



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

Sede Sur

Departamento de Farmacobiología

Maestría en Neurofarmacología y Terapéutica Experimental

**Caracterización del locus que subyace a la potenciación sináptica
por activación del receptor TrkB en neuronas piramidales del
hipocampo**

Tesis que presenta

QFBT Luis Roberto Olvera Guillen

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

En la especialidad de

Neurofarmacología y Terapéutica Experimental

Director de la tesis

Dr. Emilio Javier Galván Espinosa

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 9 del Departamento de Farmacobiología del Centro de Investigaciones de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través del proyecto CB-2016-280607 a nombre del Dr. Emilio J. Galván y de la beca de posgrado con numero.....

Índice

Abreviaturas	i
Índice de tablas y figuras	iii
Resumen.....	v
Abstract.....	vi
1. Introducción.....	1
1.1 Anatomía del hipocampo	1
1.1.1 Circuito de transmisión sináptica en el hipocampo	3
1.2 Sinapsis fibra musgosa-neurona piramidal CA3.....	5
1.3 Plasticidad sináptica	9
1.3.1 Plasticidad a corto plazo	10
1.3.2 Plasticidad a largo plazo	12
1.4 Receptor con actividad tirosina cinasa.....	15
1.4.1 Vía de las proteínas cinasas activadas por mitógeno.....	17
1.4.2 Vía de la fosfolipasa C gamma	17
1.4.3 Vía del fosfatidilinositol-3-OH cinasa.....	17
1.5 El receptor TrkB y su relación con patologías humanas	19
1.6 El receptor TrkB y la potenciación a largo plazo en el hipocampo	22
2. Justificación	25
3. Hipótesis.....	25
4. Objetivos.....	25
4.1 Objetivo general.....	25
4.2 Objetivos específicos.....	25
5. Materiales y métodos	26
5.1 Declaración ética.....	26
5.2 Animales.....	26
5.3 Obtención de rebanadas de cerebro.....	26
5.4 Registros electrofisiológicos	27
5.4.1 Propiedades intrínsecas de neuronas piramidales de CA3.....	27
5.4.2 Transmisión sináptica de la FM – NP CA3.....	28
5.4.3 Análisis estadístico.....	29
6. Resultados	30
6.1 Identificación de neuronas piramidales de CA3	30

6.2	Propiedades electrofisiológicas de los potenciales postsinápticos excitadores evocados en las fibras musgosas.....	34
6.3	La activación del receptor TrkB con 7,8-DHF induce potenciación sináptica. 35	
6.4	El bloqueo farmacológico del receptor TrkB suprime la potenciación del FM – EPSC.	40
6.5	La potenciación mediada por 7,8-DHF requiere un componente postsináptico.....	42
7.	Discusión.....	44
8.	Conclusión.....	49
	Referencias	50

Abreviaturas

7,8- DHF:	7,8-dihidroxi flavona
AMPA:	Ácido α -amino-3-hidroxi-5metilo-4-isoxazolpropiónico
ANA-12:	N-[2-[[Hexahidro-2-oxo-1Hazepin-3-yl) amino]carbonil]fenil]tiofeno-2-carboxamida
BDNF:	Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro
CA1, 2 y 3:	Cornu ammonis 1, 2 y 3
CE50:	Concentración efectiva 50
DAG:	Diacilglicerol
DCG-IV:	(2S,2'R,3'R)-2-(2',3'-dicarboxiciclopropil)glicina
EE:	Electrodo de estimulación
ELT:	Epilepsia del lóbulo temporal
ELTM:	Epilepsia del lóbulo temporal mesial
E_{max}:	Efecto máximo
EPSC:	Corriente postsináptica excitadora
EPSPs:	Potencial excitador postsináptico
ER:	Electrodo de estimulación
FMs:	Fibras musgosas
GABA:	Ácido gamma-amino butírico
GD:	Giro dentado
IP₃:	Inositol trifosfato
LTP:	Potenciación a largo plazo
MAPK:	Proteínas cinasas activadas por mitógeno

MGlurII:	Receptores metabotrópicos de glutamato tipo II
mGlurS:	Receptores metabotrópicos de glutamato
NMDA:	N-metil-D-Aspartato
NPs:	Neuronas piramidales
NT3:	Neurotrofina 3
NT4:	Neurotrofina 4
PDK1:	Proteína cinasa dependiente de fosfoinositido
PI3K:	Fosfoinositol-3-cinasa
PIP2:	Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato
PLC-Y:	Fosfolipasa C gamma
PMR:	Potencial de membrana en reposo
PTP:	Potenciación post tetánica
RN:	Resistencia de entrada
SL:	<i>Stratum lucidum</i>
SL-M:	<i>Stratum lacunosum-moleculare</i>
SO:	<i>Stratum oriens</i>
SP:	<i>Stratum pyramidale</i>
SR:	<i>Stratum radiatum</i>
VP:	Vía perforante

Índice de tablas y figuras

Figura 1. Sección horizontal de hipocampo de rata.....	2
Figura 2. Circuito trisináptico.....	4
Figura 3. Sinapsis de fibra musgosa (FM) con excrecencia espinosa (S).....	5
Figura 4. Efectos del DCG-IV sobre la sinapsis de la fibra musgosa-CA3.....	7
Figura 5. Representación esquemática de la sinapsis entre las extensiones filopodiales y las dendritas de interneuronas.....	8
Figura 6. Registro de la actividad sináptica en rebanadas de hipocampo.....	10
Figura 7. Trazos representativos de facilitación por pulsos pareados en las sinapsis de fibra musgosa-CA3.....	11
Figura 8. Curso temporal de potenciación sináptica registrada en la sinapsis FMs-CA3.....	13
Figura 9. Principales vías de señalización activadas por el receptor TrkB.....	16
Figura 10. Inducción de potenciación a largo plazo por aplicación de estimulación eléctrica.....	23
Figura 11. Potencial de membrana en reposo de neuronas piramidales de CA3..	30
Figura 12. Resistencia de entrada de neuronas piramidales de CA3.....	31
Figura 13. Constante de tiempo de neuronas piramidales de CA3.....	32
Figura 14. Capacitancia membranal de neuronas piramidales de CA3.....	33
Figura 15. Esquema de estimulación y respuestas sinápticas de la región CA3 del hipocampo.....	34
Figura 16. Respuesta inducida por 7,8-DHF (10 μ M) en la sinapsis de FM – NP CA3.....	36
Figura 17. La aplicación extracelular de 7,8-DHF induce potenciación de la transmisión sináptica de manera concentración-dependiente.....	37
Figura 18. Curva concentración-respuesta inducida por 7,8-DHF en la vía de FMs – NPs CA3.....	39
Figura 19. La potenciación sináptica en la vía de FM – NP CA3 es dependiente de la activación del receptor TrkB.....	40

Figura 20. Inhibición de la potenciación sináptica en la vía de FM – NP CA3 por el ANA-12.....	41
Figura 21. Potenciación sináptica en la vía de FM – NP CA3 mediante mecanismos postsinápticos.....	43
Tabla 1. Grado de potenciación sináptica obtenida con las diferentes concentraciones de 7,8-DHF en la sinapsis de FM – NP CA3.....	38

Resumen

El factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) es una neurotrofina que ejerce sus efectos a través de la activación del receptor con actividad tirosina cinasa (TrkB). Ambos se encuentran ampliamente expresados en distintas áreas del sistema nervioso central, siendo el giro dentado y el área CA3 del hipocampo aquellas que expresan los niveles más altos de estos. En este trabajo se estudiaron los efectos de la activación del receptor TrkB en la transmisión sináptica entre fibra musgosa – neuronas piramidales de CA3 mediante registros de *patch-clamp* en modalidad de célula completa.

La perfusión del agonista exógeno de este receptor, el 7,8-DHF, indujo potenciación sináptica de manera concentración-dependiente en esta sinapsis. Junto a esto, se encontró que el bloqueo farmacológico del receptor TrkB con su antagonista específico, ANA-12 (50 μ M), suprimió la potenciación mediada por 7,8-DHF. Contrario a la potenciación presináptica que desencadena el 7,8-DHF al ser aplicado en el rango micromolar, se encontró que las concentraciones nanomolares activan un mecanismo postsináptico crítico para la inducción de potenciación.

En conclusión, nuestros resultados muestran que en las sinapsis de la fibra musgosa – neuronas piramidales de CA3 el locus de potenciación sináptica dependen de la magnitud de activación del TrkB.

Este trabajo aporta información novedosa sobre de los mecanismos intracelulares involucrados en procesos de plasticidad sináptica en la vía de las fibras musgosa – neuronas piramidales de CA3.

Abstract

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its receptor, the Tropomyosin receptor Kinase B (TrkB) receptor, are widely expressed in different areas of the central nervous system, with the higher concentrations in the region composed of the dentate gyrus and hippocampal area CA3.

In this work, we studied the effects of TrkB activation on the synaptic transmission of the mossy fiber - CA3 pyramidal neuron synapse. Whole-cell patch-clamp recordings were performed in acute hippocampal slices. Activation of TrkB with the specific agonist, 7,8-DHF induced a concentration-dependent, synaptic potentiation. Blockade of TrkB with the antagonist ANA-12 abolished the effects of 7,8-DHF. Contrary to the presynaptic potentiation that 7,8-DHF triggers when applied in the micromolar range, we found that nanomolar concentrations of 7,8-DHF activate a postsynaptic-mediated mechanism critical for the induction of synaptic potentiation.

In conclusion, our results show that in the mossy fiber - CA3 pyramidal neuron synapse, the loci of synaptic potentiation depend on the magnitude of TrkB activation. Whereas micromolar-mediated activation of TrkB receptors induces presynaptic potentiation, nanomolar-mediated activation of TrkB involves a postsynaptic locus of potentiation. We provide novel information regarding the intracellular mechanisms involved in the synaptic potentiation of the MF – CA3 synapse of the hippocampus.

1. Introducción

1.1 Anatomía del hipocampo

El hipocampo es una región del sistema nervioso central ubicado en la zona media del lóbulo temporal que participa en la formación de la memoria, aprendizaje e interacción social. Esta región, junto con el giro dentado (GD), el subiculum, el presubiculum, el parasubiculum y la corteza entorrinal, constituyen la formación hipocampal. En términos anatómicos, el hipocampo es una estructura en forma de “C” compuesta por 5 capas o estratos. La capa principal, el *stratum Pyramidale* (SP), contiene los somas de las células principales del hipocampo, las neuronas piramidales (NPs). Estas neuronas presentan arboles dendríticos extendidos en ambas direcciones de la capa, por lo que se les considera neuronas multipolares, atravesando los diferentes estratos del hipocampo. La capa principal, a su vez, se subdivide en tres regiones denominadas CA3, CA2 y CA1 (Fig. 1). En el *stratum oriens* (SO), región localizada por debajo del SP, se encuentran las dendritas basales de las NPs junto a distintos tipos de interneuronas inhibitorias. El *stratum lucidum* (SL), presente solo en el área CA3, es la capa inmediata al SP, donde corren los axones provenientes del GD y forman la sinapsis entre las fibras musgosas (FMs) y las dendritas apicales proximales de las NPs de CA3. El *stratum radiatum* (SR), localizado por encima del SL de CA3, contiene las dendritas apicales distales de las neuronas piramidales. En esta capa las NPs de CA3 se contactan mutuamente, dando origen a la red auto-asociativa de asociación. Cuando los axones de las NPs de CA3 salen de esta región y hacen contacto con las NPs de la región CA1, reciben el nombre de conexiones colaterales de Shaffer. Finalmente, la región más superficial del hipocampo es la formada por el *stratum lacunosum-moleculare* (SL-M), una región donde arriban los axones provenientes de la corteza entorrinal (Johnston & Amaral, 1998; Amaral & Lavenex, 2007).

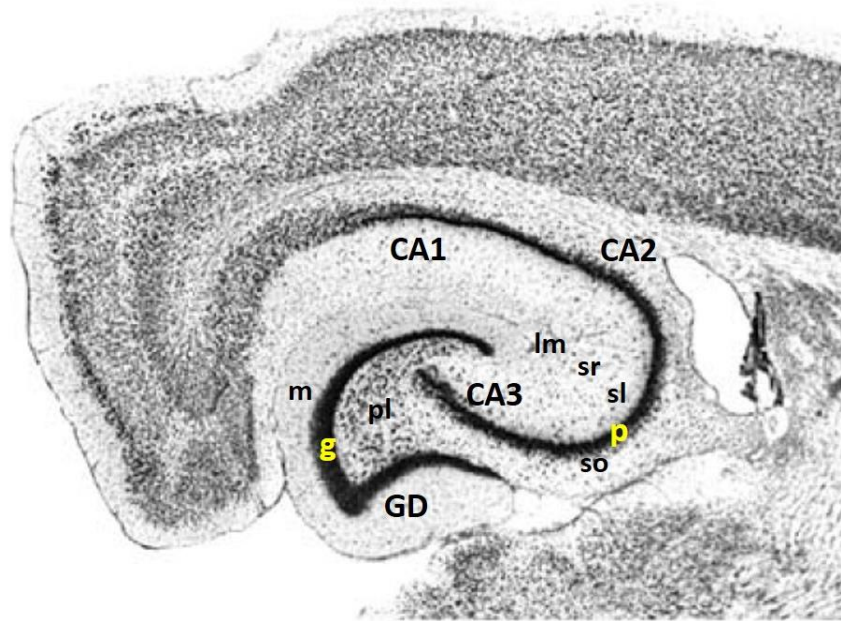


Figura 1. Sección horizontal de hipocampo de rata. Capas del giro dentado (GD): capa molecular (m), capa de células granulares (g) y capa de células polimórficas (pl), regiones propias del GD. Capas del hipocampo: *stratum oriens* (SO), *stratum pyramidale* (SP), *stratum lucidum* (SL), *stratum radiatum* (SR) y *stratum lacunosum-moleculare* (SL-M) (Modificado de Amaral & Lavenex 2007).

Si bien las NPs son el principal tipo celular, el hipocampo contiene un gran número de interneuronas. Estas células que liberan ácido γ -aminobutírico (GABA), el principal neurotransmisor inhibitorio del sistema nervioso central, pueden clasificarse con base en sus dianas sinápticas. Las interneuronas axo-axónicas forman sinapsis con el segmento inicial axónico de las neuronas piramidales ejerciendo modulación sobre el inicio de los potenciales de acción. Las interneuronas axo-somáticas hacen contacto con diversas regiones del soma influyendo su nivel general de excitabilidad, mientras que las interneuronas axo-dendríticas modulan tanto la región basal, media y distal de las dendritas de las NPs, facilitando o inhibiendo la integración dendrítica temporal y espacial (Amaral & Lavenex, 2007).

El GD es una estructura compuesta por tres capas. La capa principal (*stratum granulosum*) contiene los cuerpos celulares de las neuronas principales del GD, las células granulares, que poseen cuerpos esféricos con un diámetro promedio de 10 μm . La capa molecular (*stratum moleculare*), localizada por encima de la capa principal, se caracteriza por la ausencia de somas y es una región rica en dendritas

proximales de las células granulares y axones provenientes de la corteza entorrinal o vía perforante. Finalmente, la capa de células polimórficas, también conocida como *hilus*, una región que se ubica por debajo de las células granulares y contiene distintos tipos de células que inervan tanto NPs, interneuronas y neuronas del GD (Johnston & Amaral, 1998).

Los axones de las células granulares o FMs, convergen en el *hilus* y generan un tracto de axones que corre exclusivamente por el SL. En esta región, las FMs hacen sinapsis con las dendritas apicales de las NPs de CA3, generando así, la entrada principal excitadora a la región de CA3 (Henze, et al., 2000). Adicionalmente, de las FMs emergen una serie de protuberancias conocidas como extensiones filipodiales y los botones *en passant*, cuya función especializada es generar contactos sinápticos con interneuronas, dando origen así, al circuito de inhibición proactiva (Acsády et al., 1998). Si bien la anatomía celular en el hipocampo ha sido ampliamente estudiada, el circuito de conexiones entre los elementos sinápticos localizados en sus distintas capas, sigue revelando formas únicas de comunicación neuronal dependiente de los tipos celulares y tipos de conexión. El estudio de las formas de comunicación neuronal en la región CA3 mantiene su relevancia dada su participación en los procesos cognitivos en los que se participa esta región mesolímbica.

