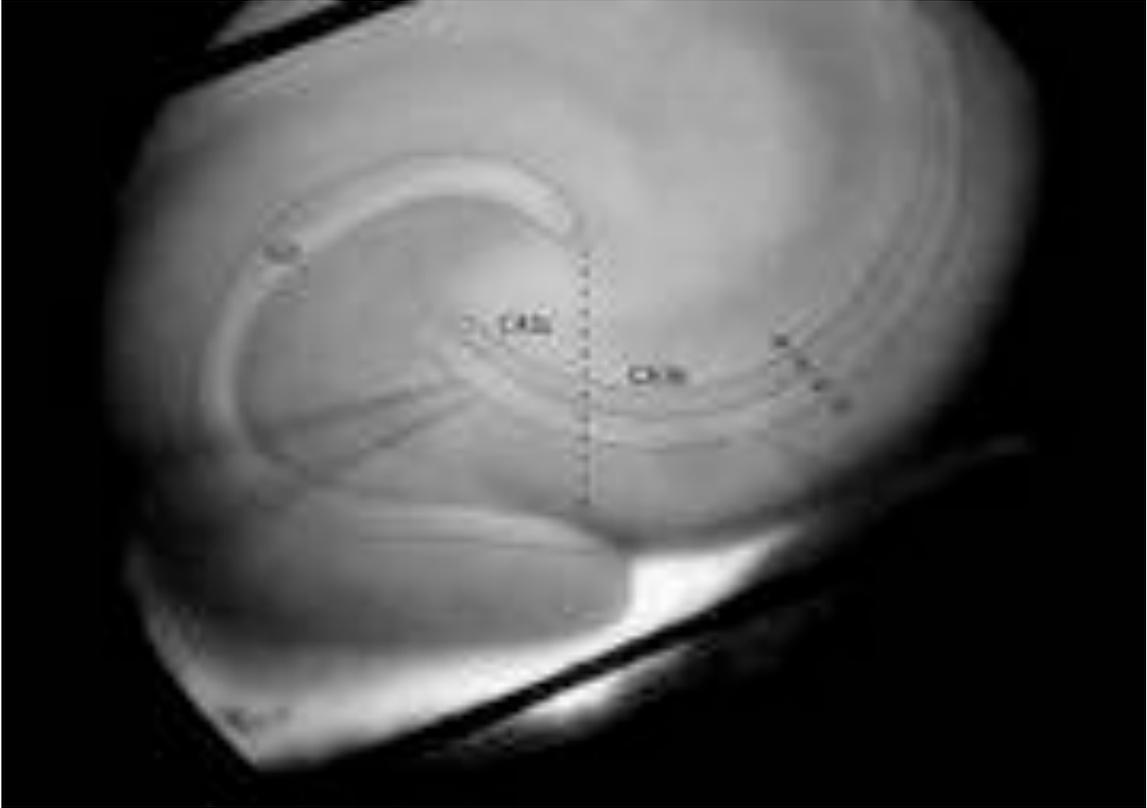
registros. Estos experimentos fueron realizados con una solución intracelular que contiene en mM: 135 metasulfonato de potasio, 10 KCl, 5NaCl, 1 EGTA, 10 HEPES, 2 MgATP, 0.4 Na<sub>2</sub>GTP, 10 fosfocreatina.

Una vez identificada una célula con signos de vitalidad, se procedió a establecer el modo *cell-attached* hasta alcanzar una resistencia superior a 1GΩ, se compensó la capacitancia de la pipeta antes de pasar al modo célula completa. La resistencia en serie obtenida generalmente estuvo entre 25-40MΩ.

El potencial en reposo se verificó inmediatamente después de abrir la célula, se rechazó toda célula con un potencial en reposo superior a -55mV.

En modo de fijación de corriente se verificaron las siguientes propiedades electrofisiológicas mediante protocolos específicos:

- Constante de tiempo; pulso hiperpolarizante de 30pA y 1 segundo de duración. Se ajustó una sola exponencial al promedio de 10 trazos.
- Resistencia de entrada; obtenida de la regresión lineal de la relación de corriente/voltaje de tres pulsos con 40pA de incremento, partiendo de -40 y hasta +40pA.
- Umbral y amplitud de disparo: Obtenido al evocar un potencial de acción con la aplicación de una rampa despolarizante de 100ms de duración con incrementos de 30pA hasta alcanzar evocar el potencial de acción.
- Reobase: la corriente mínima para producir un potencial de acción se obtuvo de la administración de pulsos de corriente de 1 segundo de duración partiendo de -500pA con incrementos de 100pA hasta la evocación del primer disparo.



**Ilustración 8. Posición de las pipetas de estimulación (izq.) y registro (der.) para la evocación de eventos sinápticos de la fibra musgosa.**

### 2.2.2 Estimulación Sináptica

En todos los experimentos de estimulación sináptica se utilizó estimulación extra-celular mediante una pipeta de doble barril o una pipeta de *patch-clamp* conteniendo solución extra-celular normal, acopladas a electrodos de plata clorurada y colocada en el *stratum lucidum*, vía de paso de la fibra musgosa. De no obtenerse respuesta, puede intentarse la recolocación del electrodo. Este es un procedimiento delicado que debe realizarse con sumo cuidado ya que el movimiento que esto ocasiona puede perturbar la estabilidad del sello de la neurona registrada (Ilustración 8).

Se administraron pulsos de 100  $\mu$ s de duración y entre 20-70  $\mu$ A de intensidad de corriente generados por una unidad de estimulación aislada (ISO-Flex, A.M.P.I., Israel) y programados en un generador de pulsos (Master-8, A.M.P.I., Israel).

## Metodología

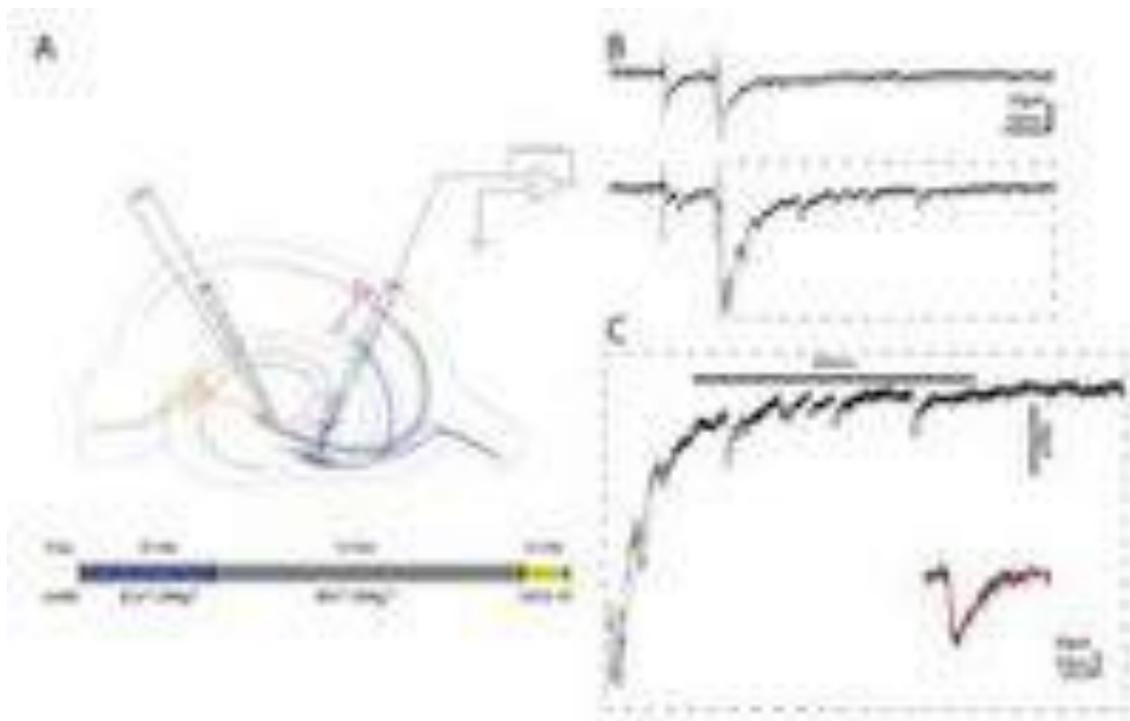
En todos los protocolos de estimulación se utilizó un protocolo de pulso pareado con un intervalo fijo de 60 ms.

Así mismo, en todos los experimentos de estimulación sináptica se utilizó una solución intracelular que contiene en mM: 120 CsMeSO<sub>4</sub>, 10 KCl, 10 HEPES, 0.5 EGTA, 4 MgATP, 0.5 NA<sub>2</sub>GTP, 8 fosfocreatina. En ciertas ocasiones se añadió 0.2-0.5% de biocitina para posterior identificación de la morfología.

Adicionalmente fueron agregados picrotoxina (100µM) y AP-V, antagonistas gabaérgico y glutamatérgico tipo NMDA, respectivamente y DCG-IV, agonista del receptor metabotrópico tipo II que inhibe selectivamente la transmisión de la fibra musgosa.

### 2.2.3 Eventos Asincrónicos

Para la obtención de eventos asincrónicos, se colocó la pipeta de estimulación en el *stratum lucidum*, se procedió a identificar y parchar una neurona piramidal de CA3 y en modo de fijación de voltaje se comenzó la búsqueda del evento sináptica evocado con la administración del protocolo de pulso pareado descrito. Una vez obtenido, la solución extra-celular se sustituyó por una solución de composición similar sustituyendo el calcio por estroncio a 8 mM.



**Ilustración 9. Diseño experimental para obtener eventos sinápticos asincrónicos.**



## Metodología

considerablemente en el modo de célula completa, se desarrolló un protocolo de tres condiciones iónicas complementado con estimulación por pulso pareado para la construcción de la parábola de varianza-media.

Al finalizar la última condición iónica experimental, se regresó a la solución extra-celular normal y se administró DCG-IV (1-2 $\mu$ M) para la verificación farmacológica del origen del evento sináptico.

Se obtuvieron entre 100 y 70 eventos por condición y frecuencia. Se descartaron fallos y eventos que llegaron a inducir disparo en la neurona registrada. Células en las cuales la resistencia en serie cambió más allá de 15% fueron descartadas.

La parábola de varianza-media fue construida a partir de la amplitud media y varianza de cada grupo de eventos. A esta gráfica le fue ajustada una función parabólica de la forma:

$$y = A\bar{x} - B\bar{x}^2$$

o una función lineal de la forma:

$$y = A\bar{x}$$

de manera iterativa con una aproximación no lineal de mínimos cuadrados optimizada en Python.

De obtenerse el mejor ajuste con la función parabólica, los parámetros cuánticos fueron estimados como se indica en la introducción.

