



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ciencias Naturales

COA  
CULT  
IBAL

**PAPEL DE LA D-SERINA EN LA LTP INDUCIDA POR NICOTINA EN EL HIPOCAMPO DE LA RATA**

**TESIS INDIVIDUAL**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

**Licenciado en Biología**

**Presenta:**

Reynaldo Abraham Alvarado Martínez

**Dirigido por:**

cDra. Mónica Andrea López Hidalgo

**SINODALES**

cDra. Mónica Andrea López Hidalgo  
Presidente

\_\_\_\_\_  
Firma

Dr. Carlos Isaac Silva Barrón  
Secretario

\_\_\_\_\_  
Firma

Dr. Rogelio Arellano Ostoa  
Suplente

\_\_\_\_\_  
Firma

M en C. Rocío Enriqueta Medina Torres  
Suplente

\_\_\_\_\_  
Firma

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
Mayo de 2010  
México.



## **Dedicatorias**

A mis Padres

A mis hermanos

## **Agradecimientos**

A la UNAM por el apoyo del DGAPA-PAPIIT con número 1N204809-20.

Al CONACyT por el apoyo a este proyecto con número 81911, 102951

Al Dr. José Jesús García Colunga, por permitir realizar este proyecto, al igual que el servicio social en su laboratorio. Por las atenciones prestadas para la elaboración exitosa de los mismos.

A mi directora cDra. Mónica Andréa López Hidalgo, por su paciencia, atención y por su incansable convicción de realizar las cosas de la mejor forma posible, por sus incontables comentarios y sugerencias a lo largo de 2 años.

A mis revisores Dr. Carlos Isaac Silva Barrón, Dr, Rogelio Arellano Ostoa y la M. en C. Roció Enriqueta Medina Torres, por su valioso tiempo invertido en la revisión de este proyecto y por sus acertados comentarios.

Al MVZ. José Martín García Servín encargado del bioterio del Instituto de Neurobiología de la UNAM

A mis padres, Reynaldo Alvarado Villegas y Angélica María Martínez Lira por sus consejos, su sabiduría y el apoyo incondicional que me brindaron, lo que me permitió realizar con éxito este proyecto académico y personal.

A mis hermanos Abigail Alvarado Martínez, Juan Pablo Alvarado Martínez y Luis Ángel Alvarado Martínez por ser siempre una motivación en mi superación personal y profesional.

A mis Tíos Jesús Ángel Martínez Lira y Norma del Carmen Muñoz Madrigal, a mis primos Tania Martínez Muñoz, Jesús Antonio Martínez Muñoz y Daniela Sofía Martínez Muñoz por abrirme las puertas de su hogar, así como todas las facilidades y comodidades que me brindaron a lo largo de estos 5 años en toda mi formación universitaria.

A mis profesores de la licenciatura que me formaron con solidas bases de biología.

A los grandes amigos con que cuento en León y ahora también en Querétaro, por ayudar a sobrellevar las tensiones de la vida universitaria tanto a nivel académico como personal.

## RESUMEN

La potenciación de larga duración (LTP) es considerada como la base celular y molecular que subyace a los procesos de memoria y aprendizaje. Aunque por muchos años prevaleció la idea de que solo las neuronas eran importantes para la inducción de la LTP, estudios recientes han mostrado que los astrocitos (el principal tipo de célula glial del SNC) juegan un papel determinante en la inducción de la LTP producida por una estimulación de alta frecuencia. Esto se debe a que los astrocitos son capaces de liberar sustancias químicas como el glutamato y D-serina entre otros que modulan las respuestas sinápticas.

La nicotina (Nic) es el principal componente del tabaco, capaz de inducir por sí sola una LTP en el hipocampo de la rata. A pesar de que sus efectos han sido explicados tomando en cuenta únicamente a las neuronas, la presencia de receptores nicotínicos en los astrocitos abrió la posibilidad de que estos pudieran estar mediando los efectos de la Nic como sucede en otros tipos de plasticidad. El objetivo de este trabajo fue el de analizar si la D-ser (un transmisor sintetizado principalmente por los astrocitos y que modula a los receptores NMDA) participaba en la LTP inducida por Nic. Para esto, se obtuvieron rebanadas de hipocampo de ratas macho de la cepa Wistar. Se registraron los potenciales de campo (fEPSP) producidos por la estimulación de las C. Sch., se aplicó Nic (1 $\mu$ M) para inducir la LTP y se probó el efecto del AP-5 (antagonista del sitio a glutamato de los NMDAR, 50 $\mu$ M), también del DCKA (antagonista del sitio de unión a glicina de los NMDAR, 200nM) y el de D-serina (un agonista del sitio de unión a glicina, 20 $\mu$ M). La aplicación de AP-5 provocó la inhibición de la LTP inducida por Nic, la cual se restauró al lavar la droga. El DCKA bloqueó por completo la inducción de Nic además de producir una disminución gradual en la eficiencia sináptica al finalizar el registro (depresión de los fEPSPs). Por su parte la aplicación de D-ser previo a la aplicación de Nic, produjo una LTP superior a la inducida únicamente por Nic. Estos resultados en conjunto sugieren que a través de la modulación de los NMDAR, la D-ser liberada por los astrocitos participa en la LTP inducida por Nic.