1.1.1 Circuito de transmisión sináptica en el hipocampo

El circuito básico de conexiones sinápticas en el hipocampo comienza con la entrada de información proveniente de la corteza entorrinal. En esta, las células piramidales localizadas en la capa II proyectan sus axones (vía perforante) al GD y dendritas distales de NPs de CA3 (Fig. 2). Los axones de las células granulares del GD componen el segundo relevo sináptico en este circuito, pues las FMs hacen sinapsis con dendritas proximales de las NPs e interneuronas. En el siguiente relevo, las NPs de CA3 realizan conexiones auto-asociativas en CA3, y con neuronas de CA1, que, como se mencionó previamente, representan las colaterales de Schaffer. Finalmente, las neuronas piramidales de CA1 envían sus axones de

vuelta a la corteza entorrinal y el subiculum (Johnston & Amaral, 1998; Amaral & Lavenex, 2007).

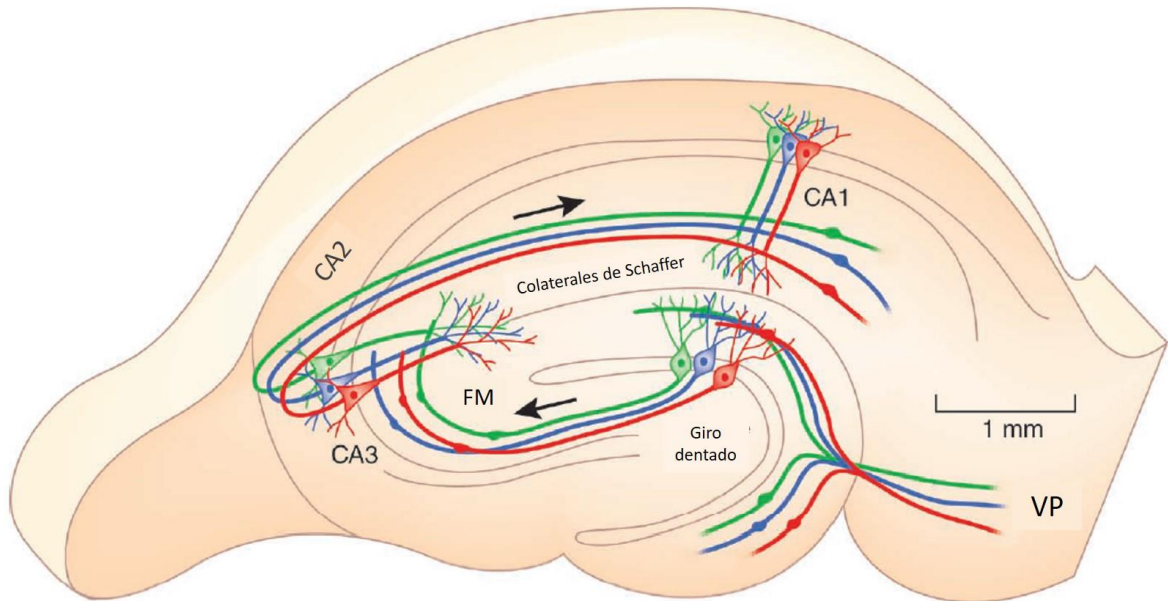


Figura 2. Circuito trisináptico. Representación esquemática de las vías tradicionales excitadoras del hipocampo y la dirección en el flujo de información: vía perforante (VP), fibra musgosa (FM) (Modificado de Moser, 2011).

1.2 Sinapsis fibra musgosa-neurona piramidal CA3

Las FMs son axones no mielinizados. Cada fibra musgosa forma aproximadamente 150 sinapsis con las células localizadas en el *hilus*, entre 11 a 18 sinapsis con las células piramidales de CA3 y de 40 a 50 contactos sinápticos con interneuronas localizadas en el SL (Henze et al., 2000).

Las FMs generan tres clases de contactos sinápticos dependiendo de sus células blanco. En primer lugar, se encuentran los botones musgosos, que hacen sinapsis con células musgosas del *hilus* y dendritas proximales de las NPs (sinapsis FM – CA3), siendo estas últimas el interés principal de este estudio. Cada botón musgoso, con un diámetro de entre 4 a 10 μm , hará sinapsis con unas estructuras multilobuladas postsinápticas llamadas excrescencias espinosas que surgen de las dendritas proximales de CA3 (Nicoll & Schmitz, 2005) (Fig. 3).

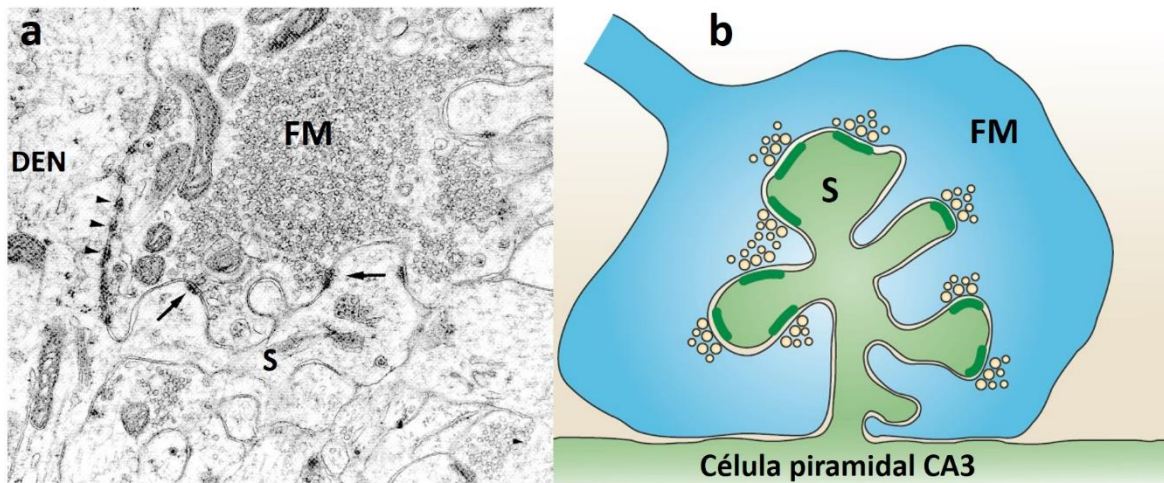


Figura 3. Sinapsis de fibra musgosa (FM) con excrescencia espinosa (S). (a) Micrografía electrónica de sinapsis entre fibra musgosa (FM) con excrescencia espinosa (S). Las flechas indican las distintas zonas activas en la sinapsis (Modificado de Henze et al. 2000). (b) Representación esquemática de sinapsis (Modificado de Nicoll & Schmitz 2005).

Esta sinapsis presenta características farmacológicas, morfológicas y fisiológicas únicas en el sistema nervioso central. Cada botón musgoso cuenta con múltiples sitios activos, 20 sitios de liberación en promedio por sinapsis (Rebola et al., 2017),

en donde el neurotransmisor principal liberado es el glutamato. Los efectos postsinápticos de este neurotransmisor están mediados principalmente por receptores ionotrópicos tipo AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionato) y en menor proporción por receptores NMDA (ácido N-metil-D-aspartico) y receptores sensibles a kainato.

Además de los receptores ionotrópicos, existen receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs) ubicados a nivel pre- y postsináptico del complejo FM – CA3. Una característica importante de las FMs es la expresión de receptores metabotrópicos de glutamato tipo II (mGluR II). Estos receptores presinápticos se encuentran acoplados negativamente a la adenilato ciclasa e inhiben la producción de AMP cíclico junto a la disminución de la actividad de la proteína cinasa A (Ferraguti & Shigemoto, 2006). Su activación, suprime la liberación de glutamato presináptico e inhibe la transmisión excitadora.

En este sentido, la aplicación del agonista específico de los mGluRII, el fármaco DCG-IV, suprime la amplitud de los potenciales postsinápticos excitadores (EPSPs, por sus siglas en inglés, *excitatory postsynaptic potentials*) (Fig. 4) por un mecanismo que implica inhibición de entrada de Ca^{2+} y consecuentemente, supresión de la liberación de glutamato dependiente de Ca^{2+} (Kamiya & Ozawa, 1999; Yeckel et al., 1999).

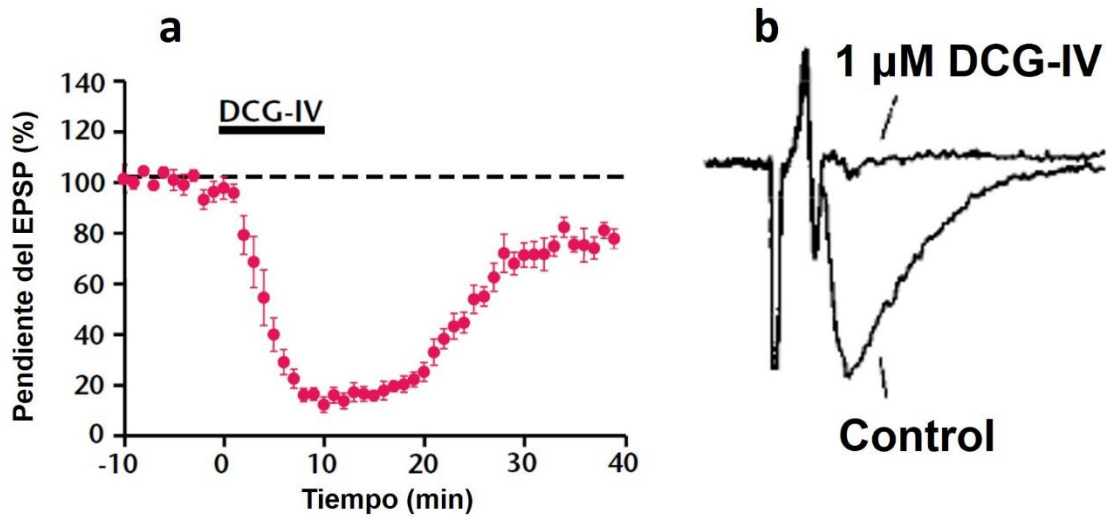


Figura 4. Efectos del DCG-IV sobre la sinapsis de la fibra musgosa-CA3. (a) Curso temporal de potenciales excitadores postsinápticos (EPSP). El DCG-IV ($1\mu\text{M}$) suprimió la actividad sináptica de forma reversible tras su aplicación (10 minutos) (Modificado de Yeckel et al., 1999). (b) Imagen representativa de registros extracelulares y su inhibición tras la aplicación de DCG-IV ($1\mu\text{M}$) (Modificado de Kamiya & Ozawa, 1999).

Como se mencionó previamente, de los botones de las FMs surgen pequeñas ramificaciones conocidas como extensiones filopodiales que, junto a otras zonas de contacto sináptico a lo largo del axón (botones *en passant*), forman las sinapsis con interneuronas (Fig. 5). Estas sinapsis generan entre 120 a 150 contactos con interneuronas del *hilus* y entre 40 a 50 contactos con interneuronas del área CA3 (Acsády et al., 1998).

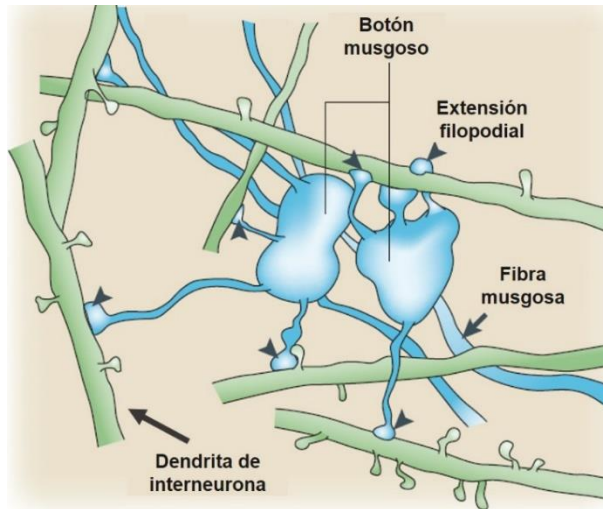


Figura 5. Representación esquemática de la sinapsis entre las extensiones filopodiales y las dendritas de interneuronas (Modificado de Nicoll & Schmitz, 2005).

1.3 Plasticidad sináptica

La plasticidad sináptica es la capacidad de las sinapsis para generar modificaciones en la fuerza con que se comunican. Estas modificaciones se presentan como un incremento o disminución en la fuerza de la transmisión sináptica mediada por neurotransmisores. (Tarigan, 2013; Leal et al., 2017). La evidencia experimental acumulada sugiere que la base neurofisiológica del aprendizaje y la memoria se origina en la capacidad celular de modificar de manera transitoria o persistente, la fuerza de la transmisión sináptica, proceso referido como plasticidad sináptica.

Una de las técnicas más utilizadas para estudiar plasticidad neuronal es el registro electrofisiológico en rebanadas de cerebro frescas que contengan las áreas o sinapsis de interés. Los estudios de plasticidad sináptica se han validado y coinciden en sus resultados tanto *ex vivo* como *in vivo*. En los estudios *ex vivo* de plasticidad sináptica, la metodología consiste en aplicar estímulos eléctricos a un conjunto de axones o fibras que hacen sinapsis con neuronas de una zona en particular. La actividad generada entre el estímulo eléctrico y la respuesta inducida es un EPSPs (Fig. 6).

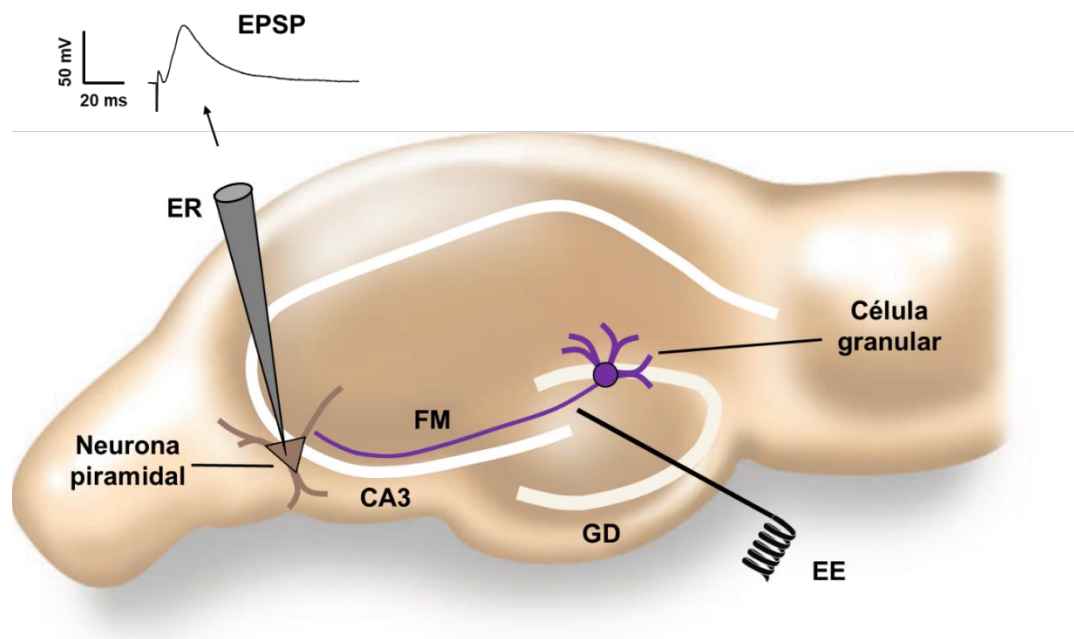


Figura 6. Registro de la actividad sináptica en rebanadas de hipocampo. La estimulación eléctrica se aplica en las fibras musgosas (FM) provenientes del giro dentado (GD) con la ayuda de un electrodo de estimulación (EE) y se registra la actividad en las neuronas del área de CA3 a través del electrodo de registro (ER). La respuesta obtenida es un EPSP (Modificado de Tarigan, 2013).

La mayoría de las sinapsis hipocampales expresan diversas formas de plasticidad ya sea por periodos cortos de tiempo (plasticidad a corto plazo) o de manera persistente (plasticidad a largo plazo) (Johnston & Amaral, 1998). En las sinapsis de FMs – CA3 predominan aquellos procesos de plasticidad que tienden a incrementar la fuerza de la transmisión sináptica tanto a corto como a largo plazo.