### 2.2.5 Dificultades Inherentes al Estudio de la Fibra Musgosa

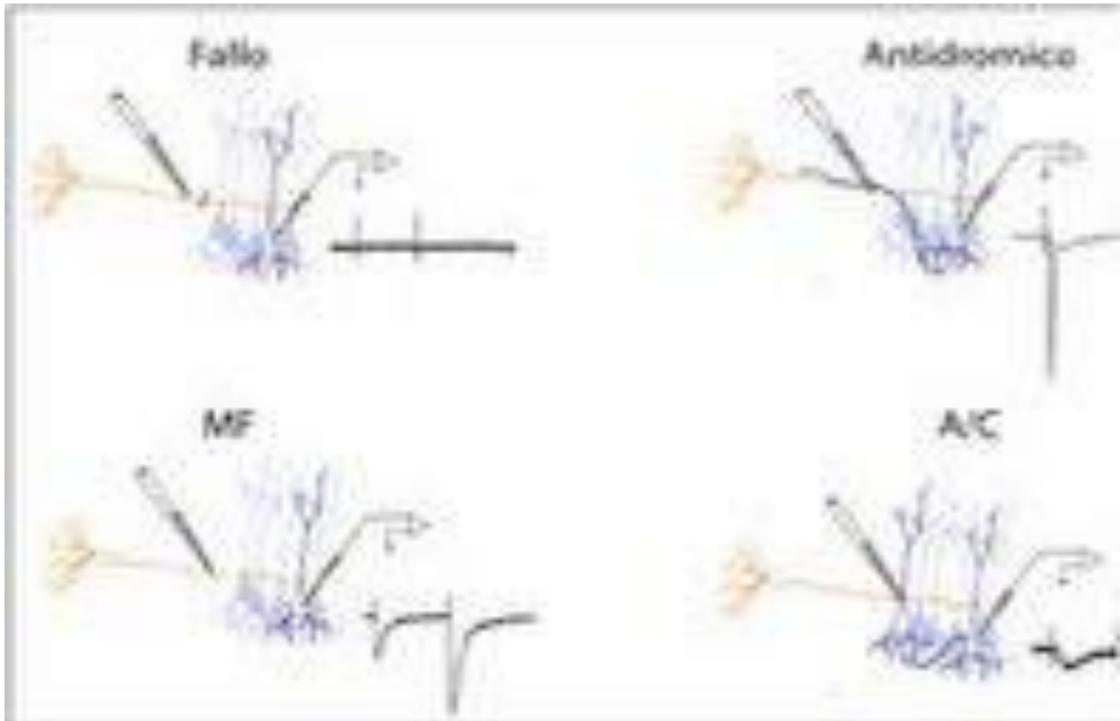
El estudio de la transmisión sináptica de la fibra musgosa es siempre complicado por las características anatómicas del circuito.

La conectividad entre las células granulares del giro dentado y las piramidales de CA3 es escasa, comparado con la innervación de la red asociativa que establece 20,000 contactos en cada célula piramidal, solamente 50 células granulares inervan cada piramidal de CA3, 0.005% de su conectividad (Rebola et al. 2017). Preservar la conectividad es un paso imprescindible en la preparación de la rebanada hipocampal para el registro exitoso de la fibra musgosa (Bischofberger et al. 2006).

## Resultados

Adicionalmente, la respuesta sináptica puede verse contaminada fácilmente tanto por la red de auto-asociación de CA3, como por estimulación anti-drómica de la aferencia que las neuronas piramidales envían al giro dentado.

Múltiples estrategias se han implementado en este proyecto para mejorar las probabilidades de un registro exitoso, sin embargo el índice de éxito permanece extremadamente bajo.



**Ilustración 12. Dificultades en el registro de la fibra musgosa.**

Esquema representativo de los artefactos encontrados más comúnmente durante la estimulación de la fibra musgosa incluyendo fallos en la conectividad, estimulación antidrómica y estimulación de la red asociativa/colateral (A/C) y sus respectivas respuestas comparadas con la respuesta representativa de la fibra musgosa (MF).

## 3 RESULTADOS

### 3.1 Características Intrínsecas

La región CA3 del hipocampo es conocida por su fragilidad en la preparación *ex vivo*, característica que se traslada a su susceptibilidad *in vivo* a la actividad epileptiforme y daño por excito-toxicidad.

Para lograr dominio de la preparación y la técnica de registro, se realizaron múltiples series de experimentos en los cuales las características intrínsecas de las neuronas piramidales y su estabilidad durante el registro fueron evaluadas.

La primera observación notable es la densidad de la matriz extracelular, la cual es abundante y se adhiere fuertemente a la pipeta de registro y a los elementos celulares dificultando la creación del giga-sello. La estabilidad del registro es muy sensible a la resistencia en serie obtenida al lograr la configuración de célula completa, en general una resistencia superior a 40 M $\Omega$  se relacionó con un sello frágil que tiende a cerrarse al paso de unos minutos. Como se mencionó, el potencial en reposo fue verificado inmediatamente al abrir la célula, con un promedio de -83.78 mV, con cierta tendencia a la hiperpolarización tras unos segundos en la configuración de célula completa.

Los parámetros obtenidos de las características intrínsecas indicadas en la sección de métodos son resumidos en la Tabla 1.

**Tabla 1 . Características intrínsecas de las células piramidales de CA3**

Parámetro	Media	Error Std	N
V <sub>m</sub>	-83.78 mV	1.46	33c <sup>as</sup>
Tau	37.23 ms	2.43	33c <sup>as</sup>
R <sub>in</sub>	149.92 MΩ	7.65	33c <sup>as</sup>
C <sub>m</sub>	258.96 pF	17.95	33c <sup>as</sup>
Reobase	315.06 pA	27.06	20c <sup>as</sup>
Umbral PA	-46.08 mV	-4.33	28c <sup>as</sup>
Amplitud PA	77.66 mV	9.1	28c <sup>as</sup>

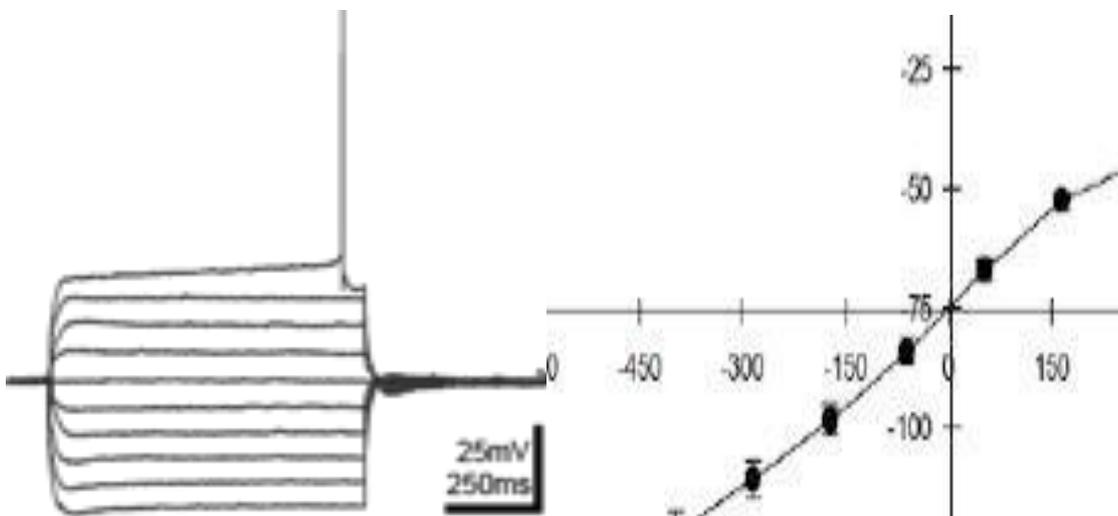
Todos los parámetros obtenidos se encuentran dentro del rango reportado en la literatura (Johnston 1981).

La constante de tiempo se calculó ajustando una función monoexponencial al cambio en voltaje producido por la inyección de un pequeño pulso hiperpolarizante. A pesar de que ser teóricamente más apropiado el “*peeling method*” propuesto por Rall, en el cual se considera la naturaleza multi-compartimental de la neurona y la constante de tiempo queda definida como una sumatoria infinita de constantes (Johnston 1981; Johnston et al. 1996; Koch et al. 1996), los resultados obtenidos no difieren sustancialmente de los reportados con estos métodos.

## Resultados



**Ilustración 13.** Trazos representativos de la evocación de un potencial de acción (izq.) y la respuesta a un pulso de corriente que evoca disparo neuronal.



**Ilustración 14.** Respuesta en voltaje a la aplicación de pulsos de corriente (curva I/V).

La respuesta en voltaje de la neurona en la curva de corriente/voltaje no muestra rectificaciones importantes en el rango estudiado, salvo en regiones muy cercanas a la reobase. En efecto, el componente de corriente activada por hiperpolarización,  $I_h$ , es discreto en la mayoría de las células registradas.

El primer potencial de acción puede aparecer temprano ante la inyección de corriente cercana a la reobase o tardíamente, como se ha reportado. La frecuencia de disparo es baja en la mayoría de neuronas, las cuales presentan un solo potencial de acción o un disparo tónico de baja frecuencia, con potenciales de 70-80 mV de amplitud y un umbral que oscila alrededor de 45 mV. Las propiedades del disparo no fueron

analizadas más detalladamente pero se encuentran en concordancia con reportes previos (Hemond et al. 2009).

Una observación ocasional fue la generación de aparentes oscilaciones del potencial de membrana durante la actividad de disparo. Esta característica ha sido reportada y cuestionada múltiples ocasiones en la literatura sin llegar a consenso alguno (Hablitz & Johnston 1981; Avery & Johnston 1996; Lazarewicz et al. 2002; Hemond et al. 2009).

### 3.2 Transmisión Sináptica en el Complejo de la Fibra Musgosa

El complejo sináptico de la fibra musgosa es una de las sinapsis icónicas del sistema nervioso que ha cautivado la curiosidad de científicos dedicados al estudio de la neurotransmisión por sus robustas y singlares propiedades plásticas.

Sin embargo, su estudio presenta dificultades igualmente singlares y demandantes bien reconocidas y documentadas en la literatura (Henze et al. 2000; Urban et al. 2001; Jaffe & Gutiérrez 2007). De estas dificultades emana cierta incertidumbre con respecto a algunos reportes, pues la selectividad de la respuesta sináptica evocada es considerablemente difícil de asegurar (Jonas et al. 1993; Nicoll & Schmitz 2005).

En este sentido, el presente trabajo no es la excepción y la dificultad del registro estable y selectivo de la fibra musgosa ha resultado una tarea demandante, y en ocasiones frustrante, con bajo índice de éxito.

<b>Tota l de células</b>	<b>Célul as no viables</b>	<b>Célul as sin MF</b>	<b>Célul as no estables</b>	<b>Célul as estables</b>
188	78	69	29	12

Como puede notarse de la relación presentada en la tabla, la inestabilidad de las células registradas representa un gran obstáculo para la obtención de datos. En efecto la

## Resultados

región de CA3 experimenta un deterioro mucho más rápido que otras regiones del hipocampo y el registro estable de sus células se ve severamente comprometido después de 3-4 horas posteriores a la preparación de las rebanadas.