(Palabras Clave: Astrocitos, D-serina; Nicotina; LTP; hipocampo)

## ABSTRACT

The long-term potentiation (LTP) is considered as the cellular basis underlying the learning and memory processes. Although for many years prevailed the idea that only neurons were important for the induction of LTP, recent studies have shown that astrocytes (the main type of glial cell in the central nervous system) plays a role in the induction of LTP produced by high-frequency stimulation, due to release of transmitters such as glutamate and D-serine (D-ser) among others that in turn modulates synaptic responses.

Nicotine (Nic) is the main component of tobacco, that is able to induce (by itself) LTP in the hippocampus of the rat. Although this effects have been explained taking into account only the neurons, the presence of nicotinic receptors in astrocytes suggested that these could be mediating the effects of Nic as in other types of plasticity. The aim of the present work was to examine whether D-ser (a transmitter synthesized mainly by astrocytes acting on NMDA receptors) are involved in the Nic-induced LTP. To do that, hippocampal slices were obtained from male Wistar rats (120 g). Field potentials (fEPSP) produced by Schaffer collaterals stimulation were recorded and Nic was applied ( $1\mu\text{M}$ ) to induce LTP. The effect of an antagonist of NMDAR (AP-5,  $50\mu\text{M}$ ), an antagonist of the glycine binding site of NMDAR (DCKA,  $200\text{nm}$ ) and an agonist of glycine binding site (D-ser,  $20\mu\text{M}$ ) were tested. During AP-5 application the long-lasting increase of fEPSPs was not observed, but was restored immediately after the drug was washed. The DCKA application completely blocked the induction of Nic and produced a gradual decrease in synaptic efficiency at the end of the recordings (short term depression). The D-ser administration prior to Nic, produced an increase in the magnitude of LTP in compare to Nic. Our results indicate that, through NMDAR modulation, astrocytic D-serine participates in the Nic-induced LTP.

(Keywords: Astrocytes; D-serine; Nicotine; LTP; hippocampus)

## ÍNDICE

Resumen .....	iii
Abstract .....	iv
Índice .....	v
Índice de figuras .....	vi
Abreviaturas.....	vii
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. ANTECEDENTES .....	3
Hipocampo .....	3
Organización anatómica del hipocampo .....	4
Transmisión sináptica en la región CA1 .....	5
Plasticidad sináptica en la región CA1 del hipocampo .....	8
Acetilcolina y nicotina .....	11
Células gliales .....	13
Astrocitos y transmisión sináptica .....	14
Receptores astrocíticos .....	14
Excitabilidad astrocítica .....	14
Gliotransmisores y su liberación .....	16
Comunicación astrocito-neurona .....	16
Astrocitos y potenciación de larga duración en el hipocampo .....	18
III. HIPÓTESIS .....	19
IV. OBJETIVO GENERAL .....	19
V. OBJETIVOS PARTICULARES.....	19
VI. METODOLOGÍA .....	20
VII. RESULTADOS .....	23
VIII. DISCUSIÓN .....	29
IX. CONCLUSIONES.....	32
X. ANEXOS.....	33
XI. BIBLIOGRAFÍA .....	39