1.3.1 Plasticidad a corto plazo

La plasticidad a corto plazo es el cambio en la amplitud de los EPSPs durante un periodo de tiempo corto (desde milisegundos hasta unos pocos minutos). En la sinapsis FMs – CA3 se han descrito dos procesos de plasticidad a corto plazo, la facilitación por pulsos pareados y la potenciación post-tetánica. La facilitación por pulsos pareados es un fenómeno que se induce mediante la aplicación de dos pulsos eléctricos de igual intensidad y con un intervalo de tiempo muy corto entre cada uno de los pulsos (entre 50 a 100 ms). En este proceso se compara la amplitud de la respuesta postsináptica evocada por el segundo pulso eléctrico con respecto a la respuesta evocada por el primer pulso (Zucker & Regehr, 2002). El pulso pareado en la sinapsis FMs – CA3 se caracteriza por un incremento de hasta 300% en la segunda respuesta (Zalutsky & Nicoll, 1990; Fig. 7).

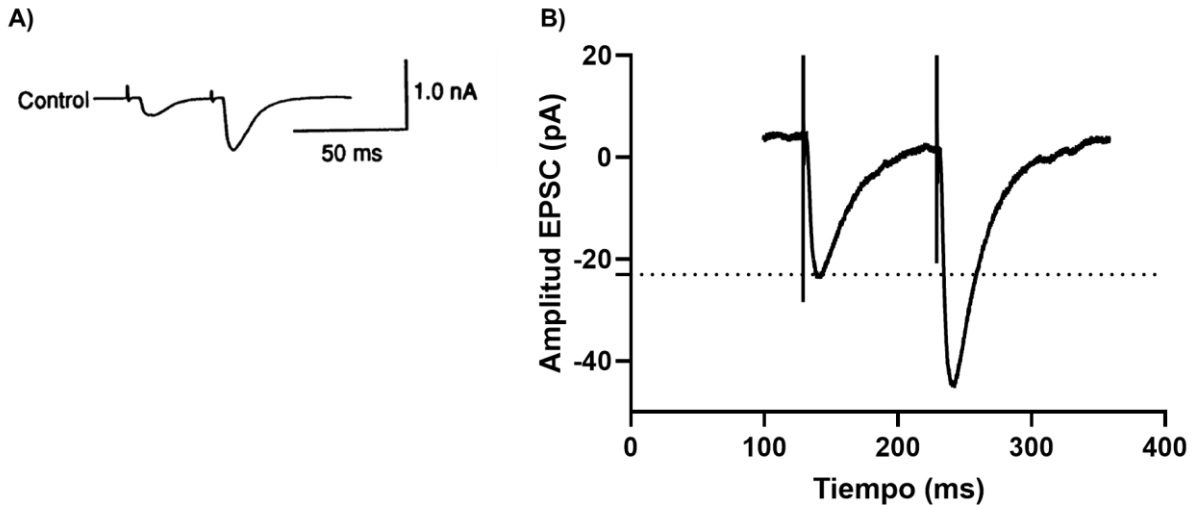


Figura 7. Trazos representativos de facilitación por pulsos pareados en las sinapsis de fibra musgosa-CA3. A) Ejemplo tomado de [Zalutsky & Nicoll \(1990\)](#), donde se exhibe la facilitación del primer pulso con respecto al segundo. B) Trazo tomado de los experimentos realizados en este trabajo sobre la estimulación de las FMs – NPs CA3. El grado de facilitación del segundo pulso con respecto al primero fue de 191 %.

El aumento de la amplitud de la segunda respuesta se debe parcialmente al aumento transitorio en la concentración de calcio en la presinápsis (botón musgoso). El primer pulso eléctrico causa la despolarización de la terminal presináptica, activando los canales que permean calcio al medio intracelular, promoviendo la fusión de vesículas excitóticas con la consecuente liberación de glutamato. Dado que el segundo estímulo eléctrico llega en un periodo muy corto, la subsecuente despolarización generará una entrada de calcio que se sumará al calcio residual del primer estímulo, generando así, mayor liberación de glutamato y por ende, un EPSP de mayor amplitud ([Zucker & Regehr, 2002](#)). A pesar de la lógica tras este planteamiento, en años recientes, la hipótesis del calcio residual ha sido cuestionada (refs).

Por otra parte, la potenciación posttetánica (PTP) es un incremento transitorio en la amplitud de las respuestas sinápticas tras la aplicación de un tren de alta estimulación. En la sinapsis FMs – CA3 este incremento puede ser de hasta 800% con respecto a una respuesta basal. La característica esencial de la PTP es que tras alcanzar su amplitud máxima, se inicia un decaimiento sostenido en la amplitud

que puede llevar a la respuesta sináptica a su valor basal (Urban & Barrionuevo, 1996; Fig.8). Como en el caso de facilitación por pulsos pareados de las FMs, la FM – PTP depende del incremento transitorio de calcio en la terminal presináptica y un incremento en la liberación de neurotransmisor (Zucker & Regehr, 2002).

1.3.2 Plasticidad a largo plazo

La plasticidad a largo plazo (LTP o *long-term potentiation* por sus siglas en inglés) se define como un incremento sostenido en la amplitud del potencial postsináptico excitador. Por otra parte, la disminución sostenida en la amplitud del EPSP se conoce como depresión a largo plazo (LTD por sus siglas en inglés, *long-term depression*) (Johnston & Amaral, 1998). Actualmente, la LTP es el principal candidato del mecanismo celular que subyace los procesos de memoria y aprendizaje dado que refleja la actividad en los mecanismos de almacenamiento de información en las sinapsis (Whitlock et al., 2006). La potenciación sináptica tiene componentes presinápticos, como lo es un incremento sostenido en la liberación de neurotransmisor, como postsinápticos, al provocar modificaciones sostenidas en la funcionalidad de receptores de neurotransmisor y su acoplamiento a la maquinaria intracelular de segundos mensajeros.

En las sinapsis FMs – CA3, la LTP (FMs – LTP) se induce tras la aplicación de estímulos eléctricos de alta frecuencia que mimetizan las descargas de potenciales de acción provenientes de las neuronas granulares del GD (Urban & Barrionuevo, 1996; Henze et al., 2000, Fig. 8)

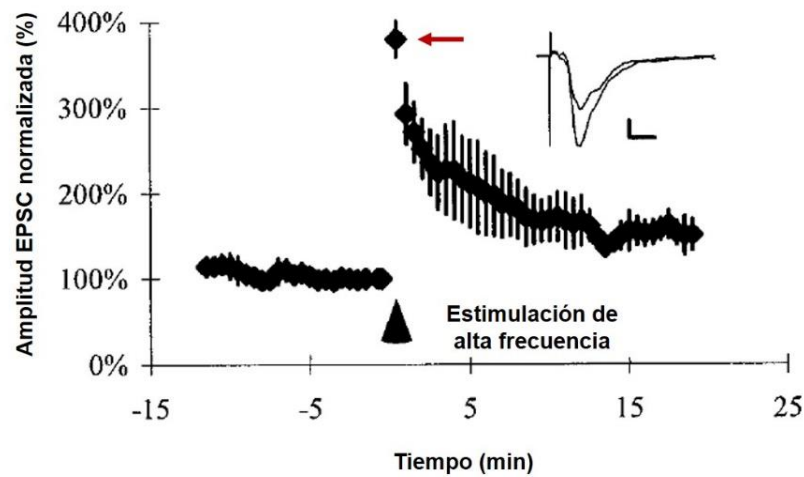


Figura 8. Curso temporal de potenciación sináptica registrada en la sinapsis FM-CA3. Tras la estimulación de alta frecuencia (triángulo) se observa el incremento en la amplitud de las corrientes postsinápticas. La flecha roja indica la potenciación postetánica observada tras el estímulo de alta frecuencia seguida de la LTP estable (incremento del $151 \pm 18\%$ con respecto al control) (Modificado de Urban & Barrionuevo 1996).

Harris y Cotman (1986) reportaron que la FM – LTP es independiente de la activación de los receptores NMDA, del potencial de membrana postsináptico y del incremento transitorio de calcio postsináptico. Sumado a esto se encontró una reducción de la facilitación de pulso pareado posterior al estímulo de alta frecuencia. La evidencia mostró que esta FM – LTP es inducida por el incremento en las corrientes de calcio y del incremento de AMP cíclico en las terminales presinápticas. Estos eventos incrementan la liberación de neurotransmisores, aumentando a la vez la amplitud de las respuestas postsinápticas.

Estos resultados indicaron que la inducción FM – LTP es un fenómeno presináptico, conclusión respaldada por diferentes investigaciones (Castillo et al., 1994; Langdon et al., 1995). Si bien estos hallazgos representaron un avance importante para comprender la LTP en esta sinapsis, una serie de trabajos posteriores demostraron que la plasticidad de esta sinapsis también requiere activación postsináptica.

Urban & Barrionuevo (1996) demostraron que al aplicar distintos patrones de estimulación se induce potenciación que requiere activación tanto de la presinápsis,

la postsinápsis o ambas. La estimulación breve de alta frecuencia (ocho pulsos a 100 Hz, repetidos ocho veces en intervalos de 5 segundos) produce FM - LTP que requiere la activación de elementos tanto presinápticos como postsinápticos. Mientras que la inducción de FM - LTP con estimulación larga de alta frecuencia (100 pulsos a 100 Hz, repetidos tres veces en intervalos de 10 segundos) solo requiere del elemento presináptico. [Yeckel et al. \(1999\)](#) encontraron que la potenciación inducida por ambos protocolos de estimulación dependía de incrementos en la concentración de calcio postsináptico al igual que la LTP en otras vías del hipocampo.

1.4 Receptor con actividad tirosina cinasa

Los procesos de LTP antes mencionados presentan la característica de ser modulables. En el SNC las principales moléculas neuromoduladoras son las neurotrofinas. Estas son una familia de proteínas secretadas entre las que se incluyen el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), el factor de crecimiento neuronal (NGF) y las neurotrofinas 3 (NT3) y 4 (NT4) (Airaksinen & Saarma, 2002; Leal et al., 2017). Las neurotrofinas ejercen sus efectos fisiológicos a través de la activación de dos receptores transmembranales. Cada una de estas proteínas se unirá al receptor de neurotrofinas p75 y a una de las isoformas del receptor con actividad tirosina cinasa (Trk). El BDNF y la neurotrofina 4 se unen preferencialmente a la isoforma TrkB, el NGF a TrkA y la neurotrofina 3 a TrkC (Chao, 2003).

El BDNF sobresale de entre todas las neurotrofinas mencionadas debido a sus altos niveles de expresión en el SNC y sus efectos moduladores a nivel sináptico. El BDNF, al igual que las otras neurotrofinas, es sintetizado como pre-pro-BDNF en el retículo endoplásmico. Esta forma inmadura es posteriormente convertida en pro-BDNF por la remoción de un péptido señal y con la ayuda de convertasas transformado a su forma madura (Leal et al., 2017).

El BDNF ejerce sus efectos tras la unión y activación de los receptores p75 y TrkB, siendo este último el receptor neurotrófico más ampliamente distribuido en el SNC. El receptor TrkB es una molécula glicosilada de 821 residuos de aminoácidos que contiene un péptido señal, dos grupos de cisteína, un motivo rico en leucina, un dominio de tirosina cinasa y una cola carboxi-terminal (Klein et al., 1989). Tras su unión, el BDNF induce la dimerización del receptor TrkB con la consecuente autofosforilación de múltiples residuos de tirosina en el dominio cinasa intracelular del receptor. Con base en el residuo específico de tirosina que se fosforile, el receptor TrkB puede activar tres vías de señalización. La fosforilación del residuo de tirosina en la posición 515 (Tyr 515) conduce a la activación de la cascada de señalización de las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK) y la vía de fosfatidilinositol-3-OH cinasa/Akt (PI3k/Akt). La fosforilación del residuo de tirosina

en la posición 816 (Tyr 816) provoca la unión de la fosfolipasa C gamma (PLC-γ), que resulta en la fosforilación y activación de esta lipasa (Minichiello, 2009, Fig 9.)

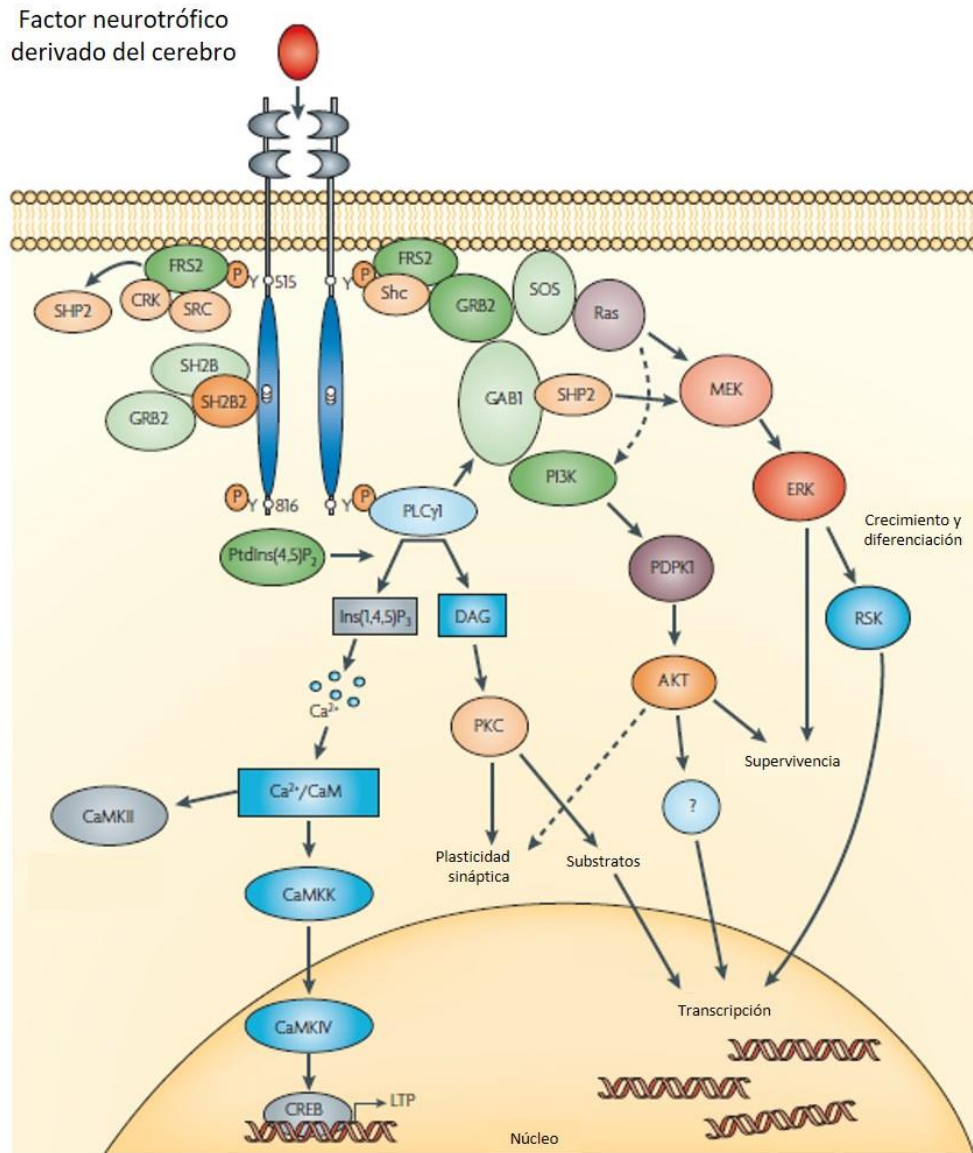


Figura 9. Principales vías de señalización activadas por el receptor TrkB. La unión del BDNF al receptor TrkB activa tres vías específicas de señalización que incluyen la vía de fosfatidilinositol-3-OH quinasa Akt (PI3K/Akt), la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK) y la vía de la fosfolipasa C gamma (PLC-γ). Quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK), fosfatidilinositol-3 quinasa (PI3K), fosfolipasa C gamma (PLCY1), inositol-1,4,5, trifosfato (Ins(1,4,5)P₃), diacilglicerol (DAG), proteína quinasa C (PKC), calcio calmodulina (Ca₂₊/CaM), proteínas quinasas dependientes de Ca₂₊/CaM (CaMKII, CaMKK y CaMKIV), elementos de respuesta a AMPc (CREB), sustrato 2 del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FRS2), proteína 2 unida al receptor del factor de crecimiento de fosfoinositol-1 (PDK1), Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PtdIns(4,5)P₂), quinasa ribosomal S6 (RSK) (Modificado de Minichiello, 2009).