Aunado a esto, las células catalogadas como no estables también incluyen aquellas en las cuales la respuesta sináptica no fue lo suficientemente selectiva, ya sea por contaminación, evidenciada por eventos sinápticos de cinética compuesta ó la evocación de potenciales de acción, o la proporción de fallos fue excesivamente alta, comprometiendo la obtención de datos suficientes.

Finalmente, en el escaso número de células que lograron completar satisfactoriamente el extenso periodo de registro se debió optimizar el protocolo de condiciones iónicas y frecuencias de estimulación.

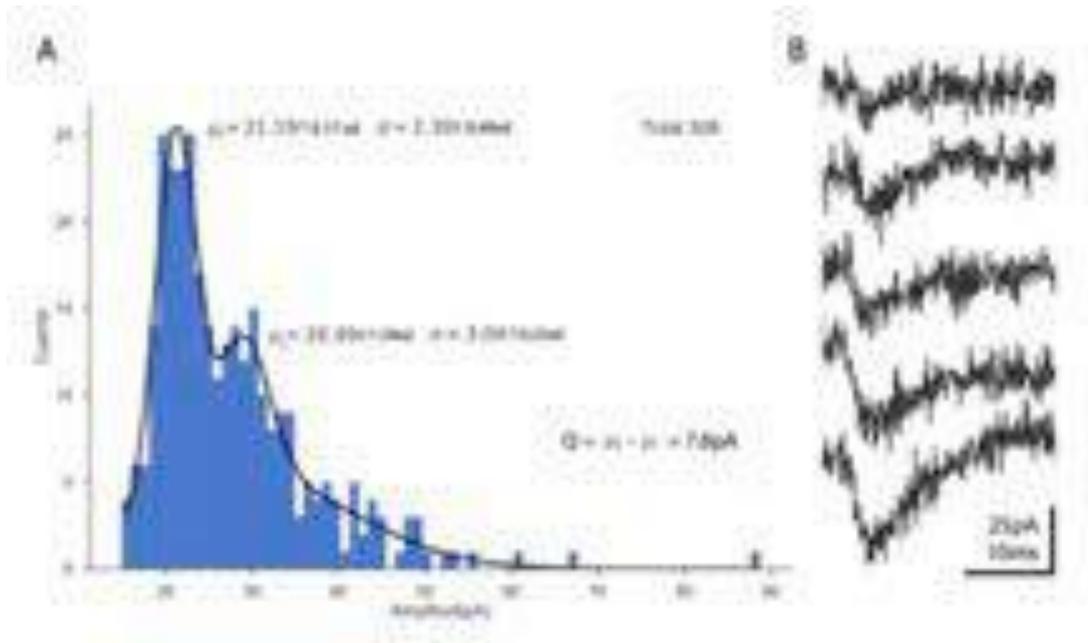
Se presenta, por lo tanto, una muestra de 3 neuronas para los eventos asincrónicos y 3 neuronas para el análisis de varianza-media.

### 3.2.1 Eventos Asincrónicos

La sustitución de calcio por estroncio en el líquido extracelular para el estudio de la transmisión sináptica data de las exploraciones pioneras en neurotransmisión; sin embargo, los mecanismos de sus particulares efectos permanecen en gran parte sin explicación (Dodge et al. 1969; Xu-Friedman & Regehr 1999; Xu-Friedman & Regehr 2000).

Durante los primeros minutos tras la sustitución de calcio por estroncio, se observa un incremento de la facilitación por pulso pareado seguido por una progresiva y lenta desincronización del evento sináptico (Ilustración 9).

Después de varios minutos, la corriente post-sináptica presenta una fase sincrónica de cinética compuesta que generalmente contiene múltiples picos tanto en su región de amplitud máxima como en su fase de decaimiento. Una vez que la fase sincrónica ha regresado a la línea basal se obtiene un período distintivo por la alta densidad de eventos sinápticos de baja amplitud. Si las condiciones de la preparación son buenas, la actividad espontánea en el resto del registro debe ser escasa o nula y los eventos miniatura de esta ventana de tiempo pueden ser considerados con seguridad como eventos asincrónicos de la sinapsis estimulada (Bekkers & Clements 1999).

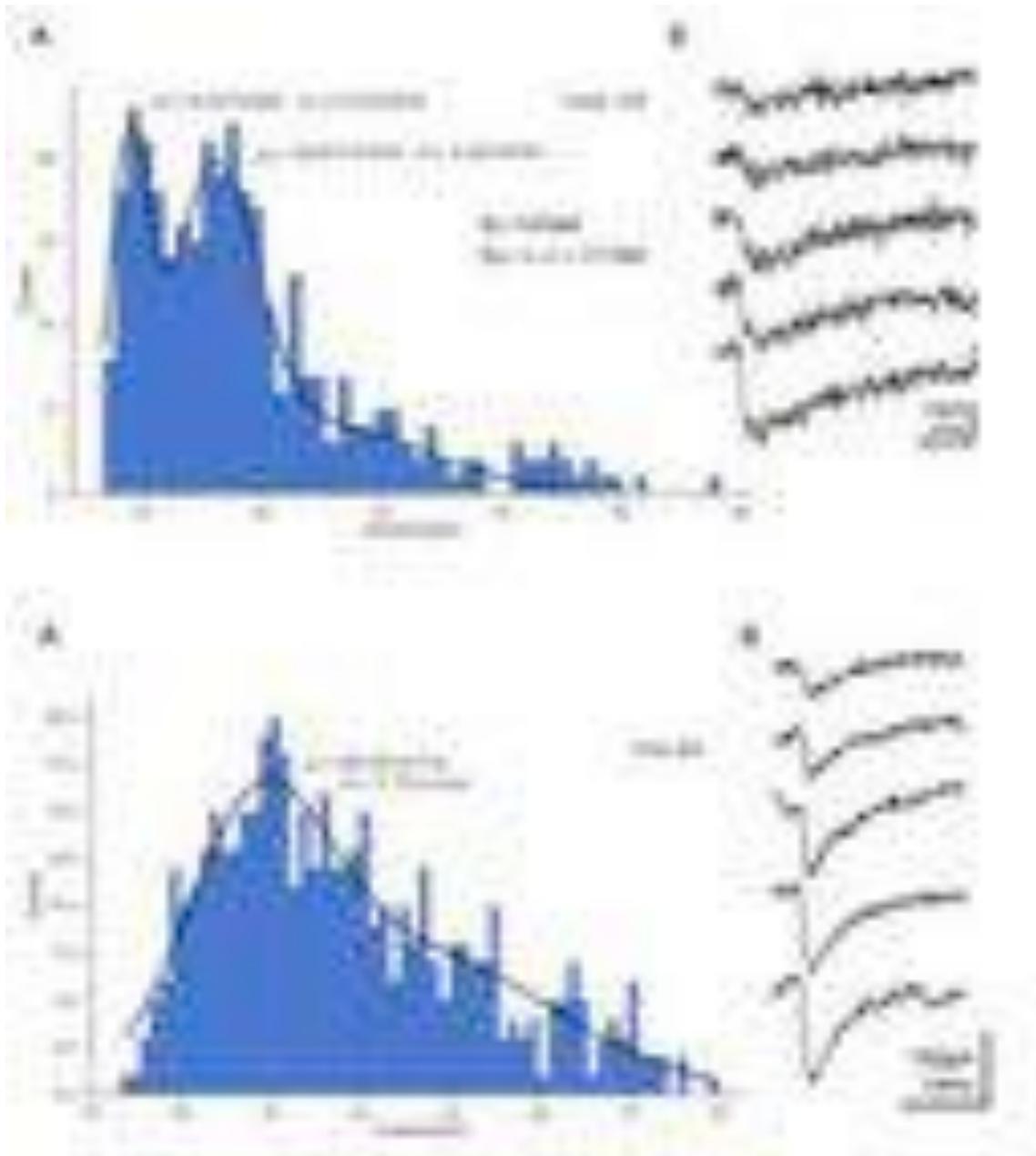


**Ilustración 15. Amplitudes de los eventos asincrónicos, primera célula. A, Histograma de frecuencias de amplitudes. B, trazos representativos de eventos aislados.**

El histograma de frecuencias de amplitudes de la primera célula analizada muestra una distribución multimodal que fue mejor ajustada como la sumatoria de tres distribuciones gaussianas con una media inicial de 21.19 pA y una media subsecuente de 28.99 pA, una distancia entre medias de 7.8 pA, el pico del tercer componente gaussiano no es distinguible claramente y se ha decidido descartarlo. Podemos observar que los eventos más pequeños son apenas distinguibles del ruido de fondo, a pesar de las medidas tomadas para mejorar las condiciones de registro.

Los eventos de la segunda célula analizada presentan igualmente una distribución multimodal, igualmente modelada con una sumatoria de tres gaussianas.

En esta ocasión podemos observar una mejor relación ruido/señal que permite la distinción de un primer pico con media en 9.53 pA y un segundo componente con media en 16.67 pA, una distancia entre picos de 7.17 pA. El tercer componente, de nuevo no es discernible claramente y no se incluye en el análisis.



**Ilustración 16. Resultados del análisis de eventos asincrónicos de las células 2 y 3.**

La tercer célula analizada presenta un importante compromiso de la relación ruido/señal y la distribución de amplitudes de estos eventos no nos brinda información que indique grupos discernibles de distinto contenido cuántico, aun cuando la distribución es apropiadamente descrita como la sumatoria de dos gaussianas con primer una media en 28.49 pA similar al segundo grupo de la primer célula.