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
Figura 1. Localización del hipocampo en el cerebro de la rata y diagrama del circuito hipocampal.	3
Figura 2. Organización y distribución de las capas de la formación hipocampal.	4
Figura 3. Representación de un receptor NMDA.	7
Figura 4. Esquema de los mecanismos celulares que intervienen en la inducción de la potenciación de larga duración en la región CA1 del hipocampo.	9
Figura 5. Propiedades de la potenciación de larga duración en neuronas de la región CA1 del hipocampo.	11
Figura 6. Modelos propuestos de la propagación de ondas de calcio en los astrocitos.	15
Figura 7. Sinapsis tripartita en el hipocampo.	17
Figura 8. Diagrama del registro electrofisiológico.	21
Figura 9. Efecto de la nicotina sobre la transmisión sináptica.	24
Figura 10. Efecto del AP-5 sobre la LTP inducida por nicotina.	25
Figura 11. Efecto del DCKA sobre la LTP inducida por nicotina.	26
Figura 12. Efecto de la D-serina sobre la LTP inducida por nicotina.	28
Figura 13. Proteínas propuestas en la participación en la excitotoxicidad de las neuronas y los astrocitos.	34
Figura 14.- Variación en la proporción P2/P1 en relación al intervalo de tiempo entre el pulso 1 y el pulso 2.	38

## Abreviaturas

AMPAR	A-amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol-propionato
AP-5	Ácido 2-amino-5-fosfonovaleriánico
C.Sch.	Colaterales de Schaffer
Ca <sup>2+</sup>	Calcio
DAAO	Ácido D-amino oxidasa
D-ser	D-serina
FCA	Líquido ceforraquídeo artificial
fEPSPs	Potenciales postsinápticos excitatorios de campo
K <sup>+</sup>	Potasio
LTP	Potenciación de larga duración (Long-term potentiation)
mAChR	Receptores metabotrópicos
MFA	Mono Fluoracetato de sodio
DCKA	Ácido 5-7-diclorokynurenico
Mg <sup>2+</sup>	Magnesio
Na <sup>+</sup>	Sodio
nAChR	Receptores nicotínicos
Nic	Nicotina
NMDAR	N-metil D-aspartato
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico

## I. INTRODUCCIÓN

La nicotina (Nic) es el principal alcaloide del tabaco (*Nicotiana tabacum*) que desencadena el estado de dependencia hacia el tabaco. Se absorbe principalmente a nivel broncopulmonar debido a que presenta una mayor superficie de contacto. Su absorción y distribución es muy rápida, alrededor del 90% se absorbe en las mucosas y 7 segundos después es posible detectar la nicotina en el cerebro (Calabig & Villanueva, 2004). La Nic se une a los receptores para acetilcolina de tipo nicotínicos (nAChrs), provocando una amplia gama de efectos en el sistema nervioso periférico y central (Lewis et al., 2004). Pese a los efectos adversos con los que se relaciona el uso del tabaco, diversas pruebas conductuales en ratas y humanos han demostrado un mejoramiento en la ejecución de las tareas relacionadas con atención, el aprendizaje y la memoria entre otros (Lynch 2004; Morris et al., 1986; Sigurdsson, 2007).

El hipocampo es una estructura cerebral relacionada con la atención y consolidación de la memoria, así mismo, es una estructura con una alta innervación colinérgica y por ende sitio de acción de la Nic (Taupin, 2007; Vizi & Lendvai, 1999). De esta manera, alteraciones en el funcionamiento de los receptores nicotínicos del hipocampo se han relacionados con la aparición de trastornos como el Alzheimer y la esquizofrenia (Nordberg, 2001; Levin, 2002). Por lo que no es de extrañarse que la administración de Nic en estos padecimientos, tenga efectos positivos en sujetos que presentan dichos trastornos (Oddo & LaFerla, 2006; Birks 2006). La comprensión de la modulación que ejerce la Nic en el hipocampo puede facilitar el desarrollo de nuevas terapias para tratar estos desórdenes.

Debido a las características de los circuitos del hipocampo, éste ha sido un buen modelo en el estudio de la comunicación sináptica y de los procesos plásticos que ocurren en él (Taupin 2007). El modelo de plasticidad sináptica, considerado como la base celular y molecular que subyace a los procesos de aprendizaje y memoria, es la potenciación de larga duración (LTP por sus siglas en inglés). Diversos fármacos pueden bloquear, facilitar o modular la generación de la LTP. En este sentido, se ha demostrado que en el