1.4.1 Vía de las proteínas cinasas activadas por mitógeno

La vía de las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK) se inicia tras la fosforilación en el dominio intracelular del residuo de tirosina 515. La proteína adaptadora Shc se une a estos residuos fosforilados a través del dominio SH2 y es a su vez fosforilada en sus residuos de tirosina. La proteína Grb2 se unirá a estas tirosinas activando a una tercera proteína llamada SOS. Por su parte, SOS activará a la GTPasa monomérica Ras lo que culmina en la activación de la vía de las MAPK. Esta vía induce la supervivencia de las neuronas a través de la expresión de proteínas como CREB. Esta proteína activa la transcripción de genes esenciales en la supervivencia neuronal.

Con respecto a los procesos de potenciación sináptica, la activación de ERK, MAPK, acoplada a CREB es necesaria para la inducción de potenciación a largo plazo en las sinapsis del giro dentado. Además, se demostró que esta LTP es dependiente de BDNF en experimentos *in vivo* (Ying et al., 2002; Minichiello, 2009).

1.4.2 Vía de la fosfolipasa C gamma

La fosforilación del residuo de tirosina 816 en el dominio intracelular genera la activación de la fosfolipasa C gamma. Esta enzima hidroliza el fosfolípido 1-fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato generando dos productos, el diacilglicerol (DAG) y el inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃). El IP₃ se unirá a canales presentes en el retículo endoplásmico provocando la liberación de calcio y la activación de enzimas dependientes de este ion. Una de estas enzimas directamente relacionada en procesos de plasticidad sináptica en las sinapsis entre neuronas piramidales de CA3 y CA1 es la CaMKII (Tarigan, 2013; Leal et al., 2017).

1.4.3 Vía del fosfatidilinositol-3-OH cinasa

El reclutamiento de la proteína Shc, tras la fosforilación del residuo de tirosina 515, atraerá a la fosfoinositol-3-OH cinasa (PI3K). Esta cinasa actúa sobre el fosfolípido de membrana fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂) convirtiéndolo en fosfatidilinositol-

3,4,5-trifosfato (PIP₃). El PIP₃ activará a la cinasa dependiente de fosfoinositidos (PDK1) que a su vez activa a la cinasa PKB (también conocida como Akt). Esta última cinasa tiene un papel importante en la supervivencia de las neuronas centrales, al frenar los mecanismos de apoptosis y acelerar la síntesis de proteínas (Minichiello, 2009).

Estudios recientes han propuesto que la activación de esta vía de señalización, mediada por el receptor TrkB, constituye un mecanismo endógeno responsable de la neuroprotección de las neuronas piramidales de CA3 tras el daño isquémico (Tecuatl et al., 2018).

1.5 El receptor TrkB y su relación con patologías humanas

Los factores tróficos tienen una participación importante en procesos como la proliferación, desarrollo y supervivencia neuronal, así como en el mantenimiento homeostático del SNC y periférico. Sobresale el BDNF debido a que los sitios con los niveles más altos de expresión en todo el SNC son el GD y el hipocampo. Tanto el BDNF como su receptor endógeno, el TrkB, tienen un papel clave en la regulación del desarrollo sináptico, circuitos neuronales y su correcto funcionamiento en múltiples zonas del cerebro. Estudios previos demostraron que alteraciones en los niveles de BDNF durante el desarrollo alteran la formación de sinapsis excitadoras e inhibitoras en distintas regiones del cerebro, incluido el hipocampo [Shinoda et al. \(2019\)](#).

La lesión inducida por un accidente cerebrovascular isquémico se presenta ante la suspensión del suministro sanguíneo al cerebro. Este evento evita que las células del SNC reciban una cantidad adecuada de oxígeno provocando daño permanente y la muerte neuronal. La lesión inducida por isquemia en las neuronas piramidales del área CA3 del hipocampo presenta una mayor resistencia al daño en comparación con áreas como CA1. Se ha señalado que tras la activación del receptor TrkB protege a las neuronas piramidales del área de CA3 contra el daño isquémico. La privación a oxígeno-glucosa en rebanadas de hipocampo, un modelo *in vitro* que simula las condiciones del accidente cerebrovascular isquémico, incrementa niveles de fosforilación del receptor TrkB en el área de CA3 junto a una reducida depresión en la actividad eléctrica provocada por la isquemia ([Tecuati et al., 2018](#)). Estos resultados plantean que la activación del receptor TrkB, a través del BDNF, es el mecanismo endógeno responsable de la resistencia en el área de CA3 en el hipocampo.

La epilepsia del lóbulo temporal (ELT), la forma más prevalente de epilepsia, se define como una patología donde la zona epileptogénica primaria se encuentra en el lóbulo temporal. La ELT puede clasificarse en cinco subtipos con base en la localización anatómica de las redes neuronales que participan en las crisis. Dentro de esta clasificación se encuentra la epilepsia del lóbulo temporal mesial (ELTM).

Este trastorno tiene la característica de ser progresivo en cuanto a la persistencia de las convulsiones incapacitantes (a pesar de la terapia anticonvulsiva utilizada) y el daño de diversas áreas entre las que se encuentra el hipocampo. La evidencia experimental indica que las convulsiones aisladas y recurrentes, definidas como cambios en la actividad neuronal, tienen como consecuencia la aparición de convulsiones más graves y duraderas junto a un deterioro neuronal. Actualmente sabemos que el BDNF es una neurotrofina cuya expresión y actividad está regulada por la actividad neuronal, así como por las convulsiones. Junto a esto existe evidencia que la activación del receptor TrkB produce cambios plásticos similares a los observados en cerebros con epilepsia (Murray et al., 2000).

En modelos animales de epilepsia del lóbulo temporal, se ha reportado que las crisis convulsivas aumentan la expresión de BDNF junto a la activación del receptor TrkB en vía de las fibras musgosas. Además, se encontró que la aplicación exógena de BDNF y la sobreexpresión transgénica de BDNF o TrkB incrementaron la susceptibilidad a las crisis convulsivas (Mcnamara & Scharfman, 2012). Esto sugiere que la activación del receptor TrkB contribuye de manera crucial al desarrollo de la epilepsia.

El envejecimiento es un proceso natural e irreversible en el que se presentan una serie de modificaciones fisiológicas que conllevan al deterioro gradual del organismo. Durante este proceso, el hipocampo presenta cambios importantes en las funciones fisiológicas que desempeña. De entre los cambios más importantes se encuentran modificaciones en la fuerza de transmisión sináptica por la degeneración de los axones, disminución de la transmisión sináptica inhibitora y variaciones en la proporción de receptores ionotrópicos y metabotrópicos (Driscoll et al., 2003).

Se ha planteado que el deterioro en estas funciones podría estar relacionado con la disminución en los niveles de expresión de BDNF en la región afectada. Esto se ha comprobado en investigaciones en donde se ha encontrado una disminución en la señalización por parte de las neurotrofinas. Aunado a esto, los procesos de

potenciación sináptica en el giro dentado presentan alteraciones que se revierten mediante la administración endógena de BDNF (Rex et al., 2006).

Como se ha evidenciado en varias investigaciones, el BDNF, junto a el receptor TrkB, es una molécula clave que tiene una participación importante en procesos vitales. Dado que la expresión de BDNF se encuentra altamente regulada por la actividad neuronal, cambios en los niveles de esta molécula, especialmente en estructuras importantes como el hipocampo, puede conllevar a la aparición de diversas patologías. Si bien el BDNF no es un candidato como blanco terapéutico o biomarcador específico en una alteración, dada su desregulación en diversas patologías, su estudio es importante como marcador relacionado a la progresión de diversas enfermedades.

1.6 El receptor TrkB y la potenciación a largo plazo en el hipocampo

La relevancia de la activación del receptor TrkB por BDNF en los procesos de plasticidad sináptica hipocampal están bien documentados (Kovalchuk et al., 2002; Schildt et al., 2013; Lin et al., 2018; Griego et al., 2021). Esto se ha demostrado con manipulaciones experimentales que alteran los niveles de BDNF o suprimen la expresión del receptor TrkB. La delección de BDNF en CA3 reveló su papel en la inducción de LTP en la sinapsis Schaffer – CA1, mientras que la delección en CA1 mostró su contribución en el mantenimiento de la LTP (Lin et al., 2018).

Un estudio realizado por Kovalchuk et al (2002), en la sinapsis vía perforante – GD demostró que la LTP mediada por BDNF requiere de la activación de canales de calcio y receptores NMDA postsinápticos. Esta potenciación se inhibió al suprimir las señales de calcio en la célula granular, concluyendo que este proceso está mediado principalmente a través de la postsinápsis.

En la sinapsis FMs – CA3 el BDNF induce potenciación presináptica. El uso de ratones *knockout* heterocigotos de BDNF demostró que los animales que carecen de BDNF presentan una LTP de menor magnitud (Schildt et al., 2013, Fig. 10). Esto concuerda con los hallazgos de Danzer & McNamara (2004) que mostraron que en el SNC, los niveles más altos de BDNF y TrkB se encuentran en las FMs.

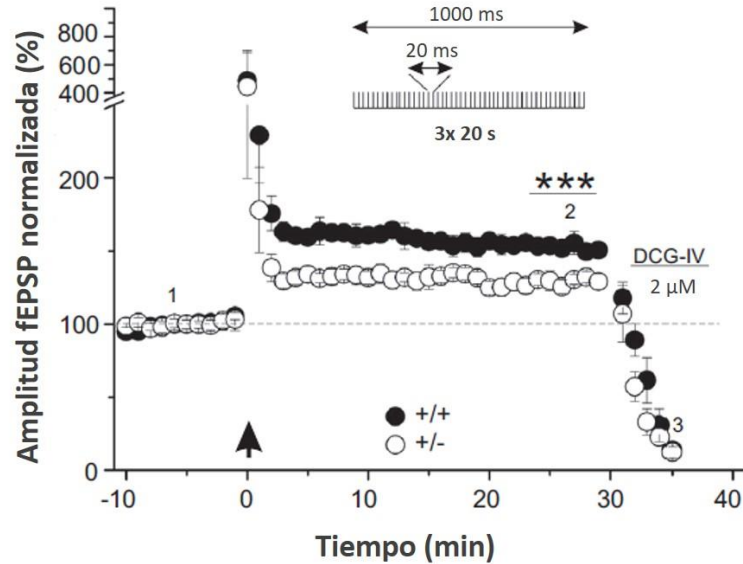


Figura 10. Inducción de potenciación a largo plazo por aplicación de estimulación eléctrica. El nivel de potenciación en los ratones *knock out* (+/-) de BDNF es significativamente menor con respecto a los ratones *wild type* (Modificado de Schildt et al., 2013)

Otros trabajos han demostrado que después del GD, el segundo sitio con los niveles más altos de BDNF y TrkB son las NPs de CA3 (Gottmann et al., 2009). La presencia de la neurotrofina y su receptor a nivel postsináptico sugiere la existencia de un mecanismo encargado de modular los niveles de potenciación que actúa directamente sobre la neurona postsináptica.

La activación farmacológica del TrkB es una herramienta muy útil para el estudio mecanístico. En este sentido, el flavonoide 7,8-dihydroxiflavona (7,8-DHF) tiene la mayor selectividad por este receptor (Jang et al., 2010). Estudios realizados en nuestro laboratorio han permitido determinar el papel del TrkB como neuroprotector endógeno durante el daño isquémico (Tecuatl et al) así como la modulación selectiva de corrientes postsinápticas de interneuronas distribuidas en todos los *strata* de CA3 (Griego et al., 2021)

Con los antecedentes acerca de la importancia del hipocampo y el giro dentado en los procesos de memoria y aprendizaje, está claro que el estudio de los mecanismos celulares que subyacen a estos procesos es esencial. Si bien la importancia del BDNF y su receptor TrkB en los procesos de potenciación sináptica en la sinapsis

de la fibra musgosa-CA3 está clara, el *locus* que subyace a estos procesos aún es incierto.

2. Justificación

El receptor TrkB y su ligando endógeno, BDNF, se encuentran ampliamente expresados en la sinapsis FMs – NPs de CA3. El TrkB participa de manera importante en procesos de plasticidad sináptica en distintas áreas del SNC y su activación regula la LTP hipocampal. Sin embargo, no se sabe si la potenciación sináptica inducida por TrkB / BDNF se da a nivel pre o postsináptico en la sinapsis FMs – CA3.

3. Hipótesis

La activación del receptor TrkB con 7,8-DHF inducirá potenciación en las sinapsis FMs – NPs CA3. Dicha potenciación tendrá componentes pre- y postsinápticos que podrán ser identificados electrofisiológicamente utilizando dosis crecientes de 7,8-DHF.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Identificar electrofisiológicamente, los componentes pre y postsinápticos involucrados en la potenciación sináptica inducida por dosis crecientes de 7,8-DHF en la sinapsis FMs – NPs CA3.

4.2 Objetivos específicos

1. Determinar el efecto del 7,8-DHF para inducir potenciación sináptica de manera concentración-dependiente.
2. Demostrar que la exposición a un antagonista específico del receptor TrkB evita el efecto del 7,8-DHF.
3. Identificar la participación de la pre- y post-sinápsis en el efecto inducido por el 7,8-DHF.

5. Materiales y métodos

5.1 Declaración ética

Todos los experimentos se realizaron con base en el protocolo de manipulación aprobado por el Comité interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio del Cinvestav (CICUAL) y la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999 “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio”.

5.2 Animales

Para todos los objetivos se utilizaron ratas macho de la cepa *Sprague-Dawley* de aproximadamente cuatro semanas de edad. Éstas se mantuvieron en cajas estándar con lecho de aserrín en el bioterio en condiciones de temperatura y humedad controladas con ciclos de luz oscuridad de 12/12 horas. Todos los animales fueron alimentados con dieta estándar y agua *ad libitum*.

5.3 Obtención de rebanadas de cerebro

Las ratas fueron anestesiadas mediante la administración intraperitoneal de pentobarbital sódico a una dosis de 60 mg/kg. Estas fueron decapitadas inmediatamente posterior a la anestesia profunda. El encéfalo se removió cuidadosamente y se colocó en una solución de sacarosa helada (composición en mM: sacarosa 210, KCl 2.8, MgSO₄ 2, Na₂HPO₄ 1.25, NaHCO₃ 26, D-glucosa 10, MgCl₂ 1 y CaCl₂ 1). Los hemisferios cerebrales fueron separados y pegados en la plataforma de corte de un vibratomo (Leica VT1000 S). Se obtuvieron rebanadas transversales de 385 micrómetros de grosor que contuvieran la formación hipocampal. Estas se colocaron en una solución de incubación a 34°C (composición en mM: NaCl 125, KCl 2.5, Na₂HPO₄ 1.25, NaHCO₃ 26, MgCl₂ 4, D-glucosa 10 y CaCl₂ 1) por 30 minutos y a temperatura ambiente durante una hora, previo a los registros electrofisiológicos. La solución de sacarosa, así como la solución de incubación se gasearon continuamente con carbógeno (mezcla de 95% O₂/5% CO₂)

durante todo el procedimiento para asegurar una saturación adecuada de oxígeno y un pH constante de 7.4.

5.4 Registros electrofisiológicos

Las rebanadas se colocaron en una cámara de registro perfundida con líquido cefalorraquídeo artificial (composición mM: NaCl 125, KCl 2.5, Na₂HPO₄ 1.25, NaHCO₃ 26, MgCl₂ 2, D-glucosa 10 y CaCl₂ 2) a velocidad de 2-3 ml/min. La solución se mantuvo a temperatura de 32-33°C aproximadamente y se gaseo continuamente con carbógeno.

El registro de las células piramidales de CA3 se realizó con la ayuda de un microscopio Nikon FN-S2N acoplado a una cámara infrarroja de contraste de interferencia que permite la visualización e identificación anatómica de las neuronas a través de un objetivo 40x. Para acceder a las neuronas se emplearon pipetas de borosilicato, con una resistencia de 4-7 mega Ohms (MΩ), estiradas con un puller horizontal (Flaming-Brown P-97). Las pipetas se llenaron con una solución intracelular (composición en mM: K-Gluconato 135, KCl 10, NaCl 5, EGTA 1, HEPES 10, Mg-ATP 2, Na-ATP 0.4 y fosfocreatina 10) ajustada a un pH de 7.3-7.4 y osmolaridad 290-300 mOsm.

5.4.1 Propiedades intrínsecas de neuronas piramidales de CA3

Los registros electrofisiológicos de las propiedades se realizaron mediante la técnica de *patch clamp*. Tras la identificación de la neurona se creó el giga-sello en la modalidad de fijación de voltaje (*voltage clamp*). Posteriormente se rompió el sello membranal estableciéndose el registro electrofisiológico en la modalidad de célula completa. Una vez abierta la célula se dejó estabilizar el sello por un par de minutos, se quitó toda inyección de corriente y se midió el potencial de membrana en reposo de la neurona (PMR). Se determinaron una serie de parámetros electrofisiológicos en la modalidad de fijación de corriente (*current clamp*) para registrar las propiedades de las neuronas.