El pico de menor amplitud en las tres células corresponde a 9.53 pA. Si la distancia entre picos en el histograma corresponde a una medida indirecta de la amplitud cuántica (Del Castillo & Katz 1954; Martin 1966; Jonas et al. 1993),

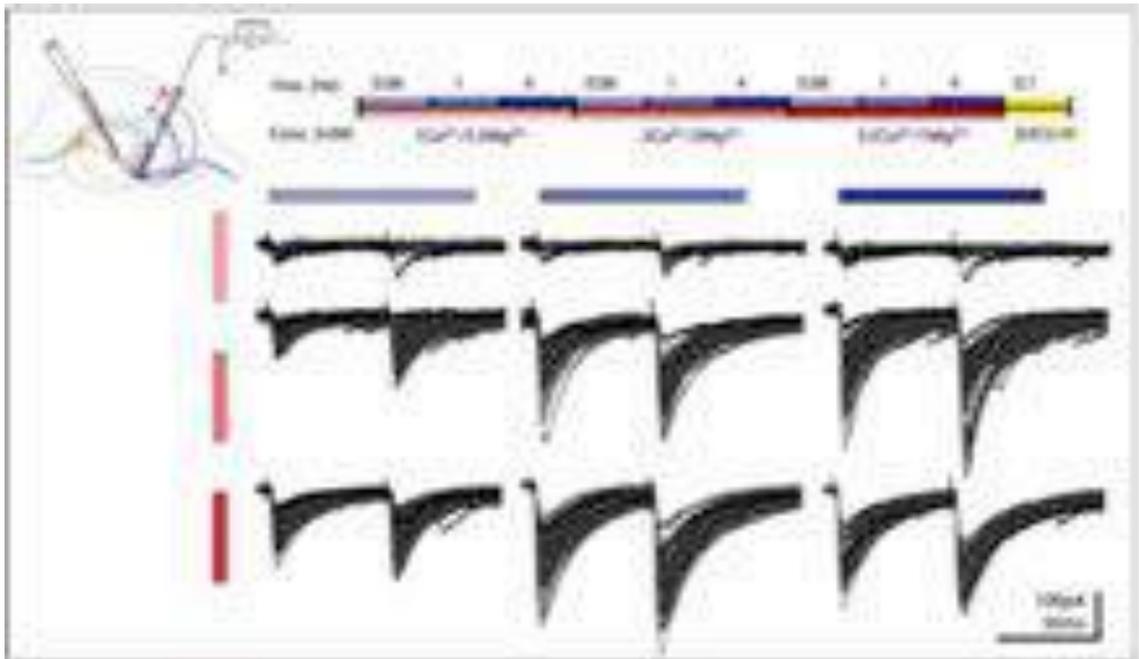
## Resultados

obtenemos un cuánto entre 7.17 y 9.53 pA con una media de 8.16 pA, una cifra consistente con reportes previos (Jonas et al. 1993; von Kitzing et al. 1994) y consistente como la unidad integral de los grupos subsecuentes.

### 3.2.2 Análisis de Varianza-Media

El diseño experimental y trazos representativos de la actividad sináptica a lo largo de un experimento pueden observarse en las ilustraciones 17 y 18.

Como se puede observar, en condiciones de baja probabilidad de liberación el porcentaje de eventos exitosos se ve reducida considerablemente, un buen indicio de la selectividad con la cual se está estimulando una o un número pequeño de fibras. El cambio en la frecuencia de estimulación incrementa el porcentaje de eventos exitosos pero no logra inducir un incremento en la potencia promedio de la transmisión.

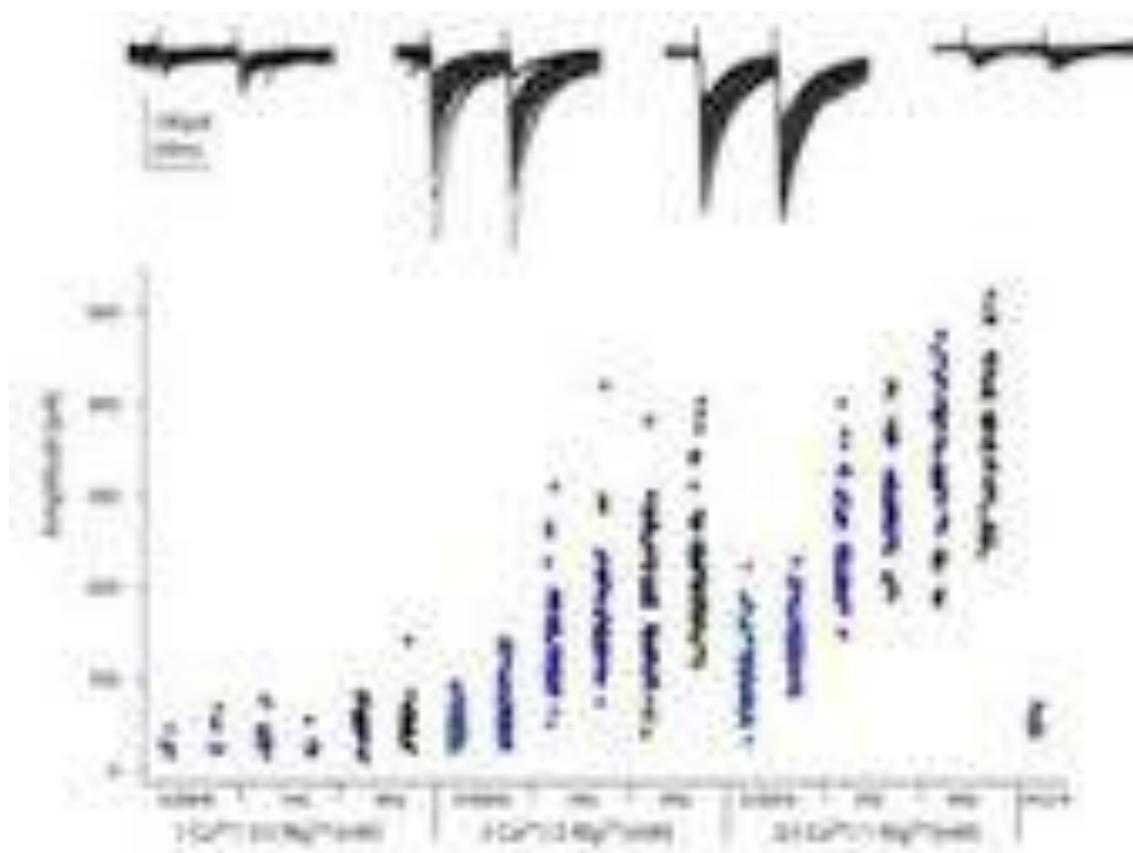


**Ilustración 17. Efecto del cambio en condiciones iónicas y frecuencia de estimulación en la corriente post-sináptica.**

En las condiciones subsecuentes es evidente la facilitación inducida por el aumento en la frecuencia de estimulación. Como era de esperarse, dicha facilitación se manifiesta no solamente como un incremento en la amplitud de los eventos individuales sino también como un incremento en la dispersión de los datos de cada grupo.

## Resultados

Cabe resaltar que la facilitación inducida por la estimulación a 4 Hz se ve considerable y consistentemente revertida al regresar a la frecuencia basal de estimulación, aun cuando el cambio en condiciones iónicas incrementa progresivamente la probabilidad de liberación. Éste es un importante indicio que respalda la noción de que la facilitación obtenida es un fenómeno transitorio y reversible consistente con un proceso de facilitación a corto plazo. Finalmente, la administración de DCG-IV inhibe la respuesta sináptica a un grado comparable con la disminución extracelular de calcio.



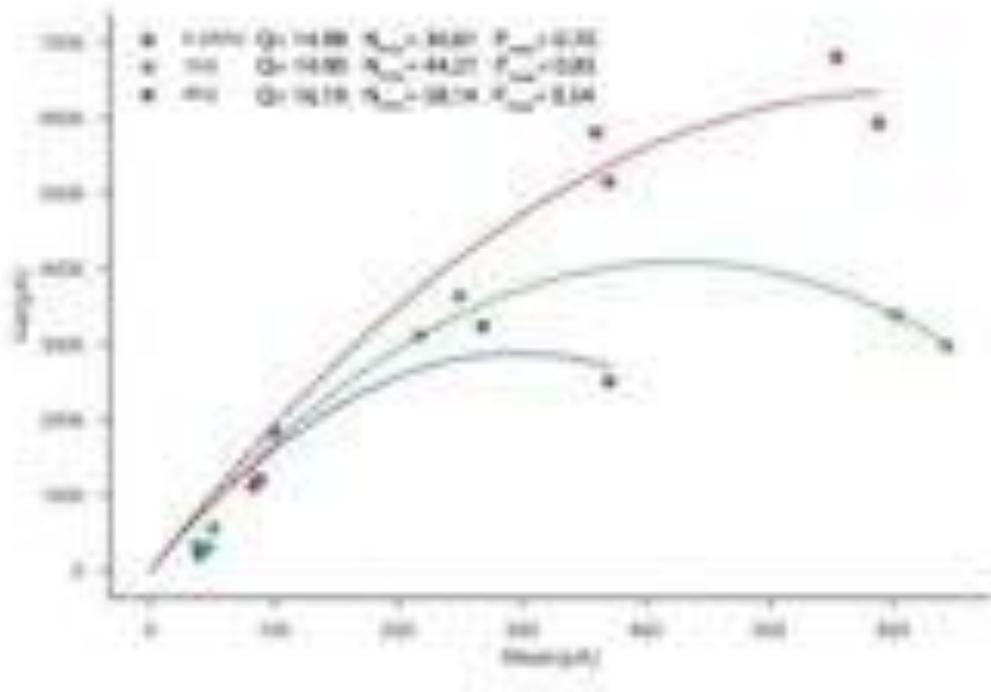
**Ilustración 18. Curso completo de un experimento de curva de condiciones y frecuencias representativo.**

La media y varianza de cada grupo correspondiente al primer y segundo evento del protocolo de pulso pareado obtenidos en cada frecuencia y condición iónica son posteriormente analizados y presentados como células individuales. En estos grupos analizados se han excluido fallos, eventos con artefactos y aquellos en los cuales la amplitud del evento ha logrado la evocación de un potencial de acción en la neurona registrada. Este tipo de experimentos permite construir la parábola de varianza-media, la cual pone en manifiesto la relación entre estos parámetros.

## Resultados

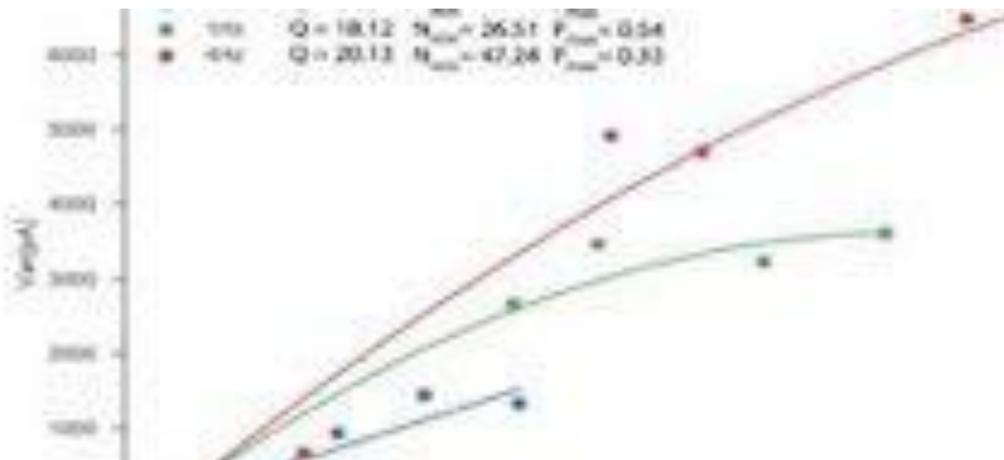
Como se muestra en la ilustración 18, el incremento en la probabilidad de liberación conlleva un incremento en la fluctuación de la amplitud del evento sináptico, incrementando paulatinamente la varianza de los datos hasta una meseta máxima aproximadamente en rangos medios de probabilidad para después descender de nuevo conforme la probabilidad de liberación incrementa hacia el máximo.