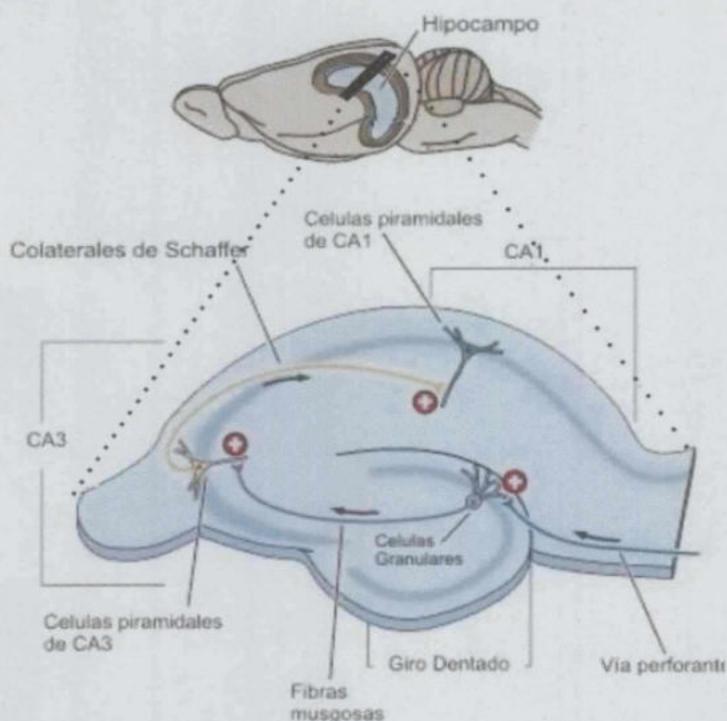
hipocampo, la Nic puede facilitar la inducción de la LTP (Kenney & Gould, 2008).

Los efectos de la Nic en el hipocampo (y en general en el SNC) han sido explicados hasta ahora tomando en cuenta únicamente a las neuronas (pre y postsinápticas). Sin embargo, estudios recientes han mostrado que los astrocitos (un tipo de célula glial) expresan también receptores a la Nic (Graham et al, 2003; Gahring et al., 2004) y que la activación de estos produce respuestas celulares en el astrocito (Sharma & Vijayaraghavan, 2001; Sontheimer & Waxman, 1993; Dani 2001). Estos hallazgos adquieren relevancia, si entendemos que el 60% de las sinapsis del hipocampo se encuentran rodeadas por astrocitos (Ventura & Harris, 1999) y que en otras estructuras como la corteza, el hipotálamo y la médula espinal así como en el mismo hipocampo, se ha mostrado que los astrocitos son capaces de regular la comunicación neuronal y la plasticidad sináptica (Yang et al., 2003). En este contexto, el presente trabajo pretende analizar si en los efectos de la Nic sobre la transmisión sináptica y la LTP en la región CA1 participan los astrocitos.

## II. ANTECEDENTES

### Hipocampo

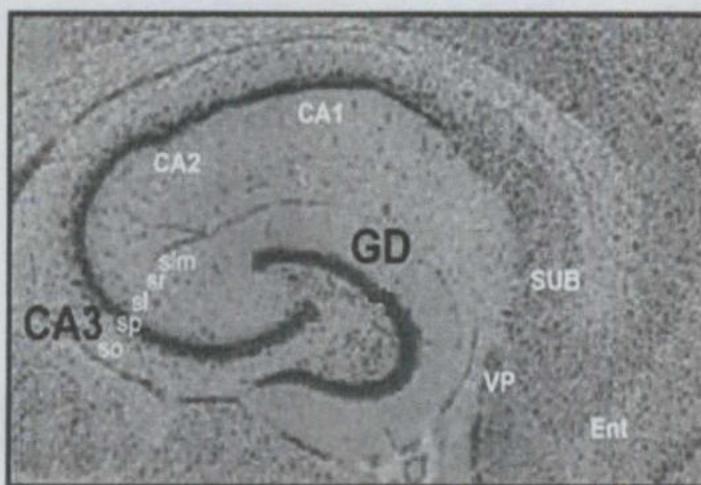
La formación hipocampal debe su nombre al parecido con el caballo de mar. Es una estructura cerebral bilaminar, simétrica que forma parte del sistema límbico y que participa en la formación, consolidación y recuperación de la memoria. En la rata está localizada dentro del lóbulo temporal, en la parte medial del cerebro en posición rostro-caudal (Cajal 1911). La formación hipocampal está compuesta por el giro dentado, el asta de Ammon o hipocampo (*cornu Ammonis*; CA), el *subiculum* (pre y parasubiculum), y la corteza entorrinal (Figura 1) (Cajal 1911).



**Figura 1. Localización del hipocampo en el cerebro de la rata y diagrama del circuito hipocampal.** Esquema del hipocampo dorsal de la rata en el cual se puede apreciar el circuito trisináptico unidireccional (Modificado de Purves et al., 2005).