- *Curva corriente/voltaje (I-V)*: Se inyectaron pulsos de corriente cuadrados partiendo desde -300 pA con incrementos de 30 pA; la inyección de corriente se detuvo cuando la NP generó su primer potencial de acción. Con este protocolo se determinó la resistencia de entrada, calculada como la pendiente entre los valores negativo y positivo en torno al valor de corriente igual a cero (-30, 0 y 30 pA).
- *Constante de tiempo membranal (τ_{memb})*: A partir del PMR se inyectó un pulso hiperpolarizante de -30 pA y a la deflexión de voltaje obtenida se le realizó un ajuste exponencial donde se determinó el tiempo en que la célula tarda en alcanzar el 63% del valor máximo.
- *Capacitancia de la membrana*: Se obtuvo mediante el cociente de la constante de tiempo entre la resistencia de entrada.

5.4.2 Transmisión sináptica de la FM – NP CA3

Las respuestas de las FMs fueron evocadas a partir de la estimulación eléctrica en la modalidad de *fijación de voltaje (voltaje-clamp)* con electrodos bipolares de nicromo (38 μm de diámetro) colocados en el lado suprapiramidal del giro dentado (extremo más proximal con respecto al hilus del *stratum lucidum*). El estímulo eléctrico consistió en el paradigma de pulsos pareados, en donde se suministran dos estímulos eléctricos con un intervalo interestimulo de 80 ms y a una frecuencia de 0.16 Hz.

Una vez obtenida una respuesta estable se registró la actividad basal durante 10 minutos. Posteriormente se promovió la potenciación sináptica a través del paradigma de inducción química. Este consistió en la estimulación del receptor membranar TrkB por el agonista exógeno 7,8-dihidroxiavona (7,8-DHF) durante 5 minutos a la concentración indicada en cada experimento con su posterior lavado. La actividad se registró por 30 minutos más y al final se perfundió el agonista de los receptores metabotrópicos de glutamato del grupo II, el DCG-IV ((2S, 2'R, 3'R)-2-

(2', 3'-Dicarboxiciclopropil) glicina) a una concentración de 2.5 μM . Esto último se realizó con el fin de corroborar que las respuestas obtenidas se originaran de las FMs y no de otras fuentes.

Para el objetivo 1 se perfundieron diferentes concentraciones de 7,8-DHF (concentraciones en μM : 0.31, 1, 3.16, 10, 31.62 y 100) analizándose los cambios en la amplitud de las corrientes excitadoras postsinápticas (EPSC) de cada concentración con respecto al estímulo basal. Los datos obtenidos se representaron como cursos temporales con la consecuente construcción de una gráfica concentración-respuesta. En base a los resultados de este experimento se determinaron las concentraciones de 7,8-DHF a utilizar en los siguientes objetivos.

Para el objetivo 2 se utilizó el antagonista exógeno del receptor TrkB (ANA-12). En este protocolo se registró la actividad basal durante 5 minutos, posteriormente se perfundió el ANA-12 a una concentración de 50 μM por 5 minutos. Acto seguido, se perfundió el 7,8-DHF a una concentración subefectiva junto con el ANA-12 por 5 minutos más con su posterior lavado. La actividad sináptica se registró durante 30 minutos más la adición al final de cada experimento de DCG-IV.

Con respecto al objetivo 3, se determinó la participación postsináptica en los procesos de potenciación química. Para este protocolo la NP CA3 se fijó a un potencial de membrana de -100 mV a la par de la adición de una concentración subefectiva de 7,8-DHF.

5.4.3 Análisis estadístico

Los datos se analizaron con el programa GraphPad PRISM 8.0. En todas las gráficas y tablas los datos están expresados como el valor de la media \pm error estándar (SEM). Se realizó la prueba de t para muestras pareadas o análisis de varianza de muestras repetidas según corresponda, a menos que se indique lo contrario.

6. Resultados

6.1 Identificación de neuronas piramidales de CA3

Se registraron un total de 225 NPs utilizando la técnica de patch-clamp en modalidad de célula completa. El soma de las neuronas registradas se localizó en el SP de la región CA3b del hipocampo de rata. Preferencialmente, los registros electrofisiológicos se realizaron en la región dorsal del hipocampo. Del total de células registradas, se descartaron 50 neuronas por no cumplir con los criterios electrofisiológicos previamente reportados para estas neuronas.

Una vez realizado el empale de la pipeta de registro con la membrana de la neurona registrada, se formó un giga-sello estable y se procedió a la ruptura del mismo para acceder al medio intracelular y se determinaron una serie de parámetros intrínsecos. En condiciones control, el potencial de membrana en reposo (PMR) osciló en un rango de -72 a -79 mV. El promedio del PMR fue de -75.66 ± 0.14 mV; $n = 175$ neuronas / 55 animales; figura 11.

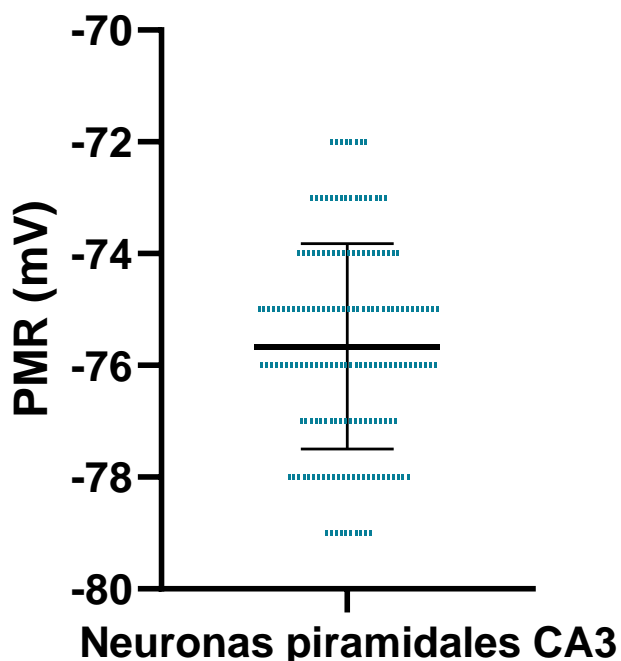


Figura 11. Potencial de membrana en reposo de neuronas piramidales de CA3. El gráfico muestra la distribución de los valores obtenidos para el PMR (expresado en mV) de las neuronas piramidales de CA3.

Inmediatamente después de determinar el PMR, se realizó una curva corriente-voltaje o curva I-V (ver métodos para los detalles). El protocolo consistió en la inyección de pulsos cuadrados de corriente, desde -300 pA hasta + 300 pA, con incrementos de 50 pA y duración de 1-s). Con este protocolo se determinó la resistencia de entrada (R_N) que en condiciones basales fue de $214.4 \pm 3.71 \text{ M}\Omega$; $n = 175$ neuronas / 55 animales. Dichos resultados se muestran en la figura 12.

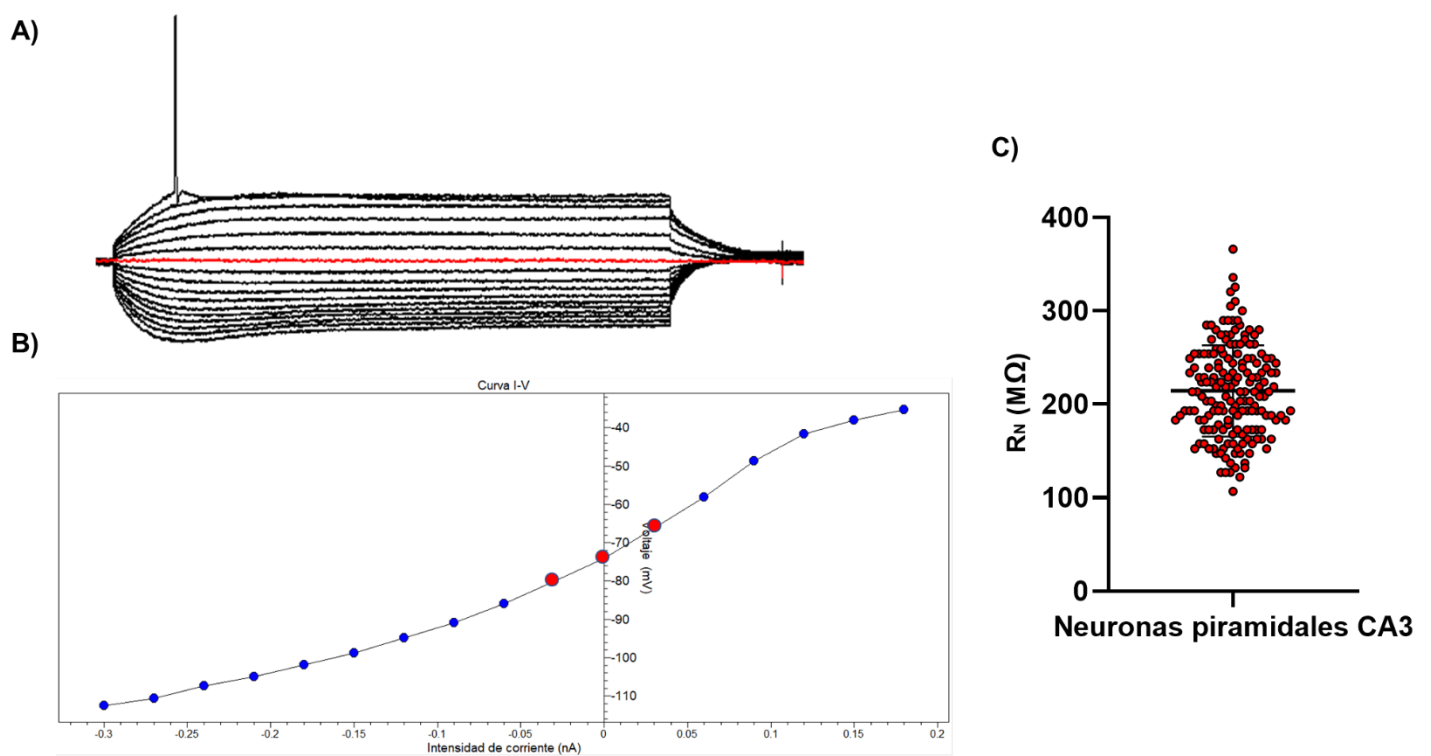


Figura 12. Resistencia de entrada de neuronas piramidales de CA3. A) Curva I-V representativa. Una vez que la neurona genero el primer potencial de acción se tomaron los valores positivo y negativo en torno al valor 0 de corriente inyectada (línea roja). B) Grafica I-V. A través del ajuste de una función lineal a los valores obtenidos en a) se obtuvo el valor de la pendiente. Los puntos en rojo muestran los valores tomados para el cálculo de la R_N . C) R_N somática de neuronas piramidales de CA3. El grafico muestra la distribución de los valores de la resistencia de entrada obtenidos (expresada en mega Ohms) para las 175 células registradas.

Como parte de los parámetros pasivos obtenidos en condición control, también se calculó la constante de tiempo membranar (τ_{memb}) que representa el tiempo

necesario para que el potencial de membrana alcance el 63% de su valor estable en respuesta a la inyección de un pulso de corriente. La τ_{memb} se calculó con un ajuste exponencial aplicado a la deflexión negativa de voltaje al inyectar 20 pA/100 ms (Fig. 13A). En condiciones basales, el ajuste exponencial determinó que la τ_{memb} fue de 39.16 ± 1.26 ms; $n = 175$ neuronas / 55 animales (Fig. 13b).

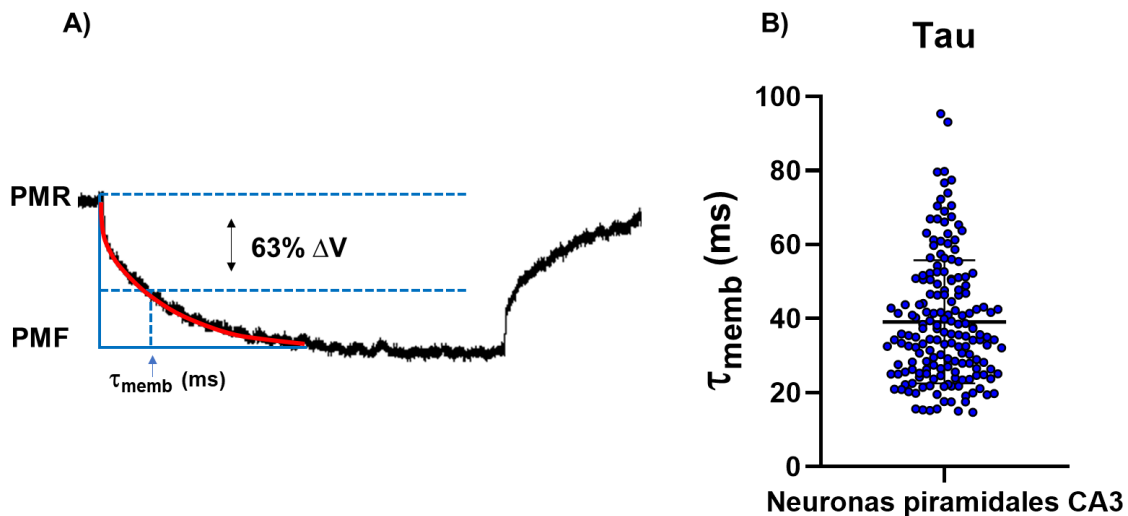


Figura 13. Constante de tiempo de neuronas piramidales de CA3. A) Trazo representativo de la deflexión de voltaje obtenida tras la inyección del pulso hiperpolarizante de 30 pA. El ajuste exponencial se muestra en la línea roja. B) El grafico muestra la distribución de los valores de la τ_{memb} obtenidos (expresada en mili segundos) para las 175 células registradas.

Por último, se calculó la capacitancia de la membrana a partir del cociente de los valores obtenidos de la constante de tiempo entre la resistencia de entrada. En condiciones control, la capacitancia de la membrana fue de 180 ± 4.39 pF; $n = 175$ neuronas / 55 animales; figura 14.

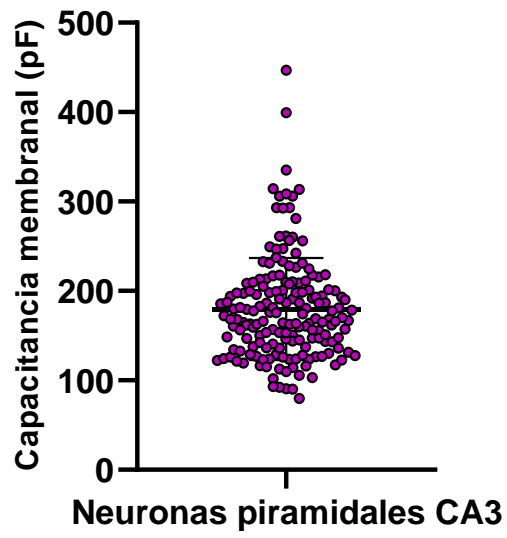


Figura 14. Capacitancia membranal de neuronas piramidales de CA3. El grafico muestra la distribución de los valores obtenidos para la capacitancia (expresado en pico Faradios) de las células registradas.

6.2 Propiedades electrofisiológicas de los potenciales postsinápticos excitadores evocados en las fibras musgosas.

Para evocar y registrar FM – EPSCs, en los siguientes experimentos se colocó un electrodo de estimulación en el hilus o directamente sobre los axones de las FMs, en el stratum lucidum (ver figura 15). Las NP se mantuvieron en modalidad de fijación de voltaje a -75 ± 4.5 mV y se aplicaron dos pulsos de corriente (100 ± 50 μ A / duración 100 ms) con un intervalo entre ellos de 80 ms. Los estímulos eléctricos evocaron corrientes entrantes o FM EPSCs. Las respuestas sinápticas tuvieron una amplitud promedio de 150 ± 50 pA, mientras que la segunda respuesta o pulso pareado, exhibió un incremento de 1.5 a 2 veces. El proceso de facilitación del segundo pulso, se conoce como facilitación por pulso pareado y es característico de los FM EPSCs. Las respuestas sinápticas tuvieron una latencia desde su estimulación eléctrica al inicio del FM EPSC de 2.4 – 3 ms. Finalmente, las respuestas fueron aceptadas como FM EPSCs únicamente si presentaron una sensibilidad a DCG-IV $\geq 80\%$ del valor original. La figura 15 resume tanto la posición de los electrodos de estimulación, como la respuesta típica evocada por activación de las fibras musgosas y su sensibilidad a DCG-IV.