Debe recordarse que los parámetros extraídos representan medias tazadas, las cuales se ven influenciadas en mayor medida por datos más grandes que la media aritmética, por lo cual es de esperarse una ligera discrepancia entre la magnitud cuántica estimada por este método y la estimación independiente realizada con la inducción de eventos asincrónicos.

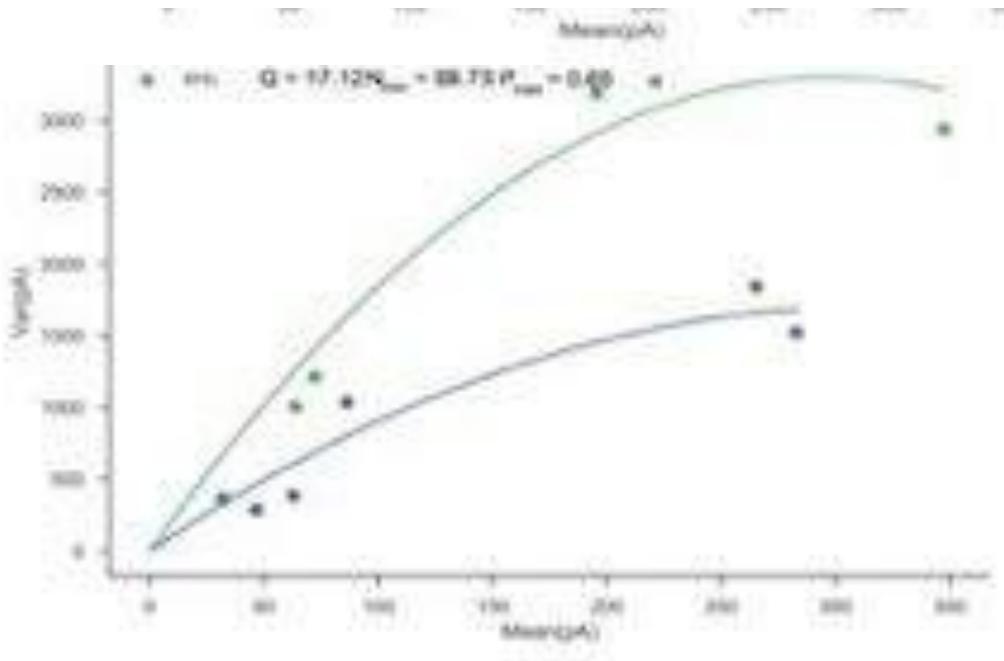


## Resultados

Nótese que los puntos fueron adquiridos con un protocolo de estimulación por pulso pareado, lo que brinda dos puntos por condición iónica. En el caso de la curva control (azul), esto fue fundamental dado que la estimulación mínima en la primera condición indujo un porcentaje de fallos de aproximadamente el 80% y el incremento de la probabilidad de liberación con sólo el primer punto de la última condición habría sido insuficiente para el ajuste parabólico.



**Ilustración 19. Curvas media/varianza, primera célula.**



**Ilustración 20. Curvas media/varianza segunda y tercer células.**

El ajuste de una función parabólica es satisfactorio para las tres frecuencias. Los parámetros cuánticos calculados con los valores arrojados del ajuste para la frecuencia en reposo son consistentes con la literatura reportada en lo referente a

## Resultados

magnitud cuantal  $Q = 14.98$  pA, número de sitios de liberación  $N = 31$  y  $P_{max} = 0.70$  (Jonas et al. 1993; von Kitzing et al. 1994; Lawrence et al. 2004).

En este caso, las frecuencias de interés muestran un incremento inicial en la probabilidad de liberación y adicionalmente un incremento en el número de sitios de liberación.

Los resultados obtenidos de las dos células adicionales muestran una magnitud cuántica alrededor de 8 pA, muy semejante a la obtenida de la distribución de eventos asincrónicos. Así mismo, muestran un consistente incremento en la probabilidad de liberación.

Una diferencia notable con la primera célula es el aumento en el tamaño cuántico, el cual se duplica al incrementar la frecuencia de 0.06Hz a 1Hz, con incremento subsecuente menor al aumentar a 4Hz.

Sin embargo, la observación más relevante, consistente en todas las células analizadas, es el incremento sustancial en los sitios de liberación, lo que sugiere la presencia de sinapsis silentes en el complejo de la fibra musgosa, capaces de ser activados rápidamente y contribuir al aumento en la eficacia de transmisión de esta sinapsis.

## 4 DISCUSIÓN

Los resultados presentados en este trabajo constituyen la primera aproximación de nuestro grupo de trabajo a la disección funcional a nivel cuántico de los mecanismos detrás de procesos de plasticidad a corto plazo. Ofrecen, además, una perspectiva novedosa sobre la capacidad auto-regulatoria de las sinapsis del sistema nervioso central. La activación e inactivación rápida de contactos sinápticos constituye un poderoso mecanismo de amplificación o atenuación de la información a transmitir y recalca el rol de la sinapsis como unidad computacional elemental del sistema nervioso.

Sin duda, la mayor limitación de este trabajo es el modesto tamaño de las muestras analizadas. Es evidente en ambas series experimentales sobre transmisión sináptica la discrepancia entre los hallazgos en algunas células. Si bien esta es una característica de todos los sistemas biológicos, este argumento no hace más que sobresaltar la necesidad de un mayor número de observaciones. Es inobjetable que las ideas expuestas en esta tesis no harían más que beneficiarse de un conjunto de datos más abundante.

Sin embargo, la cuidadosa selección de series experimentales exitosas refleja a la vez el estricto apego a la búsqueda de certeza con la que se ha emprendido este proyecto.

## Discusión

Las fuentes de error y fallo han sido múltiples y, a pesar de haber sido abordadas sistemáticamente, constituyen un obstáculo que requerirá medidas adicionales.

La relación ruido/señal ha sido una de las grandes limitantes históricamente para el registro de los eventos unitarios en el sistema nervioso central. Como se mencionó, mientras que en las sinapsis periféricas un evento miniatura corresponde a la respuesta mediada por cientos a miles de canales iónicos, en las sinapsis centrales este número se ve reducido por lo general, a unas decenas. Es evidente que la sensibilidad de las condiciones de registro actuales ha comprometido la resolución tanto de los eventos asincrónicos como de los eventos sinápticos evocados en las más bajas condiciones de liberación.

El registro de la fibra musgosa conlleva dificultades inherentes a sus características anatómicas que han sido expuestas ampliamente en secciones anteriores. La cuidadosa preparación de la rebanada transversa hipocampal prevalece como la piedra angular del abordaje experimental. Aunado a esto, nuevas estrategias han surgido para incrementar el índice de éxito, entre ellas se encuentra el registro directo del botón terminal de la fibra musgosa y sistemas de optogenética que permiten la estimulación selectiva de las células granulares.

El análisis de los eventos asincrónicos se ha basado en el clásico histograma de amplitudes y la subsecuente identificación de picos equidistantes (i.e. cuánticos). A pesar del relativo éxito que se obtuvo, como se ha mencionado este método es susceptible a múltiples artefactos y en al menos una célula ha resultado ineficaz.

Un método tal vez más sistemático de identificar grupos individuales dentro de la población de eventos asincrónicos podría ser el análisis de componentes principales, el cual integraría todos los aspectos de la cinética de los eventos para la identificación de subpoblaciones que quizá corresponderían mejor a grupos con diferente contenido cuántico. Aproximaciones de este tipo han sido propuestas para sustituir el análisis cuántico tradicional (Dityatev et al. 2003).

El análisis de varianza-media aquí implementado se basa en el modelo binomial simple. A pesar de la consistencia en los parámetros obtenidos y al menos un reporte previo de la validez del modelo en esta sinapsis (Lawrence et al. 2004), la morfología compleja de la sinapsis y sus propiedades plásticas y los resultados

## Discusión

arrojados por una de las neuronas presentadas son argumentos de peso para considerar un modelo más complejo.

Específicamente, la primera neurona analizada muestra inconsistencias en la probabilidad máxima de liberación al ser de hecho menor en el pico de facilitación comparada con la probabilidad estimada en el rango medio de facilitación. Este hallazgo podría significar heterogeneidad en la probabilidad de liberación entre sitios individuales. Por otro lado, este hallazgo no se presentó en el resto de las neuronas, las cuales presentan consistentes y progresivos aumentos en su probabilidad máxima de liberación proporcionales a la magnitud de facilitación. Lo que indica que las observaciones de la primera célula podría ser artefactual. Claramente, esta es uno de los resultados que podría esclarecerse con una muestra mayor.

En dos de las neuronas se estimó un aumento en el tamaño cuántico y en la tercera se estimó una magnitud cuántica similar al aumento de las células previas. El tamaño del cuanto se encuentra determinado tanto por factores pre- como post-sinápticos.

Esto puede resultar poco intuitivo para quienes nos hemos formado estudiando el sistema nervioso central donde es común la saturación de los receptores de la densidad post-sináptica. Sin embargo, el concepto de magnitud cuántica se refiere a la respuesta obtenida por la liberación de un paquete de neurotransmisor y la activación correspondiente de los receptores post-sinápticos. En contactos sinápticos donde la disponibilidad de receptores supera la liberación media de neurotransmisor, como en la placa neuromuscular, la magnitud de la respuesta se encuentra regulada estrechamente por el contenido de neurotransmisor en cada vesícula y la cantidad de vesículas liberadas. En el extremo opuesto, una sinapsis cuyos receptores se saturen fácilmente ante la liberación de una vesícula, tendrán una respuesta controlada estrictamente por la disponibilidad de receptores y sus características intrínsecas.

Sinapsis centrales morfológicamente complejas y con propiedades robustas de facilitación y potenciación se encuentran en el centro de este rango de posibilidades, y por lo tanto modificaciones en el tamaño cuántico son posibles tanto mediante mecanismos pre- como post-sinápticos. Pre-sinápticamente se ha documentado la existencia de vesículas de núcleo claro de diámetro de hasta 200 nm, sustancialmente superior al de la mayoría, y se les ha relacionado con el denominado “evento miniatura gigante” (Henze et al. 2002). Una posibilidad es que estas vesículas constituyan una

## Discusión

subpoblación segregada funcionalmente del resto, con una cinética de liberación distinta y sean reclutadas preferentemente durante episodios de actividad sostenida.

Post-sinápticamente, la liberación masiva de glutamato podría activar receptores de cinética más lenta que los AMPA, como los receptores de kainato, mediando una despolarización sostenida de la espina dendrítica ó activando vías de señalización capaces de modificar las propiedades de los canales iónicos disponibles.