## Organización anatómica del hipocampo

El hipocampo es una de las estructuras filogenéticamente más conservadas en el cerebro. Está organizado en seis capas: El *alveus*, el *stratum oriens*, el *stratum pyramidale*, el *stratum radiatum* y el *stratum lacunosum/moleculare* (Duvernoy 2005). En 1934 Lorente de No, basado en las tinciones de Golgi, dividió al hipocampo en 4 regiones: CA1, CA2, CA3 y CA4 (Taupin 2007). La región CA1 se encuentra adyacente al *subiculum*, CA3 se localiza contigua a la fimbria y al plexo coroideo, CA2 se sitúa entre estas 2 regiones y CA4 está localizada en el hilus del giro dentado (Dupuy & Houser, 1997) (Figura 2).



**Figura 2. Organización y distribución de las capas de la formación hipocampal.** GD, Giro dentado; CA3, cornus Ammonis; so, stratum oriens; sp, stratum piramidale; sl, el stratum lacunosum; sr, stratum radiatum; slm, stratum lacunosum-moleculare. Ent, corteza entorrinal; SUB, el subiculum; VP, vía perforante (modificado de Paxinos & Watson, 1998).

El hipocampo recibe aferencias de diversas áreas cerebrales vecinas dentro de las que destacan el hipotálamo, el núcleo septal mediano y la corteza entorrinal siendo esta última la principal aferencia (Taupin 2007). El hipocampo posee un patrón único de conectividad cuya principal vía está organizada en un circuito trisináptico laminar que viaja a lo largo de la lámina de todo su eje (Owens et. Al, 1996; Khaliloy et. al, 1999; Leinekugel et. al, 1999). La primera conexión corresponde a las proyecciones de las células piramidales (fibras perforantes) de la capa II de la corteza entorrinal (Taupin 2007). Estas fibras, corren a través del *stratum moleculare* y proyectan a las células granulares del

giro dentado. Las células granulares proyectan a través de las fibras musgosas a las dendritas de las células piramidales de la región CA3, formando la segunda conexión del circuito (Taupin 2007; Amaral & Lavanex, 2007). Las proyecciones de las células piramidales de CA3 (colaterales de Schaeffer) viajan por el *stratum radiatum* y *stratum oriens* en donde hacen contacto con las piramidales de CA1, las cuales forman la tercera conexión del circuito trisináptico del hipocampo (Taupin 2007; Amaral & Lavanex, 2007) (Figura 1 y 2). Finalmente, los axones de las células piramidales viajan por la capa del *alveus* hacia la fimbria, siendo esta la eferencia más importante del hipocampo (Taupin 2007)

### Transmisión Sináptica en la región CA1

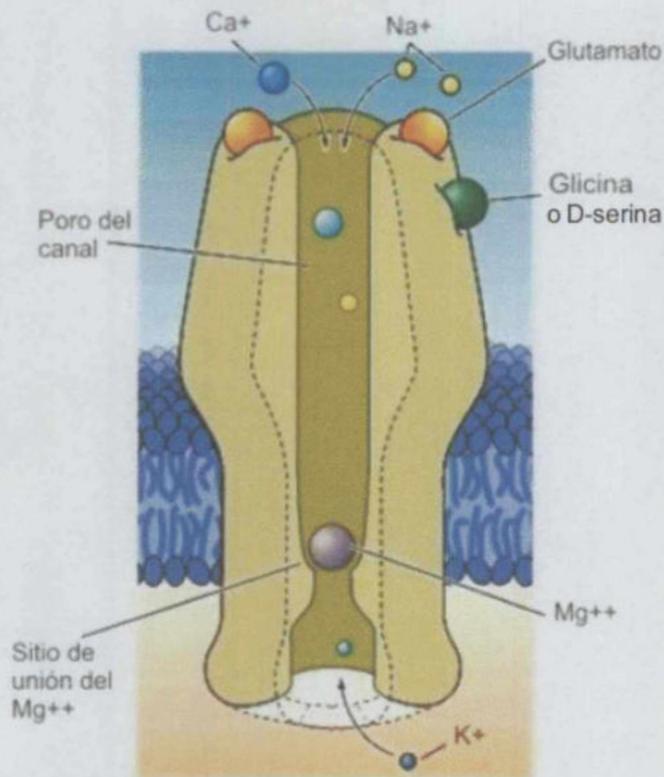
La región CA1 ha sido ampliamente estudiada por ser el último relevo del circuito trisináptico del hipocampo y principal salida de la información (Taupin 2007). Las colaterales de Schaffer (C. Sch.) liberan principalmente glutamato en las sinapsis con las piramidales de CA1 (Seeburg 2007). Por su parte las piramidales de CA1 expresan una amplia variedad de receptores posinápticos a glutamato tanto metabotrópicos como ionotrópicos, entre los que destacan los receptores glutamatérgicos AMPA, kainato y NMDA (Bliss & Fazeli, 1996).