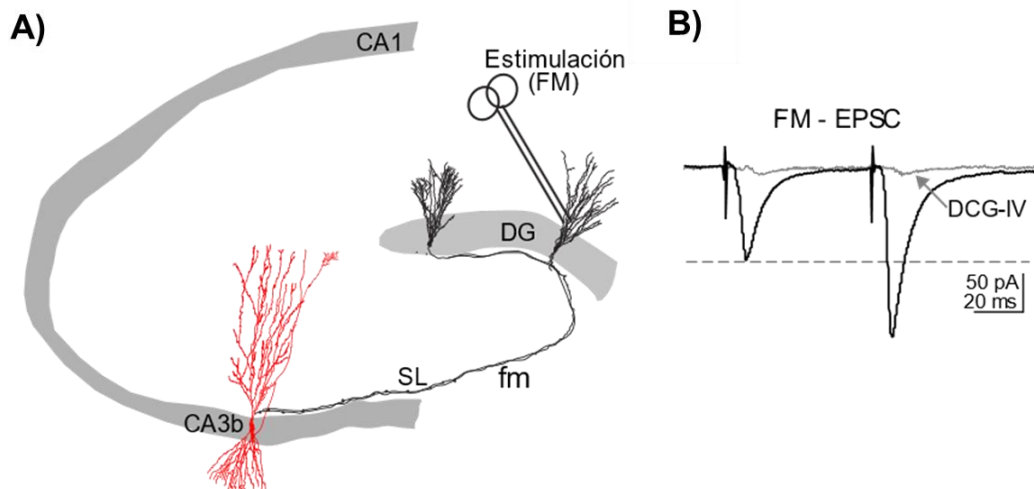


Figura 15. Esquema de estimulación y respuestas sinápticas de la región CA3 del hipocampo. A) El electrodo de estimulación se colocó en el giro dentado (DG) o en el hilus (stratum lucidum, SL). Las neuronas piramidales se localizaron preferentemente en la región CA3b del hipocampo dorsal. B) La estimulación eléctrica generó una corriente postsináptica excitadora evocada en las fibras musgosas (FM EPSC). La línea punteada muestra el nivel de facilitación por pulso pareado (PPF) de los FM EPSC. Para demostrar que las respuestas evocadas provienen del giro dentado, se aplicó el agonista de los mGluRII, DCG-IV que produjo una depresión de la respuesta sináptica mayor al 80%.

6.3 La activación del receptor TrkB con 7,8-DHF induce potenciación sináptica.

Una vez caracterizadas las corrientes excitadoras postsinápticas evocadas en las FMs (FM – EPSCs), se probó si la estimulación del receptor TrkB con 7,8-DHF actúa de manera concentración dependiente. Para este fin, se perfundieron concentraciones crecientes de 7,8-DHF (ver métodos) y se analizó la amplitud de los FM – EPSCs en condición control y en presencia del flavonoide. Un ejemplo del protocolo seguido se muestra en la figura 15. Tras la estabilización de la respuesta sináptica, se obtuvo una respuesta basal de FM-EPSCs durante 10 minutos, seguido de la perfusión extracelular de 7,8-DHF a una concentración de 10 μ M por cinco minutos (barra negra en la parte inferior del curso temporal en la figura 5b). Tras este periodo de estimulación se lavó el 7,8-DHF y el registro electrofisiológico continuó por 30 minutos más. Pasado este tiempo, se verificó el origen sináptico de la respuesta registrada perfundiendo el agonista de los receptores metabotrópicos de glutamato del grupo II, DCG-IV (barra inferior en grafica curso-temporal). Los mGluRII se localizan exclusivamente en las fibras musgosas y su activación suprime la liberación de glutamato y elimina la respuesta sináptica en un porcentaje $\geq 80\%$. Los FM – EPSCs representativos de este experimento se muestran en el panel superior de la figura 15a. Los trazos representan el FM – EPSCs en condición control, en presencia de 7,8-DHF y en presencia de DCG-IV. La depresión del FM – EPSCs en presencia de DCG-IV indica que la respuesta sináptica proviene exclusivamente de las fibras musgosas. La grafica de caja en la figura 15c resume los niveles de potenciación por experimento realizado (círculos) y su distribución estadística al ser promediados (línea media de la caja: promedio; líneas inferior y superior de la caja, percentil 5% y 95%, respectivamente).

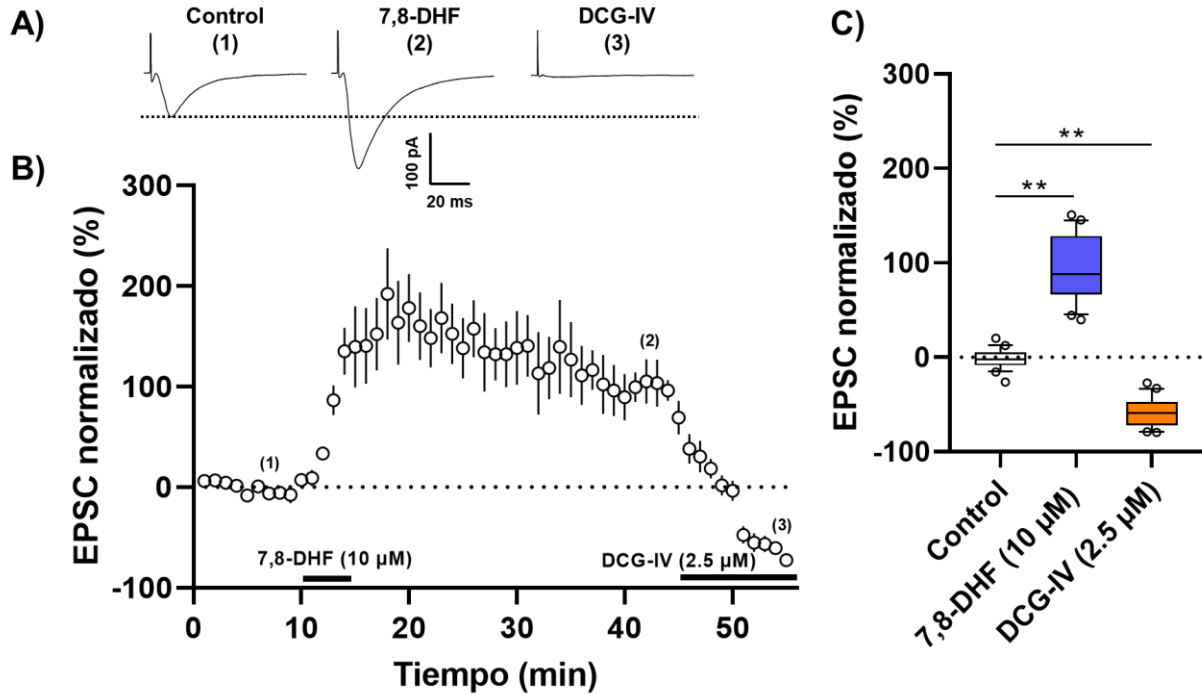


Figura 16. Respuesta inducida por 7,8-DHF (10 μ M) en la sinapsis de FM – NP CA3. A) Trazos representativos de los cambios en las EPSC en condiciones control, posterior a la aplicación extracelular del flavonoide y del DCG-IV. Se puede apreciar la sensibilidad de las repuestas a la perfusión de ambos. B) Grafico representativo del curso temporal obtenido con respecto a los cambios en la amplitud normalizada de las EPSC tras la perfusión extracelular de 7,8-DHF. Los números encerrados en paréntesis indican el momento en que se realizaron la medición en la amplitud de las EPSC mostradas en (A). El grafico representa el promedio de 4 células en 4 ratas distintas. C) Grafica de cajas de la distribución estadística en los niveles de potenciación individual. ** = $p < 0.001$.

Este mismo protocolo se repitió para cada concentración probada de 7,8-DHF utilizando para estas una $n = 4$ células / en cuatro ratas. Las respuestas sinápticas representativas y los cursos temporales se muestran en las figuras 16a y 16b respectivamente. A pesar de que la gráfica curso-temporal solo muestra el efecto de 7,8-DHF, en cada experimento se aplicó DCG-IV. Estas respuestas no fueron incluidas en la figura, sin embargo, los trazos representativos de la figura 16a muestran el efecto producido por la aplicación de DCG-IV.

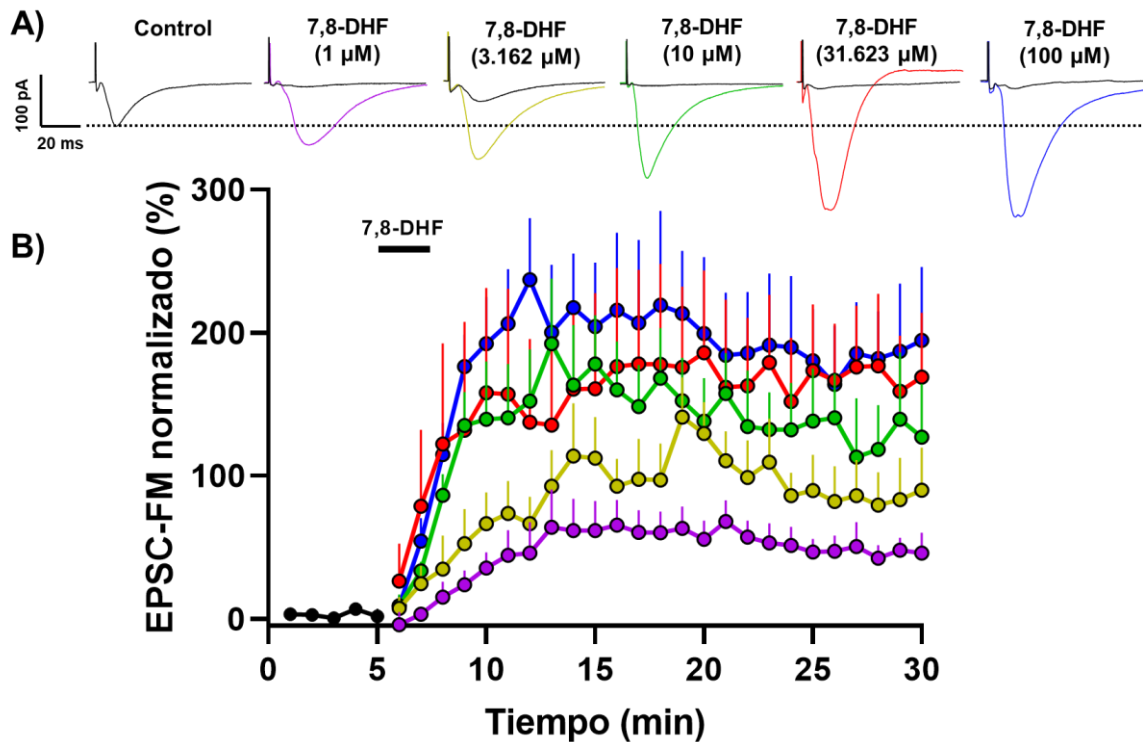


Figura 17. La aplicación extracelular de 7,8-DHF induce potenciación de la transmisión sináptica de manera concentración-dependiente. A) Trazos representativos de los cambios en las EPSC en condiciones control y posterior a la aplicación extracelular del flavonoide con las diferentes concentraciones indicadas. En color negro se muestra la inhibición producida tras la aplicación de DCG-IV en cada uno de los experimentos. Se puede apreciar la sensibilidad de las repuestas a la perfusión de ambos. B) Curso temporal obtenido con respecto a los cambios en la amplitud normalizada de las EPSC tras la perfusión extracelular de 7,8-DHF. Los colores representan las concentraciones indicadas en el panel (A). El recuadro azul indica el punto al que se tomaron los valores de potenciación para obtener el efecto máximo de las diferentes concentraciones de DHF (ver siguiente sección). Cada concentración representa el promedio de 4 células en 4 ratas distintas.

La tabla 1 resume los promedios de potenciación obtenida con cada concentración de 7,8-DHF probada en este trabajo. Es importante mencionar que la amplitud máxima de potenciación por 7,8-DHF fue tomada a los 30 min después de retirar el flavonoide (la caja azul en la gráfica curso-temporal muestra el tiempo al que se midió la amplitud del FM – EPSCs).

Tabla 2. Grado de potenciación sináptica obtenida con las diferentes concentraciones de 7,8-DHF en la sinapsis de FM – NP CA3.

7,8-DHF (μM)	0.31	1	3.16	10	31.62	100
Valor de potenciación (%)	16.62 \pm 3.8	33.11 \pm 5.3	61.64 \pm 9.1	94.64 \pm 7.8	147.6 \pm 10.9	165.1 \pm 6.4

Con los datos obtenidos en la tabla 1, se generó una curva del logaritmo de cada una de las concentraciones vs respuesta máxima y se ajustó una ecuación sigmoidea para obtener el efecto máximo (E_{max}). De acuerdo con este análisis, el E_{max} del 7,8-DHF sobre el FM – EPSCs fue de 180.4% con respecto al FM – EPSCs normalizado. El valor de potenciación de cada una de las concentraciones (E) se dividió entre el efecto máximo para así obtener una curva del logaritmo de cada una de las concentraciones vs E/E_{max} representada en la figura 17. En conjunto, los experimentos previos tuvieron la finalidad de demostrar la participación directa del receptor TrkB en la potenciación del FM – EPSC mediada por la perfusión del agonista selectivo, 7,8-DHF.

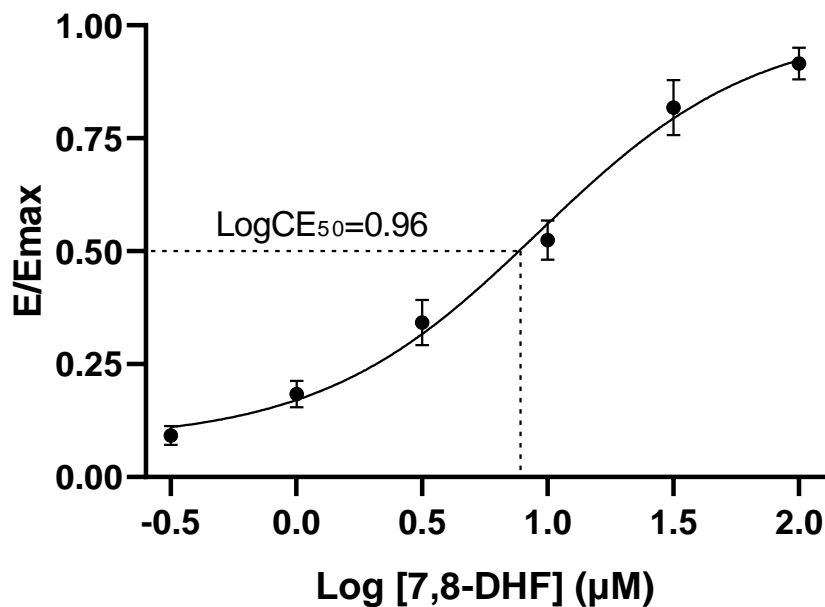


Figura 18. Curva concentración-respuesta inducida por 7,8-DHF en la vía de FMs – NPs CA3. El gráfico muestra el logaritmo de cada una de las concentraciones vs el cociente del efecto obtenido para cada una de estas con respecto al efecto máximo calculado. La línea punteada muestra el logaritmo concentración efectiva 50.

6.4 El bloqueo farmacológico del receptor TrkB suprime la potenciación del FM – EPSC.

Con los datos de la Fig. 17 se obtuvo la concentración efectiva (CE_{50}) del 7,8-DHF que fue calculada a partir de la curva concentración-respuesta ($\text{Log } CE_{50} = 0.96$; $CE_{50} = 9.1 \mu\text{M}$). Dicha concentración indujo una potenciación sináptica de $90.43 \pm 15.80 \%$ con respecto al control (círculos negros, Fig. 18). Las respuestas sinápticas representativas se muestran en la Fig. 18b.

Para verificar que la potenciación sináptica está mediada por únicamente por la activación del TrkB, se repitió el experimento en presencia del antagonista selectivo del receptor TrkB, ANA-12 ($50 \mu\text{M}$). Como se observa en el curso temporal y en las respuestas sinápticas representativas (Fig. 18a y 18b; trazos en azul), la perfusión de ANA-12 en presencia de 7,8-DHF suprimió la potenciación sináptica ($1.17 \pm 3.28 \%$ con respecto al estímulo basal). Para ambos experimentos se tiene una $n = 3$ células / en tres ratas.