Una alternativa adicional es la fusión y liberación multi-vesicular en el botón de la fibra musgosa. Este mecanismo se encuentra bien documentado en células con funciones endócrinas y en la liberación de neuromoduladores como hormonas y péptidos. La fusión multi-vesicular apoya de manera indirecta la existencia del mini gigante y la posibilidad de un modelo más complejo de liberación en la fibra musgosa.

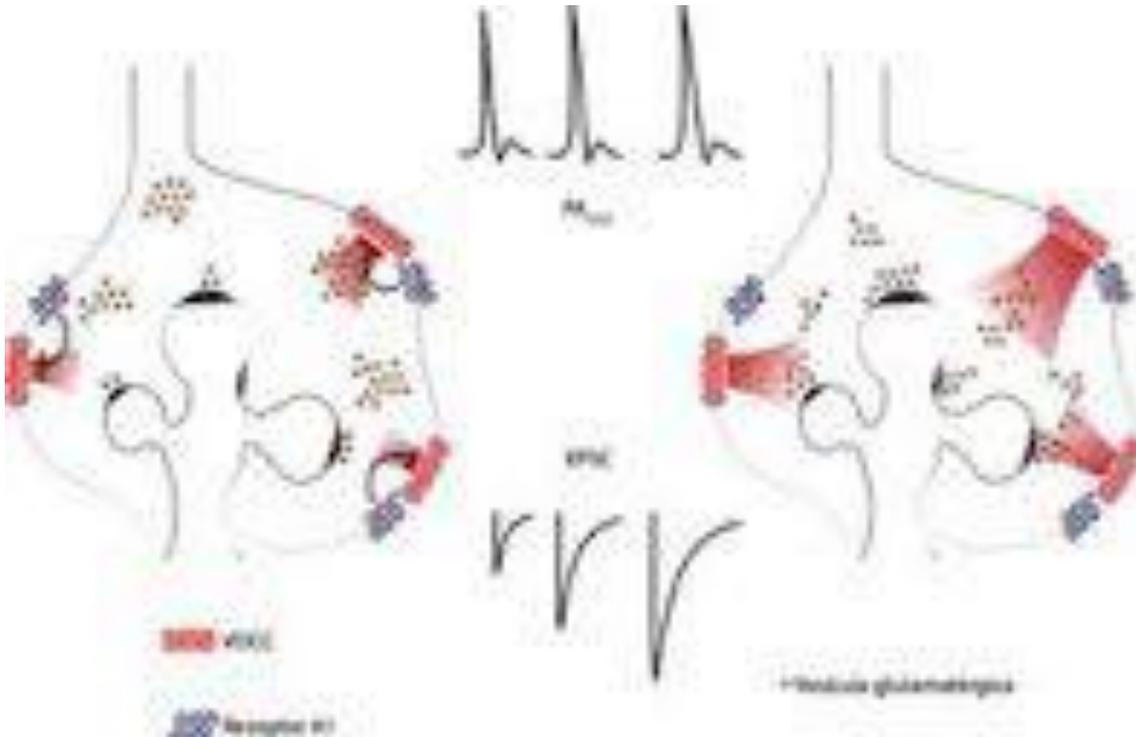
Por último, el hallazgo más consistente es el incremento en los sitios de liberación. Esto implica la existencia de sinapsis silentes en el complejo de la fibra musgosa. Como se mencionó, existen mecanismos de silenciamiento tanto pre- como post-sinápticos. El abordaje experimental utilizado, incluyendo el antagonismo de los receptores NMDA, hace más probable un mecanismo pre-sináptico. Los modelos mejor documentados de silenciamiento pre-sináptico incluyen zonas activas carentes de vesículas listas para ser liberadas y zonas activas segregadas y alejadas de los sitios de alta densidad de canales de calcio, ambos modelos ponen de manifiesto la importancia de la estricta regulación de la corriente de calcio en la terminal pre-sináptica (Atwood & Wojtowicz 1999; Voronin & Cherubini 2003; Voronin & Cherubini 2004; Voronin et al. 2004).

En este sentido se han documentado múltiples mecanismos de regulación de la corriente de los canales de calcio activados por voltaje particulares a la fibra musgosa; inhibición tónica de los canales de calcio mediada por adenosina (Gundlfinger, et al. 2007), prolongación del potencial de acción en la terminal ante la actividad sostenida (Geiger & Jonas 2000), canales de calcio organizados en nano-dominios (Vyleta & Jonas 2014) y mecanismos de amortiguación de la corriente de calcio.

Estos mecanismos convergen para una estricta regulación de la corriente de calcio en la terminal y su interacción con las numerosas zonas activas, promoviendo una pronunciada facilitación de esta corriente ante la actividad sostenida y consecuentemente la movilización de vesículas desde la reserva, la sincronización de

## Discusión

sitios de liberación y posiblemente, como nuestros datos sugieren, la activación de sitios adicionales de liberación (Ilustración 21).



**Ilustración 21. Mecanismos convergentes en la facilitación de la fibra musgosa.**

## 5 CONCLUSIONES

El trabajo presentado en esta tesis establece las bases teóricas y experimentales para el análisis cuántico de propiedades plásticas a corto plazo con su implementación en el complejo sináptico de la fibra musgosa como primer objeto de estudio. Este es el primer proyecto en su tipo en nuestro grupo de trabajo.

Los resultados obtenidos confirman previas estimaciones del tamaño cuántico de la fibra musgosa (aprox. 8pA) y sugieren dos modificaciones intrigantes en los parámetros cuánticos detrás de la facilitación por frecuencia en esta sinapsis; un aumento en el tamaño cuántico y el reclutamiento de sitios adicionales de liberación.

Estos resultados añaden a trabajos previos en la documentación de sinapsis silentes en el sistema nervioso central maduro y expanden sus implicaciones funcionales dándoles un papel activo en la modulación de la transmisión sináptica a corto plazo.

Así mismo, se plantean diversas posibilidades de exploración futura como la liberación multi-vesicular, la existencia de poblaciones segregadas de vesículas con distinto contenido de neurotransmisor, la implementación de nuevos métodos de análisis para el estudio de las propiedades cuánticas de las sinapsis.

## 6 PERSPECTIVAS

Como se mencionó previamente, el trabajo aquí presentado constituye el primer acercamiento y una base para el estudio sistemático de los aspectos elementales en transmisión sináptica.

Los principios y métodos aquí expuestos pueden ser trasladados y adaptados para el estudio de otras estructuras cerebrales y/u otras modificaciones de la transmisión sináptica como el efecto de fármacos ó modelos de patologías y alteraciones del sistema nervioso central.

En el contexto de la fibra musgosa, quedan por verificarse estas observaciones en una muestra más grande de células.

Así mismo, cabe la posibilidad de describir la transmisión en esta sinapsis con un modelo más complejo que el binomial aquí utilizado, lo cual potencialmente podría añadir más certidumbre a las conclusiones arrojadas aquí.

La verificación de fenómenos como la liberación multi-vesicular o el reclutamiento de vesículas con distinto contenido cuántico requieren aproximaciones experimentales distintas a las del contexto de esta tesis.

## 7 REFERENCIAS

- Abbott, L.F. & Nelson, S.B., 2000. Synaptic plasticity: taming the beast. *Nature neuroscience*, 3, pp.1178–1183.
- Abbott, L.F. & Regehr, W.G., 2004. Synaptic computation. *Nature*, 431(7010), pp.796–803.
- Acsády, L. et al., 1998. GABAergic cells are the major postsynaptic targets of mossy fibers in the rat hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 18(9), pp.3386–403.
- Alabi, A.A. & Tsien, R.W., 2012. Synaptic vesicle pools and dynamic. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(8).
- Albright, T.D. et al., 2000. Neural science: a century of progress and the mysteries that remain. *Neuron*, 25 Suppl(November), pp.S1--S55.
- Amaral, D.G., 1993. Emerging principles of intrinsic hippocampal organization. *Current Opinion in Neurobiology*, 3(2), pp.225–229.
- Amaral, D.G. & Witter, M.P., 1989. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: A review of anatomical data. *Neuroscience*, 31(3), pp.571–591.
- Atwood, H.L. & Wojtowicz, J.M., 1999. Silent Synapses in Neural Plasticity: Current Evidence. *Learning and Memory*, 6, pp.542–571.

## Referencias

- Avery, R.B. & Johnston, D., 1996. Multiple channel types contribute to the low-voltage-activated calcium current in hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Journal of Neuroscience*, 16(18), pp.5567–5582.
- Bacaj, T. et al., 2013. Synaptotagmin-1 and Synaptotagmin-7 Trigger Synchronous and Asynchronous Phases of Neurotransmitter Release. *Neuron*, 80(4), pp.947–959.
- Bekkers, J.M., 1994. Quantal analysis of synaptic transmission in the central nervous system. *Current Opinion in Neurobiology*, 4(3), pp.360–365.
- Bekkers, J.M. & Clements, J.D., 1999. Quantal amplitude and quantal variance of strontium-induced asynchronous EPSCs in rat dentate granule neurons. *The Journal of physiology*, 516 ( Pt 1, pp.227–248.
- Bekkers, J.M. & Stevens, C.F., 1995. Quantal analysis of EPSCs recorded from small numbers of synapses in hippocampal cultures. *Journal of neurophysiology*, 73(3), pp.1145–56.
- Beltrán, J.Q. et al., 2012. Co-release of glutamate and GABA from single, identified mossy fibre giant boutons. *The Journal of physiology*, 590(Pt 19), pp.4789–800.
- Bischofberger, J. et al., 2006. Patch-clamp recording from mossy fiber terminals in hippocampal slices. *Nature Protocols*, 1(4), pp.2075–2081.
- Bliss, T. V & Lomo, T., 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of physiology*, 232(2), pp.331–356.
- Burgess, N., Maguire, E.A. & O’Keefe, J., 2002. The human hippocampus and spatial and episodic memory. *Neuron*, 35(4), pp.625–641.
- Burgoyne, R.D. & Barclay, J.W., 2002. Splitting the quantum: Regulation of quantal release during vesicle fusion. *Trends in Neurosciences*, 25(4), pp.176–178.
- del Castillo, J. & Katz, B., 1954. The effect of magnesium on the activity of motor nerve endings. *The Journal of physiology*, 124(3), pp.553–559.
- Del Castillo, J. & Katz, B., 1954. Quantal Components of the End-Plate Potential. *Journal of Physiology Physiol*, 124, pp.560–573.
- Chen, G., Harata, N.C. & Tsien, R.W., 2004. Paired-pulse depression of unitary quantal amplitude at single hippocampal synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(4), pp.1063–1068.