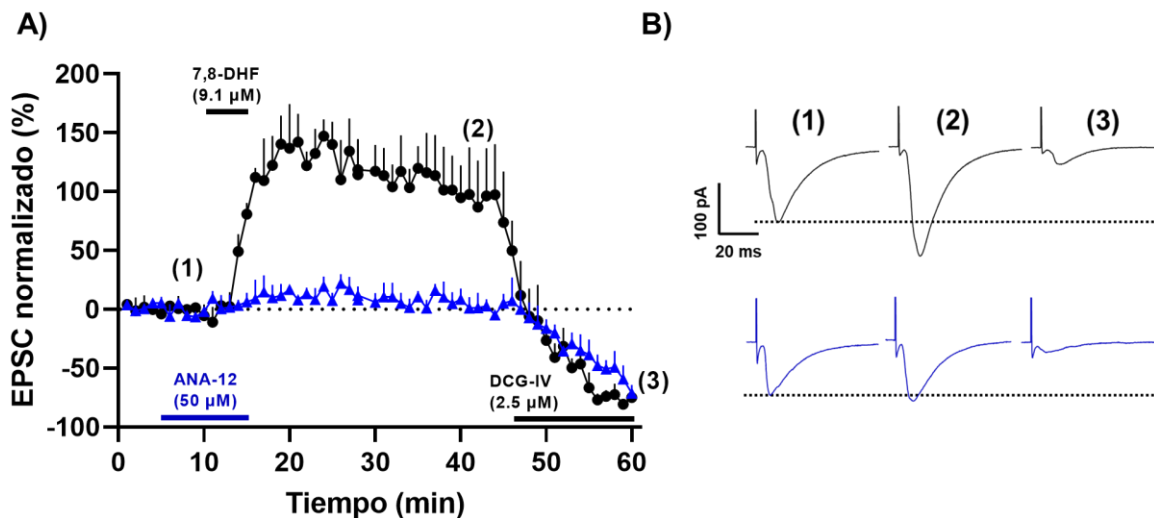


Figura 19. La potenciación sináptica en la vía de FM – NP CA3 es dependiente de la activación del receptor TrkB. A) Cursos temporales del nivel de potenciación sináptica a través de la CE_{50} del 7,8-DHF en condiciones control (círculos) y en presencia de ANA-12 (triángulos). B) Respuestas sinápticas representativas de ambos experimentos. Los números encerrados en paréntesis indican el momento en el que se toman los trazos representativos así como el nivel de potenciación obtenida.

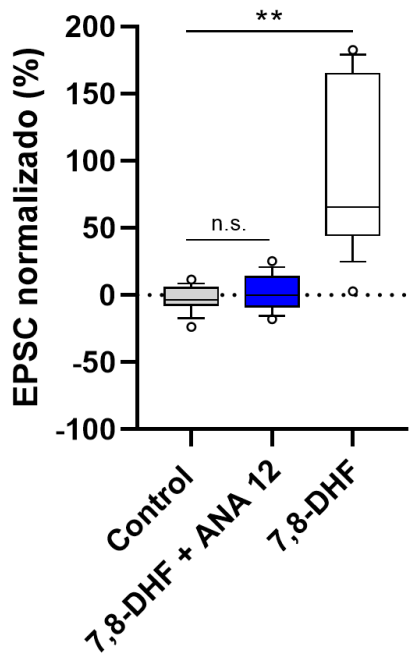


Figura 20. Inhibición de la potenciación sináptica en la vía de FM – NP CA3 por el ANA-12. El análisis estadístico no mostro diferencias entre las repuestas producidas en condiciones control y la profusión de 7,8-DHF (9.1 μ M) de manera simultánea con ANA-12 (50 μ M). No asi para el caso del 7,8-DHF en ausencia del antagonista. n = 3; n.s. = no significativo; ** = p < 0.01

En la gráfica de caja en la figura 19 se muestran los resultados obtenidos para el nivel de potenciación para el control, ANA-12 + 7,8-DHF y 7,8-DHF y su distribución estadística al ser promediados. El análisis estadístico demostró que no existen diferencias entre el nivel de potenciación en condiciones control vs el efecto obtenido con el ANA-12. Sin embargo, este no fue el caso para los experimentos con 7,8-DHF en ausencia de ANA12.

6.5 La potenciación mediada por 7,8-DHF requiere un componente postsináptico.

El siguiente experimento investigó si el 7,8-DHF activa un componente postsináptico durante la inducción de potenciación sináptica. La estrategia experimental consistió en llevar a la neurona postsináptica a un potencial negativo fuera del rango fisiológico (-100 mV) durante la perfusión de 7,8-DHF (concentración de 0.76 μ M; CE₁₅ calculada a partir de la curva mostrada en la figura 17). A este potencial negativo, la actividad dependiente de voltaje es suprimida. Por tal razón, la actividad de canales iónicos, receptores de neurotransmisor, entrada de Ca²⁺ y la subsecuente activación de segundos mensajeros, desaparece durante la hiperpolarización. Como se observa en el curso temporal de la Fig. 20a (círculos azules) la perfusión de 7,8-DHF a -100 mV no produce potenciación sináptica. Sin embargo, una segunda aplicación de 7,8-DHF con la NP CA3 mantenida a -75 mV induce potenciación sináptica (53.48 ± 3.69 % con respecto al basal).

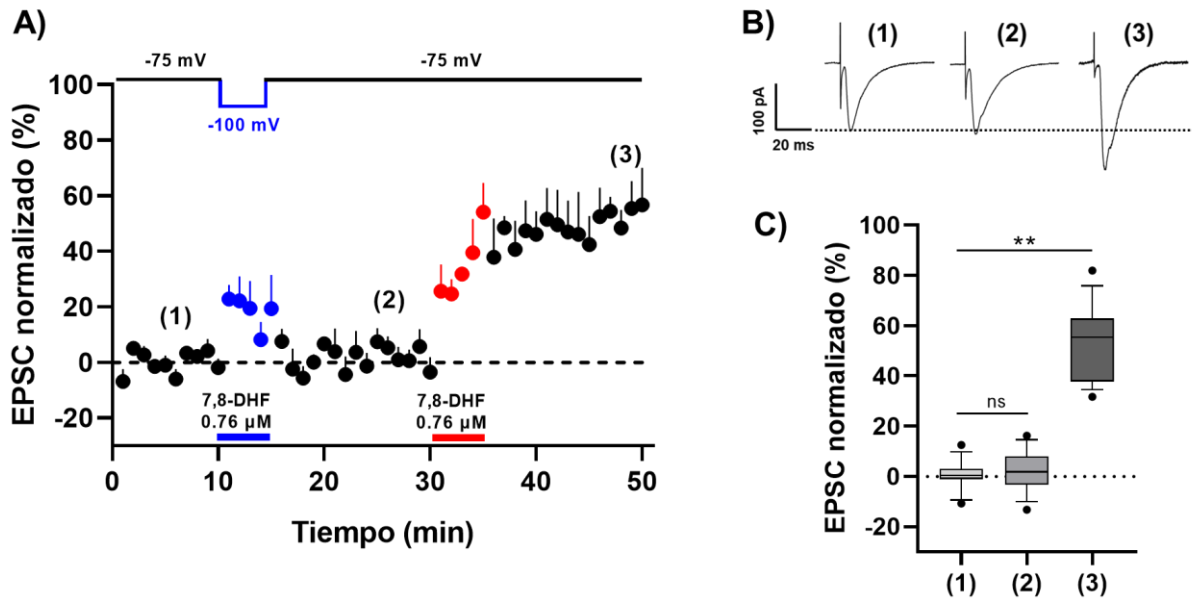


Figura 21. Potenciación sináptica en la vía de FM – NP CA3 mediante mecanismos postsinápticos. A) Gráfico del curso temporal obtenido respecto a los cambios en la amplitud normalizada de las EPSC. Durante los primeros 10 minutos del protocolo se registró la actividad basal a -75 mV. Se perfundió 7,8-DHF (símbolos azules) durante 5 minutos mientras la NP CA3 se mantuvo a -100 mV para su posterior lavado y fijación de la neurona a -75 mV. A los 15 minutos se perfundió 7,8-DHF (símbolos rojos) y se registró la actividad por 15 minutos más. B) Trazos representativos de los cambios en la amplitud de las EPSC en condiciones control (1) y posterior a la aplicación del agonista a -100 (2) y -75 mV (3). C) Diagramas de caja que resumen los cambios en la amplitud de las EPSC durante el estímulo basal (1), perfusión de 7,8-DHF a -100 mV (2) y -75 mV (3). n = 3; n.s. = no significativo; ** = p < 0.01.

7. Discusión

En este trabajo se demostró que la activación del receptor TrkB con su agonista selectivo 7,8-DHF, incrementa la potenciación sináptica de manera concentración-dependiente en la sinapsis FM – NP CA3. Además, se demostró que el efecto del 7,8-DHF es abolido en presencia del antagonista selectivo del TrkB, ANA-12. Por último, la ausencia de potenciación por 7,8-DHF cuando se silencian canales iónicos y receptores postsinápticos operados por voltaje, sugiere la participación de maquinaria bioquímica localizada en la neurona postsináptica (neurona piramidal). En este sentido, este trabajo demuestra por primera vez, que el TrkB actúa directamente sobre las neuronas piramidales y que el proceso de potenciación sináptica mediado por activación de receptores TrkB no está limitado a nivel presináptico.

Dada la diversidad de población neuronal en el área hipocampal, es necesario el uso de herramientas que permitan la identificación no solo anatómica de las células de interés sino también de ciertas propiedades intrínsecas de las cuales se tenga una base de datos sólida para su correcta identificación. Los parámetros electrofisiológicos de PMR, RN, τ_{memb} y capacitancia membranal coinciden plenamente con lo previamente reportado para las NPs del área de CA3b (Garrido Sanabria et al., 2004; Gloveli et al., 2005; Barnes et al., 2010; Yi et al., 2015; Griego et al., 2021).

Dada la dificultad para registrar EPSCs provenientes de las fibras musgosas se han establecido una serie de criterios que deben ser cumplidos con rigurosidad para considerar una respuesta sináptica como FM – EPSC. Dado que las fibras musgosas viajan determinada distancia desde la capa de células granulares hasta el área de CA3, el registro de una vía intacta depende de la orientación del corte de las rebanadas, la posición del electrodo de estimulación a fin de evitar contaminación. Un ejemplo de estas vías de contaminación son las recurrentes de asociación, formadas por las sinapsis entre neuronas piramidales.

En los experimentos que conforman este trabajo, las propiedades cinéticas las corrientes postsinápticas excitadoras, la facilitación por pulso pareado y la

depresión de la respuesta sináptica por encima del 80% del valor basal tras la aplicación del agonista de los receptores mGluR2, confirmaron que los resultados obtenidos en este trabajo provienen de la vía de las fibras musgosas (Claiborne et al., 1993; Kamiya & Ozawa, 1999; Yeckel et al., 1999; Nicoll & Schmitz, 2005).

Como se ha demostrado en investigaciones previas, la activación del receptor TrkB a través de su agonista endógeno (BDNF) o exógeno (7,8-DHF) desencadena procesos de potenciación sináptica en diversas áreas del sistema nervioso central (Patterson *et al.*, 1992; Korte et al., 1998; Kovalchuk et al., 2002; Lin et al., 2018).

Trabajos como el realizado por Kobayashi & Suzuk (2018) utilizando registros de extracelulares demostraron que la perfusión de 7,8-DHF (2 μ M) en rebanadas de hipocampo inducen potenciación en la región CA3 del hipocampo del ratón. Si bien el uso de 7,8-DHF como agonista exógeno del receptor TrkB ha cobrado relevancia en los últimos años, existe poca información sobre su efecto a distintas concentraciones. Se sabe que en condiciones patológicas la sobre-estimulación del TrkB produce alteraciones en la transmisión sináptica tales como la aparición de actividad epileptiforme en diversas sinapsis del hipocampo (Bramham, K. & Scharfman, 2005; Mcnamara & Scharfman, 2012). Si bien la sobreestimulación de este receptor en experimentos *ex vivo* podría causar alteraciones en las sinapsis estudiadas, no existía información sobre las concentraciones que produjeran un efecto máximo, a fin de evitar efectos adversos al estimular por encima de estas concentraciones. Nuestros resultados demostraron de forma clara que este flavonoide induce potenciación sináptica en la vía de FMs de manera concentración dependiente. El efecto máximo observado para este agonista se presentó a partir de una concentración de 31.62 μ M con una CE_{50} de 9.1 μ M con efectos mínimos encontrados a la concentración de 0.31 μ M.

Más recientemente, el uso de BDNF como agonista del receptor TrkB en diferentes investigaciones ha sido sustituido por agonistas farmacológicos exógenos con mayor afinidad y especificidad por este receptor. Se tiene evidencia que el BDNF no solo activa a su ligando endógeno, el TrkB, sino que además puede activar a los receptores TrkA, TrkC y el receptor p75 con menor afinidad. Esto representa un

problema en diversas investigaciones debido a que la señalización asociada de estos receptores es de naturaleza antagónica. Por ejemplo, a pesar de que la activación del TrkB por BDNF promueve la supervivencia neuronal tras un periodo de supresión de oxígeno y glucosa (Tecuatl et al., 2017), la activación del receptor p75 con BDNF activa vías asociadas a poda y muerte neuronal (Joseph-Hernandez et al., 2017).

Dentro de los agonistas exógenos utilizados en la actualidad, el flavonoide 7,8-DHF ha demostrado una alta afinidad por el receptor TrkB ($K_d = 320$ nM). Junto a esto, estudios *in vitro* demostraron que este agonista no actúa sobre el receptor p75 o sobre las isoformas TrkA o TrkC (Jang et al., 2010).

Si bien el uso del 7,8-DHF en nuestra investigación representó una herramienta farmacológica muy útil para la activación del receptor TrkB, esto no garantiza que la potenciación observada en las sinapsis FM – CA3 estuviera mediada por la activación específica de este receptor. Como se evidenció en nuestros resultados, el bloqueo farmacológico del receptor TrkB, con el antagonista selectivo ANA-12, suprimió el efecto de potenciación tras la perfusión de 7,8-DHF a una concentración de $9.1 \mu\text{M}$.

El ANA-12, es un antagonista no competitivo del receptor TrkB, el cual ha demostrado su alta afinidad por este receptor. Estudios *in vitro* reportaron que el ANA-12 se une al receptor TrkB con una $K_d = 10$ nM. Junto a esto, no se encontró evidencia de unión de esta molécula con las isoformas TrkA, TrkC o el receptor p75 (Cazorla et al., 2011).

Aun cuando la participación del receptor TrkB en este estudio se evidenció farmacológicamente, se requieren más experimentos para confirmar completamente esta hipótesis. Una posible herramienta sería demostrar que tras la perfusión de 7,8-DHF se activa una de las tres vías de señalización del receptor TrkB descritas para el hipocampo y tras su bloqueo farmacológico, descartar la participación de otros receptores. De igual forma, el uso de ratones *knock out* para TrkB brindaría evidencia sólida de la participación exclusiva de este receptor.

Diversas investigaciones han reportado que la potenciación sináptica de la FMs – CA3 depende principalmente de mecanismos presinápticos. Este proceso se desencadena por un incremento sostenido en la liberación de glutamato, lo que conlleva al incremento de la amplitud de la respuesta postsináptica promoviendo el mecanismo de potenciación. Con respecto al *locus* de potenciación por parte del receptor TrkB [Schildt et al., \(2013\)](#) reportaron que la inducción de FM - LTP a través de la activación BDNF-TrkB, se debe a mecanismos presinápticos que involucran un incremento en la liberación de glutamato. Un trabajo previo de nuestro laboratorio ([Griego et al., 2021](#)), utilizando la técnica de *patch-clamp*, reportó que la perfusión de 7,8-DHF a una concentración de 25 μM inducía potenciación en esta vía ($294.2 \pm 28.3\%$ con respecto al basal). Junto a esto, se encontró una disminución en la relación de pulsos pareados posterior a la aplicación del agonista, lo que sugiere un locus presináptico para este mecanismo.