## Referencias

- Clements, J.D., 1990. A statistical test for demonstrating a presynaptic site of action for a modulator of synaptic amplitude. *Journal of Neuroscience Methods*, 31(1), pp.75–88.
- Clements, J.D., 2003. Variance-mean analysis: A simple and reliable approach for investigating synaptic transmission and modulation. *Journal of Neuroscience Methods*, 130(2), pp.115–125.
- Clements, J.D. & Bekkers, J.M., 1997. Detection of spontaneous synaptic events with an optimally scaled template. *Biophysical journal*, 73(1), pp.220–9.
- Clements, J.D. & Silver, R.A., 2000. Unveiling synaptic plasticity: A new graphical and analytical approach. *Trends in Neurosciences*, 23(3), pp.105–113.
- Contractor, A., Swanson, G. & Heinemann, S.F., 2001. Kainate receptors are involved in short- and long-term plasticity at mossy fiber synapses in the hippocampus. *Neuron*, 29(1), pp.209–216.
- Cossart, R. et al., 2002. Quantal release of glutamate generates pure kainate and mixed AMPA/kainate EPSCs in hippocampal neurons. *Neuron*, 35(1), pp.147–159.
- Debanne, D. et al., 1996. Paired-pulse facilitation and depression at unitary synapses in rat hippocampus: quantal fluctuation affects subsequent release. *The Journal of physiology*, 491 ( Pt 1(1996), pp.163–176.
- Dityatev, A.E. et al., 2003. Combining principal component and spectral analyses with the method of moments in studies of quantal transmission. *Journal of Neuroscience Methods*, 130(2), pp.173–199.
- Dobrunz, L.E., 2002. Release probability is regulated by the size of the readily releasable vesicle pool at excitatory synapses in hippocampus. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 20(3–5), pp.225–236.
- Dobrunz, L.E. & Stevens, C.F., 1997. Heterogeneity of release probability, facilitation, and depletion at central synapses. *Neuron*, 18(6), pp.995–1008.
- Dodge, F., Miledi, R. & Rahamimoff, R., 1969. Strontium and quantal release of transmitter at the neuromuscular junction. *The Journal of physiology*, 200(1), pp.267–283.
- Dodge, F. & Rahamimoff, R., 1967. Co-operative action a calcium ions in transmitter

## Referencias

- release at the neuromuscular junction. *Journal of Physiology*, 193(2), pp.419–432.
- Edwards, R.H., 2007. The Neurotransmitter Cycle and Quantal Size. *Neuron*, 55(6), pp.835–858.
- Eichenbaum, H., 2004. Hippocampus: Cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory. *Neuron*, 44(1), pp.109–120.
- Eichenbaum, H. et al., 1999. The hippocampus, memory, and place cells: Is it spatial memory or a memory space? *Neuron*, 23(2), pp.209–226.
- Evstratova, A. & Tóth, K., 2014. Information processing and synaptic plasticity at hippocampal mossy fiber terminals. *Frontiers in cellular neuroscience*, 8(February), p.28.
- Faber, D.S. & Korn, H., 1991. Applicability of the coefficient of variation method for analyzing synaptic plasticity. *Biophys J*, 60(5), pp.1288–1294.
- Farfel, M. et al., 2009. Equal Numbers of Neuronal and Nonneuronal Cells Make the Human Brain an Isometrically Scaled-Up Primate Brain. *The Journal of Comparative Neurology*, 541(June 2008), pp.532–541.
- Fioravante, D. & Regehr, W.G., 2011. Short-term forms of presynaptic plasticity. *Current Opinion in Neurobiology*, 21(2), pp.269–274.
- Funabashi, K. et al., 2010. Accelerated Ca entry by membrane hyperpolarization due to Ca<sup>-</sup>activated K channel activation in response to histamine in chondrocytes. , pp.786–797.
- Geiger, J.R.P. & Jonas, P., 2000. Dynamic control of presynaptic Ca<sup>2+</sup> inflow by fast-inactivating K<sup>+</sup> channels in hippocampal mossy fiber boutons. *Neuron*, 28(3), pp.927–939.
- Geppert, M. et al., 1994. Synaptotagmin I: A major Ca<sup>2+</sup> sensor for transmitter release at a central synapse. *Cell*, 79(4), pp.717–727.
- Goda, Y. & Stevens, C.F., 1994. Two components of transmitter release at a central synapse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(26), pp.12942–12946.
- Guillery, R.W., 2005. Observations of synaptic structures: origins of the neuron doctrine and its current status. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 360(1458), pp.1281–1307.

## Referencias

- Gundlfinger, A., Bischofberger, J., et al., 2007. Adenosine modulates transmission at the hippocampal mossy fibre synapse via direct inhibition of presynaptic calcium channels. *The Journal of physiology*, 582(Pt 1), pp.263–277.
- Gundlfinger, A., Leibold, C., et al., 2007. Differential modulation of short-term synaptic dynamics by long-term potentiation at mouse hippocampal mossy fibre synapses. *The Journal of physiology*, 585(Pt 3), pp.853–65.
- Guzman, S.J., Schlögl, A. & Schmidt-Hieber, C., 2014. Stimfit: quantifying electrophysiological data with Python. *Frontiers in neuroinformatics*, 8(February), p.16.
- Hablitz, J.J. & Johnston, D., 1981. Endogenous nature of spontaneous bursting in hippocampal pyramidal neurons. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 1(4), pp.325–334.
- Harris, K.M. & Weinberg, R.J., 2012. Ultrastructure of Synapses in the Mammalian Brain. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(5), pp.7–38.
- Hemond, P. et al., 2009. The membrane response of hippocampal CA3b pyramidal neurons near rest: Heterogeneity of passive properties and the contribution of hyperpolarization-activated currents. *Neuroscience*, 160(2), pp.359–370.
- Henze, D.A. et al., 2002. Giant miniature EPSCs at the hippocampal mossy fiber to CA3 pyramidal cell synapse are monoquantal. *Journal of Neurophysiology*, 87(1), pp.15–29.
- Henze, D.A., Urban, N.N. & Barrionuevo, G., 2000. The multifarious hippocampal mossy fiber pathway: A review. *Neuroscience*, 98(3), pp.407–427.
- Hess, G., Kuhnt, U. & Voronin, L.L., 1987. Quantal analysis of paired-pulse facilitation in guinea pig hippocampal slices. *Neuroscience Letters*, 77(2), pp.187–192.
- Huang, Y.Y. & Kandel, E.R., 1996. Modulation of both the early and the late phase of mossy fiber LTP by the activation of beta-adrenergic receptors. *Neuron*, 16(3), pp.611–617.
- Isaacson, J.S. & Walmsley, B., 1995. Counting quanta: Direct measurements of transmitter release at a central synapse. *Neuron*, 15(4), pp.875–884.
- Jackman, S.L. & Regehr, W.G., 2017. The Mechanisms and Functions of Synaptic

## Referencias

- Facilitation. *Neuron*, 94(3), pp.447–464.
- Jackson, M.B., Konnerth, a & Augustine, G.J., 1991. Action potential broadening and frequency-dependent facilitation of calcium signals in pituitary nerve terminals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(2), pp.380–4.
- Jaffe, D.B. & Gutiérrez, R., 2007. Mossy fiber synaptic transmission: communication from the dentate gyrus to area CA3. *Progress in Brain Research*, 163.
- Johnston, D. et al., 1996. ACTIVE PROPERTIES OF NEURONAL DENDRITES. *Annual Review of Neuroscience*, 19(1), pp.165–186.
- Johnston, D., 1981. Passive cable properties of hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 1(1), pp.41–55.
- Jonas, P., Major, G. & Sakmann, B., 1993. Quantal Components of Unitary EPSCs at the Mossy Fibre Synapse on CA3 Pyramidal Cells of Rat Hippocampus. *The Journal of physiology*, 472, pp.615–63.
- Kampa, B.M., Letzkus, J.J. & Stuart, G.J., 2007. Dendritic mechanisms controlling spike-timing-dependent synaptic plasticity. *Trends in Neurosciences*, 30(9), pp.456–463.
- Katz, B. & Miledi, R., 1966a. Input-Output Relation of a single synapse. *Nature*, 212(Dec 10), pp.1242–1245.
- Katz, B. & Miledi, R., 1966b. Input Output Relation of a Single Synapse. *Nature*.
- Katz, B. & Miledi, R., 1965. The Effect of Calcium on Acetylcholine Release from Motor Nerve Terminals. *Proceedings of the Royal Society*, 161(985).
- Kerchner, G. a & Nicoll, R.A., 2008. Silent synapses and the emergence of a postsynaptic mechanism for LTP. *Nature reviews. Neuroscience*, 9(11), pp.813–25.
- von Kitzing, E., Jonas, P. & Sakmann, B., 1994. Quantal analysis of excitatory postsynaptic currents at the hippocampal mossy fiber-CA3 pyramidal cell synapse. *Advances in second messenger and phosphoprotein research*, 29, pp.235–60.
- Kobayashi, K., Manabe, T. & Takahashi, T., 1996. Presynaptic long-term depression at the hippocampal mossy fiber-CA3 synapse. *Science (New York, N.Y.)*, 273(5275), pp.648–50.

## Referencias

- Koch, C., 1997. Computation and the single neuron. *Nature*, 385(6613), pp.207–210.
- Koch, C., Rapp, M. & Segev, I., 1996. A brief history of time (constants). *Cerebral Cortex*, 6, pp.93–101.
- Koch, C. & Segev, I., 2000. The role of single neurons in information processing. *Nature neuroscience*, 3 Suppl, pp.1171–7.
- Korn, H. & Faber, D.S., 1991. Quantal analysis and synaptic efficacy in the CNS. *Trends in Neurosciences*, 14(10), pp.439–445.
- Lawrence, J.J., Grinspan, Z.M. & McBain, C.J., 2004. Quantal transmission at mossy fibre targets in the CA3 region of the rat hippocampus. *The Journal of physiology*, 554(Pt 1), pp.175–93.
- Lazarewicz, M.T., Migliore, M. & Ascoli, G.A., 2002. A new bursting model of CA3 pyramidal cell physiology suggests multiple locations for spike initiation. *BioSystems*, 67(1–3), pp.129–137.
- Li, C., Davletov, B.A. & Südhof, T.C., 1995. Protein Chemistry and Structure : Distinct Ca<sup>2+</sup> and Sr<sup>2+</sup> Binding Properties of Synaptotagmins : DEFINITION OF CANDIDATE Ca<sup>2+</sup> SENSORS FOR THE FAST AND SLOW COMPONENTS OF NEUROTRANSMITTER RELEASE Cai Li , Bazbek A . Davletov and Thomas C . *The Journal of biological chemistry*, 270(42).
- Lin, R.C. & Scheller, R.H., 2000. Mechanisms of Synaptic Vesicle Exocytosis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 16(1), pp.19–49.
- Lomo, T., 2003. The discovery of long-term potentiation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 358(1432), pp.617–620.
- Luscher, C. & Malenka, R.C., 2012. NMDA Receptor-Dependent Long-Term Potentiation and Long-Term Depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(6), pp.a005710–a005710.
- Magee, J.C., 2000. Dendritic integration of excitatory synaptic input. *Nature reviews. Neuroscience*, 1(3), pp.181–190.
- Magee, J.C. & Johnston, D., 1995. Synaptic activation of voltage-gated channels in the dendrites of hippocampal pyramidal neurons. *Science (New York, N.Y.)*, 268(5208), pp.301–4.