Nuestras manipulaciones experimentales fijando la NP CA3 a -100 mV mostraron que el 7,8-DHF, a una concentración de 0.76 μM , requiere de la activación postsináptica para la inducción de potenciación. La hiperpolarización generada en la NP provoca la inactivación de los canales de calcio dependientes de voltaje. Estos canales están involucrados en los procesos de potenciación no Hebbiana que depende de incrementos en la concentración de calcio en la NP para la generación de LTP en la sinapsis de FM – CA3 ([Yeckel et al., 1999](#)).

Si bien a la fecha no existen investigaciones que reporten un locus postsináptico para la potenciación a través de la activación del receptor TrkB en esta vía, nuestros resultados concuerdan con aquellos reportados en otras sinapsis del hipocampo. [Kovalchuk et al., \(2002\)](#) reportaron que en las sinapsis de la vía perforante con células granulares del GD, la aplicación de BDNF exógeno produjo corrientes de calcio en dendritas y espinas, no así a nivel presináptico. Junto a esto se encontró que la LTP en esta vía mediada por BDNF se induce postsinápticamente.

Aun cuando nuestra investigación indica la necesidad de la activación postsináptica para la generación de procesos de potenciación en la vía de FM, no descarta los mecanismos que involucran locus presinápticos previamente reportados. A la fecha

no existe información sobre el papel de la neurona presináptica, postsináptica o ambas en esta sinapsis para los procesos de potenciación mediada por el TrkB. [Lin et al., \(2018\)](#) reportaron que la activación presináptica del receptor TrkB, en las sinapsis CA3 – CA1 (Colaterales de Schaffer – neurona piramidal CA1), es importante para el mantenimiento de la LTP, mientras que a nivel postsináptico es esencial para la formación de la misma.

En el hipocampo, el efecto directo de la unión de BDNF o de 7,8-DHF sobre el receptor TrkB es la activación de tres vías principales de señalización que se encuentran involucradas en fenómenos de plasticidad sináptica. En contraste con esto, no existe información acerca del papel de la activación de estas vías y su efecto sobre los procesos de plasticidad en las sinapsis de FMs – NPs CA3. En un trabajo previo de nuestro laboratorio ([Tecuatl et al., 2018](#)), a través de la técnica de western blot, se determinó que en la región CA3 hipocámpal la activación del TrkB activa la vía de señalización intracelular PI3-Akt, que participa de manera importante en la inducción de diversas formas de plasticidad en el hipocampo ([Minichiello, 2009](#); [Leal et al., 2017](#)). Es por esto, que los próximos experimentos deben planearse para demostrar cual es la posible vía que este participando en la LTP generada por la activación del receptor TrkB en las NPs CA3.

Como ya se mencionó, los dos sitios con los niveles más altos de expresión tanto de BDNF como de TrkB en todo el sistema nervioso central son las FMs y las NPs CA3. Esta sinapsis tiene un papel importante en procesos como la formación de nuevas memorias, aprendizaje, separación de patrones neuronales, así como en diversas patologías previamente mencionadas. Pese a esto, existe muy poca información sobre los efectos de su activación en la transmisión sináptica. Dada la relevancia del TrkB y su ligando endógeno (BDNF) en las sinapsis de las FMs queda claro que investigar el papel de este receptor en la transmisión y la plasticidad sináptica es esencial. Nuestra investigación demostró que los procesos de plasticidad en los que participa este receptor son más complejos de lo que hasta ahora se sabe. La confirmación de un locus postsináptico en la potenciación

sináptica abre camino a nuevas investigaciones con un posible blanco terapéutico que no ha sido investigado hasta la fecha.

8. Conclusión

Mediante análisis electrofisiológicos *ex vivo* se encontraron evidencias solidas que la activación del receptor TrkB a través del 7,8-DHF induce potenciación sináptica de manera concentración-dependiente. Junto a esto, se encontró que este proceso es específico del receptor TrkB y que, aunado a lo previamente reportado, es necesaria la participación postsináptica para los procesos de plasticidad sináptica. Nuestros resultados proveen evidencia de la complejidad de las repuestas sinápticas medidas por esta sinapsis en particular.

Referencias

- Acsády, L. *et al.* (1998) “GABAergic cells are the major postsynaptic targets of mossy fibers in the rat hippocampus”, *Journal of Neuroscience*, 18(9), pp. 3386–3403. doi: 10.1523/jneurosci.18-09-03386.1998.
- Airaksinen, M. S. y Saarma, M. (2002) “The GDNF family: Signalling, biological functions and therapeutic value”, *Nature Reviews Neuroscience*, 3(5), pp. 383–394. doi: 10.1038/nrn812.
- Amaral, D. y Lavenex, P. (2007) “Hippocampal Neuroanatomy”, en Andersen, P. *et al.* (eds.) *The Hippocampus Book*, pp. 37–110. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.
- Barnes, S. J. *et al.* (2010) “Stable mossy fiber long-term potentiation requires calcium influx at the granule cell soma, protein synthesis, and microtubule-dependent axonal transport”, *Journal of Neuroscience*, 30(39), pp. 12996–13004. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1847-10.2010.
- Bramham, C., K., S. P. y Scharfman, H. E. (2005) *Synaptic Plasticity and Transsynaptic Signaling*.
- Castillo, P. E., Weisskopf, M. G. y Nicoll, R. A. (1994) “The role of Ca²⁺ channels in hippocampal mossy fiber synaptic transmission and long-term potentiation”, *Neuron*, 12(2), pp. 261–269. doi: 10.1016/0896-6273(94)90269-0.
- Cazorla, M. *et al.* (2011) “Identification of a low-molecular weight TrkB antagonist with anxiolytic and antidepressant activity in mice”, 121(5), pp. 1846–1857. doi: 10.1172/JCI43992.1846.
- Chao, M. V. (2003) “Neurotrophins and their receptors: A convergence point for many signalling pathways”, *Nature Reviews Neuroscience*, 4(4), pp. 299–309. doi: 10.1038/nrn1078.
- Claiborne, B. J., Xiang, Z. y Brown, T. H. (1993) “Hippocampal circuitry complicates analysis of long-term potentiation in mossy fiber synapses”, *Hippocampus*, 3(2), pp. 115–121. doi: 10.1002/hipo.450030202.
- Danzer, S. C. y McNamara, J. O. (2004) “Localization of brain-derived neurotrophic factor to distinct terminals of mossy fiber axons implies regulation of both excitation and feedforward inhibition of CA3 pyramidal cells”, *Journal of Neuroscience*, 24(50), pp. 11346–11355. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3846-04.2004.
- Driscoll, I. *et al.* (2003) “The Aging Hippocampus: Cognitive, Biochemical and Structural Findings”, *Cerebral Cortex*, 13(12), pp. 1344–1351. doi: 10.1093/cercor/bhg081.
- Feduchi Canosa, E. (2017) “Señalización celular”, en *Bioquímica, conceptos esenciales*, pp. 175–198.
- Ferraguti, F. y Shigemoto, R. (2006) “Metabotropic glutamate receptors”, *Cell and Tissue Research*, 326(2), pp. 483–504. doi: 10.1007/s00441-006-0266-5.

- Garrido Sanabria, E. R. *et al.* (2004) “GCP II (NAALADase) Inhibition Suppresses Mossy Fiber-CA3 Synaptic Neurotransmission by a Presynaptic Mechanism”, *Journal of Neurophysiology*, 91(1), pp. 182–193. doi: 10.1152/jn.00465.2003.
- Gloveli, T. *et al.* (2005) “Differential involvement of oriens/pyramidal interneurons in hippocampal network oscillations in vitro”, *Journal of Physiology*, 562(1), pp. 131–147. doi: 10.1113/jphysiol.2004.073007.
- Gottmann, K., Mittmann, T. y Lessmann, V. (2009) “BDNF signaling in the formation, maturation and plasticity of glutamatergic and GABAergic synapses”, *Experimental Brain Research*, 199(3–4), pp. 203–234. doi: 10.1007/s00221-009-1994-z.
- Griego, E. *et al.* (2021) “Functional expression of TrkB receptors on interneurons and pyramidal cells of area CA3 of the rat hippocampus”, *Neuropharmacology*, 182(October 2020). doi: 10.1016/j.neuropharm.2020.108379.
- Harris, E. W. y Cotman, C. W. (1986) “Long-term potentiation of guinea pig mossy fiber responses is not blocked by N-methyl d-aspartate antagonists”, *Neuroscience Letters*, 70(1), pp. 132–137. doi: 10.1016/0304-3940(86)90451-9.
- Henze, D. A., Urban, N. N. y Barrionuevo, G. (2000) “The multifarious hippocampal mossy fiber pathway: A review”, *Neuroscience*, 98(3), pp. 407–427. doi: 10.1016/S0306-4522(00)00146-9.
- Jang, S. W. *et al.* (2010) “A selective TrkB agonist with potent neurotrophic activities by 7,8-dihydroxyflavone”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(6), pp. 2687–2692. doi: 10.1073/pnas.0913572107.
- Johnston, D. y G. Amaral, D. (1998) “Hippocampus”, en M. Shepherd, G. (ed.) *The Synaptic Organization of the Brain*. Fifth. New York, pp. 455–498.
- Joseph-Hernandez, S. *et al.* (2017) “Neurotrophin receptor agonists and antagonists as therapeutic agents: An evolving paradigm”, *Neurobiology of Disease*. Elsevier B.V., 97, pp. 139–155. doi: 10.1016/j.nbd.2016.08.004.
- Kamiya, H. y Ozawa, S. (1999) “Dual mechanism for presynaptic modulation by axonal metabotropic glutamate receptor at the mouse mossy fibre-CAS synapse”, *Journal of Physiology*, 518(2), pp. 497–506. doi: 10.1111/j.1469-7793.1999.0497p.x.
- Klein, R. *et al.* (1989) “trkB, a novel tyrosine protein kinase receptor expressed during mouse neural development”, *EMBO Journal*, 8(12), pp. 3701–3709. doi: 10.1002/j.1460-2075.1989.tb08545.x.
- Kobayashi, K. y Suzuki, H. (2018) “Synapse-selective rapid potentiation of hippocampal synaptic transmission by 7,8-dihydroxyflavone”, *Neuropsychopharmacology Reports*, 38(4), pp. 197–203. doi: 10.1002/npr2.12033.
- Korte, M. *et al.* (1998) “A role for BDNF in the late-phase of hippocampal long-term potentiation”, *Neuropharmacology*, 37(4–5), pp. 553–559. doi: 10.1016/S0028-

3908(98)00035-5.

Kovalchuk, Y. *et al.* (2002) “Postsynaptic induction of BDNF-mediated long-term potentiation”, *Science*, 295(5560), pp. 1729–1734. doi: 10.1126/science.1067766.

Langdon, R. B., Johnson, J. W. y Barrionuevo, G. (1995) “Posttetanic potentiation and presynaptically induced long-term potentiation at the mossy fiber synapse in rat hippocampus”, *Journal of Neurobiology*, 26(3), pp. 370–385. doi: 10.1002/neu.480260309.

Leal, G., Bramham, C. R. y Duarte, C. B. (2017) *BDNF and Hippocampal Synaptic Plasticity*. 1a ed, *Vitamins and Hormones*. 1a ed. Elsevier Inc. doi: 10.1016/bs.vh.2016.10.004.

Lin, P. Y., Kavalali, E. T. y Monteggia, L. M. (2018) “Genetic Dissection of Presynaptic and Postsynaptic BDNF-TrkB Signaling in Synaptic Efficacy of CA3-CA1 Synapses”, *Cell Reports*. Elsevier Company., 24(6), pp. 1550–1561. doi: 10.1016/j.celrep.2018.07.020.

Mcnamara, J. O. y Scharfman, H. E. (2012) “Temporal Lobe Epilepsy and the BDNF Receptor, TrkB Jasper’s Basic Mechanisms of the Epilepsies”, *Jasper’s Basic Mechanisms of the Epilepsies*, pp. 1–29.

Minichiello, L. (2009) “TrkB signalling pathways in LTP and learning”, *Nature Reviews Neuroscience*. Nature Publishing Group, 10(12), pp. 850–860. doi: 10.1038/nrn2738.

Moser, E. I. (2011) “The multi-laned hippocampus”, *Nature Neuroscience*. Nature Publishing Group, 14(4), pp. 407–408. doi: 10.1038/nn.2783.

Murray, K. D. *et al.* (2000) “Altered mRNA expression for brain-derived neurotrophic factor and type II calcium/calmodulin-dependent protein kinase in the hippocampus of patients with intractable temporal lobe epilepsy”, *Journal of Comparative Neurology*, 418(4), pp. 411–422. doi: 10.1002/(SICI)1096-9861(20000320)418:4<411::AID-CNE4>3.0.CO;2-F.

Nicoll, R. A. y Schmitz, D. (2005) “Synaptic plasticity at hippocampal mossy fibre synapses”, *Nature Reviews Neuroscience*, 6(11), pp. 863–876. doi: 10.1038/nrn1786.

Patterson, S. L. *et al.* (1992) “Neurotrophin expression in rat hippocampal slices: A stimulus paradigm inducing LTP in CA1 evokes increases in BDNF and NT-3 mRNAs”, *Neuron*, 9(6), pp. 1081–1088. doi: 10.1016/0896-6273(92)90067-N.

Rebola, N., Carta, M. y Mulle, C. (2017) “Operation and plasticity of hippocampal CA3 circuits: Implications for memory encoding”, *Nature Reviews Neuroscience*. Nature Publishing Group, 18(4), pp. 209–221. doi: 10.1038/nrn.2017.10.

Rex, C. S. *et al.* (2006) “Restoration of long-term potentiation in middle-aged hippocampus after induction of brain-derived neurotrophic factor”, *Journal of Neurophysiology*, 96(2), pp. 677–685. doi: 10.1152/jn.00336.2006.

- Schildt, S. *et al.* (2013) “Acute and chronic interference with BDNF/TrkB-signaling impair LTP selectively at mossy fiber synapses in the CA3 region of mouse hippocampus”, *Neuropharmacology*. Elsevier Ltd, 71, pp. 247–254. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.03.041.
- Shinoda, Y. *et al.* (2019) “Aspects of excitatory/inhibitory synapses in multiple brain regions are correlated with levels of brain-derived neurotrophic factor/neurotrophin-3”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Elsevier Ltd, 509(2), pp. 429–434. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.12.100.
- Tarigan, P. B. (2013) *The Neurobiology of Learning and Memory*, *Journal of Chemical Information and Modeling*. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.
- Tecuatl, C. *et al.* (2018) “TrkB-mediated activation of the phosphatidylinositol-3-kinase/Akt cascade reduces the damage inflicted by oxygen–glucose deprivation in area CA3 of the rat hippocampus”, *European Journal of Neuroscience*, 47(9), pp. 1096–1109. doi: 10.1111/ejn.13880.
- Urban, N. N. y Barrionuevo, G. (1996) “Induction of Hebbian and non-Hebbian mossy fiber long-term potentiation by distinct patterns of high-frequency stimulation”, *Journal of Neuroscience*, 16(13), pp. 4293–4299. doi: 10.1523/jneurosci.16-13-04293.1996.
- Whitlock, J. R. *et al.* (2006) “Learning induces long-term potentiation in the hippocampus”, *Science*, 313(5790), pp. 1093–1097. doi: 10.1126/science.1128134.
- Yeckel, M. F., Kapur, A. y Johnston, D. (1999) “Multiple forms of LTP in hippocampal CA3 neurons use a common postsynaptic mechanism”, *Nature Neuroscience*, 2(7), pp. 625–633. doi: 10.1038/10180.
- Yi, F. *et al.* (2015) “Hippocampal ‘cholinergic interneurons’ visualized with the choline acetyltransferase promoter: Anatomical distribution, intrinsic membrane properties, neurochemical characteristics, and capacity for cholinergic modulation”, *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 7(MAR), pp. 1–18. doi: 10.3389/fnsyn.2015.00004.
- Ying, S. W. *et al.* (2002) “Brain-derived neurotrophic factor induces long-term potentiation in intact adult hippocampus: Requirement for ERK activation coupled to CREB and upregulation of Arc synthesis”, *Journal of Neuroscience*, 22(5), pp. 1532–1540. doi: 10.1523/jneurosci.22-05-01532.2002.
- Zalutsky, R. A. y Nicoll, R. A. (1990) “Comparison of two forms of long-term potentiation in single hippocampal neurons”, *Science*, 248(4963), pp. 1619–1624. doi: 10.1126/science.2114039.
- Zucker, R. S. y Regehr, W. G. (2002) “Short-Term Synaptic Plasticity”, *Annual Review of Physiology*, 64(1), pp. 355–405. doi: 10.1146/annurev.physiol.64.092501.114547.