## Referencias

- Di Maio, V., 2008. Regulation of information passing by synaptic transmission: A short review. *Brain Research*, 1225, pp.26–38.
- Makara, J.K. & Magee, J.C., 2013. Variable dendritic integration in hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Neuron*, 80(6), pp.1438–1450.
- Malenka, R.C. & Nicoll, R.A., 1997. Silent synapses speak up. *Neuron*, 19(3), pp.473–476.
- Martin, A.R., 1966. Quantal Nature of Synaptic Transmission. *Physiological Reviews*, 46(1), pp.51–66.
- Martin, E.A. et al., 2017. Examining Hippocampal Mossy Fiber Synapses by 3D Electron Microscopy in Wildtype and Kirrel3 Knockout Mice 3D EM of mossy fiber synapses in Kirrel3 KO mice. , 10(June), pp.88–17.
- Mayford, M., Siegelbaum, S.A. & Kandel, E.R., 2012. Synapses and memory storage. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(6), pp.1–18.
- McGaugh, J.L., 2000. Memory--a century of consolidation. *Science*, 287(5451), pp.248–251.
- Miledi, R. & Katz, B., 1968. The role of calcium in neuromuscular facilitation. *The Journal of physiology*, 195(2), pp.481–492.
- Miledi, R. & Katz, B., 1967. The timing of calcium action during neuromuscular transmission. *The Journal of physiology*, 189(3), pp.535–544.
- Moore, K.A., Nicoll, R.A. & Schmitz, D., 2003. Adenosine gates synaptic plasticity at hippocampal mossy fiber synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(24), pp.14397–14402.
- Neves, G., Cooke, S.F. & Bliss, T. V., 2008. Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nat Rev Neurosci*, 9(1), pp.65–75.
- Nicoll, R.A., 2017. A Brief History of Long-Term Potentiation. *Neuron*, 93(2), pp.281–290.
- Nicoll, R. a & Schmitz, D., 2005. Synaptic plasticity at hippocampal mossy fibre synapses. *Nature reviews. Neuroscience*, 6(11), pp.863–76.
- O’Keefe, J. & Dostrovsky, J., 1971. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Research*, 34(1),

## Referencias

pp.171–175.

- Oleskevich, S., Clements, J. & Walmsley, B., 2000. Release probability modulates short-term plasticity at a rat giant terminal. *The Journal of physiology*, 524 Pt 2, pp.513–523.
- Palay, S.L. & Chan-Palay, V., 2011. General Morphology of Neurons and Neuroglia. *Comprehensive Physiology*, pp.5–37.
- Prescott, S.A. & Sejnowski, T.J., 2008. Spike-Rate Coding and Spike-Time Coding Are Affected Oppositely by Different Adaptation Mechanisms. *Journal of Neuroscience*, 28(50), pp.13649–13661.
- Rall, W., 1977. Core conductor theory and cable properties of neurons. *Handbook of Physiology - The Nervous System I*, pp.39–97.
- Rall, W., 1969. Time constants and electrotonic length of membrane cylinders and neurons. *Biophysical journal*, 9(12), pp.1483–508.
- Rebola, N., Carta, M. & Mulle, C., 2017. Operation and plasticity of hippocampal CA3 circuits: implications for memory encoding. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(1), pp.208–220.
- Reid, C.A., 2004. Optical Quantal Analysis Indicates That Long-Term Potentiation at Single Hippocampal Mossy Fiber Synapses Is Expressed through Increased Release Probability, Recruitment of New Release Sites, and Activation of Silent Synapses. *Journal of Neuroscience*, 24(14), pp.3618–3626.
- Rodríguez-Moreno, A. & Sihra, T.S., 2004. Presynaptic kainate receptor facilitation of glutamate release involves protein kinase A in the rat hippocampus. *The Journal of Physiology*, 557(Pt 3), pp.733–45.
- Rollenhagen, A. & Lübke, J.H.R., 2010. The mossy fiber bouton: The “common” or the “unique” synapse? *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 2(MAR), pp.1–9.
- Rosenmund, C., Clements, J.D. & Westbrook, G.L., 1993. Nonuniform probability of glutamate release at a hippocampal synapse. *Science*, 262(5134), pp.754–7.
- Salin, P.A. et al., 1996. Distinct short-term plasticity at two excitatory synapses in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(23), pp.13304–9.

## Referencias

- Sara, Y. et al., 2005. An isolated pool of vesicles recycles at rest and drives spontaneous neurotransmission. *Neuron*, 45(4), pp.563–573.
- Sarel, A. et al., 2017. Vectorial representation of spatial goals in the hippocampus of bats. *Science*, 355(6321), pp.176–180.
- Sastry, B.R. & Bhagavatula, L.S., 1996. Quantal release of transmitter at a central synapse. *Neuroscience*, 75(4), pp.987–992.
- Schneggenburger, R., Sakaba, T. & Neher, E., 2002. Vesicle pools and short-term synaptic depression: Lessons from a large synapse. *Trends in Neurosciences*, 25(4), pp.206–212.
- Schwindt, P., O, J.A. & Crill, W., 1997. Neurons From Layer 5 of Rat Sensorimotor Cortex Quantitative Analysis of Firing Properties of Pyramidal Quantitative Analysis of Firing Properties of Pyramidal Neurons From Layer 5 of Rat Sensorimotor Cortex. *J Neurophysiol Journal of Neurophysiology at Virginia Commonwealth Univ on*, 77, pp.2484–2498.
- Silver, R.A., 2003. Estimation of nonuniform quantal parameters with multiple-probability fluctuation analysis: Theory, application and limitations. *Journal of Neuroscience Methods*, 130(2), pp.127–141.
- Silver, R.A., 2010. Neuronal arithmetic. *Nat Rev Neurosci*, 11(7), pp.474–489.
- Silver, R.A., Momiyama, A. & Cull-Candy, S.G., 1998. Locus of frequency-dependent depression identified with multiple-probability fluctuation analysis at rat climbing fibre-Purkinje cell synapses. *The Journal of physiology*, 510 ( Pt 3, pp.881–902.
- Sjöström, P.J. & Nelson, S.B., 2002. Spike timing, calcium signals and synaptic plasticity. *Current Opinion in Neurobiology*, 12(3), pp.305–314.
- Smith, S.J. & Augustine, G.J., 1988. Calcium ions, active zones and synaptic transmitter release. *Trends in Neurosciences*, 11(10), pp.458–464.
- Spruston, N., 2008. Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration. *Nature reviews. Neuroscience*, 9(3), pp.206–221.
- Spruston, N., Jaffe, D.B. & Johnston, D., 1994. Dendritic attenuation of synaptic potentials and currents: the role of passive membrane properties. *Trends in Neurosciences*, 17(4), pp.161–166.
- Squire, L.R., 2009. The Legacy of Patient H.M. for Neuroscience. *Neuron*, 18(9),

## Referencias

pp.1199–1216.

Stevens, C.F. & Sullivan, J.M., 1998. Regulation of the readily releasable vesicle pool by protein kinase C. *Neuron*, 21(4), pp.885–893.

Stevens, C.F. & Wang, Y., 1995. Facilitation and depression at single central synapses. *Neuron*, 14(4), pp.795–802.

Südhof, T.C., 2012. Calcium control of neurotransmitter release. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(1).

Südhof, T.C., 2013. Neurotransmitter release: The last millisecond in the life of a synaptic vesicle. *Neuron*, 80(3), pp.675–690.

Südhof, T.C. & Rizo, J., 2011. Synaptic vesicle exocytosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3(12).

Tang, A.-H. et al., 2016. A trans-synaptic nanocolumn aligns neurotransmitter release to receptors. *Nature*, 536(7615), pp.210–4.

Thanawala, M.S. & Regehr, W.G., 2013. Presynaptic Calcium Influx Controls Neurotransmitter Release in Part by Regulating the Effective Size of the Readily-Releasable Pool. *Journal of Neuroscience*, 33(11), pp.4625–4633.

Tong, G., Malenka, R.C. & Nicoll, R.A., 1996. Long-term potentiation in cultures of single hippocampal granule cells: A presynaptic form of plasticity. *Neuron*, 16(6), pp.1147–1157.

Toth, K. et al., 2000. Differential mechanisms of transmission at three types of mossy fiber synapse. *The Journal of neuroscience*, 20(22), pp.8279–89.

Urban, N.N., Henze, D.A. & Barrionuevo, G., 2001. Revisiting the Role of the Hippocampal Mossy Fiber Synapse. *Hippocampus*, 11(4), pp.408–417.

Voronin, L.L. et al., 2004. Postsynaptic depolarisation enhances transmitter release and causes the appearance of responses at “silent” synapses in rat hippocampus. *Neuroscience*, 126(1), pp.45–59.

Voronin, L.L. & Cherubini, E., 2004. “Deaf, mute and whispering” silent synapses: their role in synaptic plasticity. *The Journal of physiology*, 557, pp.3–12.

Voronin, L.L. & Cherubini, E., 2003. “Presynaptic silence” may be golden. *Neuropharmacology*, 45(4), pp.439–449.

## Referencias

- Vyleta, N.P. & Jonas, P., 2014. Loose coupling between Ca<sup>2+</sup> channels and release sensors at a plastic hippocampal synapse. *Science (New York, N.Y.)*, 343(6171), pp.665–70.
- Waldeck, R.F., Pereda, A. & Faber, D.S., 2000. Properties and plasticity of paired-pulse depression at a central synapse. *Journal of Neuroscience*, 20(14), pp.5312–5320.
- Walmsley, B., 1995. Interpretation of “quantal” peaks in distributions of evoked synaptic transmission at central synapses. *Proceedings of the Royal Society*, 261(261), pp.245–250.
- Whitlock, J.R. et al., 2006. Learning Induces Long Term Potentiation in the Hippocampus. *Science*, 313(5790), pp.1093–1097.
- Xu-Friedman, M.A. & Regehr, W.G., 1999. Presynaptic Strontium Dynamics and Synaptic Transmission. *Biophysical Journal*, 76(4), pp.2029–2042.
- Xu-Friedman, M.A. & Regehr, W.G., 2000. Probing fundamental aspects of synaptic transmission with strontium. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 20(12), pp.4414–22.
- Zador, A.M., 2000. The basic unit of computation. *Nature neuroscience*, 3 Suppl(november), p.1167.
- Zucker, R.S. & Regehr, W.G., 2002. Short-Term Synaptic Plasticity. *Annual Review of Physiology*, 64(1), pp.355–405.

## Referencias