Los receptores AMPA (AMPA) son proteínas compuestas por 5 subunidades (GluR1, GluR2, GluR3 y GluR4) codificadas por cuatro genes. Las combinaciones de estas subunidades les confieren propiedades diferentes. Por ejemplo, la ausencia de GluR2 incrementa significativamente la permeabilidad a  $\text{Na}^+$  de los AMPAR. En la región CA1, se expresan únicamente GluR1, GluR2 y GluR4 (Seeburg, 2007; Anwyl, 1996) por lo que el principal ión que pasa por este canal es el  $\text{Na}^+$ . Estos canales poseen una gran afinidad al glutamato y una alta probabilidad de activación, lo que les confiere un papel esencial en la transmisión sináptica, ya que es mediada principalmente por estos receptores (Kullmann, 2007).

Los receptores a Kainato son estructuras tetraméricas compuestas por subunidades GluR5, GluR6, GluR7, KA1 y KA2. La distribución de los

receptores a Kainato en CA1, es mucho menor con respecto a los AMPAR. En las piramidales de CA1 se encuentran exclusivamente los receptores conformados por las subunidades GluR6 y KA2, los cuales son principalmente permeables a  $\text{Na}^+$  (Wisden et al. 2000). El papel de los receptores a kainato en la transmisión sináptica suele ser similar a la de los receptores AMPA, sin embargo, presentan diferencias ya que las corrientes mediadas por los receptores a kainato son menores y generalmente requiere de fuertes estímulos para su activación (e.g. trenes de estimulación de alta frecuencia) (Kullmann 2007).

Los receptores NMDA están formados por 5 subunidades (NR1, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D, NR3A y NR3B) codificadas por siete genes. En las subunidades NR1 y NR2, se encuentra el sitio de unión del co-agonista (glicina o D-serina), por lo que la ausencia de la subunidad NR1 genera NMDAR que no son funcionales (Forrest et al., 1994). La subunidad NR2 posee el sitio de unión a glutamato. En particular la subunidad NR2B, determina el perfil electrofisiológico y farmacológico del canal, ya que determina el tiempo de apertura del canal, la conductancia y la sensibilidad al  $\text{Mg}^{2+}$  (Kullmann 2007). Con la excepción del subtipo NR3B, todos los otros subtipos de NMDAR se expresan en el hipocampo (Kullmann 2007). A diferencia de los AMPAR el poro del canal se encuentra bloqueado por  $\text{Mg}^{2+}$ , por lo que es necesario que la membrana se despolarice para que el  $\text{Mg}^{2+}$  se remueva y esto permita el paso de los iones (Dingledine et al., 1999) (Figura 3).



**Figura 3. Representación de un receptor NMDA.** Se puede observar el sitio de unión para glutamato y del co-agonista Glicina o D-serina. En condiciones de reposo, el  $Mg^{2+}$  se encuentra bloqueando el poro del canal que permite el paso de  $Na^+$ ,  $Ca^{+2}$  y  $K^+$  (Modificada de Purves et al., 2005).

Los receptores metabotrópicos a glutamato (mGluRs) están acoplados a proteínas G las cuales pueden modular la liberación de glutamato y la excitabilidad neuronal (Seburg, 2007). Todos los genes de las subunidades de los mGluR con excepción de la subunidad mGluR6 son expresados en el hipocampo. (Seburg, 2007). Con base en sus propiedades farmacológicas y funcionales, la familia de los mGluRs se subdivide en 3 grupos: grupo I (mGluR1 y 5), grupo II (mGluR2 y 3) y III (mGluR4, 6, 7 y 8) (Shigemoto et al., 1997). La activación del grupo I desencadena la producción trifosfato de inositol (IP3), promoviendo la liberación de  $Ca^{+2}$  de los reservorios, facilitando la excitabilidad de las neuronas postsinápticas. Por el contrario, la activación de los grupos II y III, disminuye la liberación de neurotransmisor a través de la inhibición de la producción de AMPc y de los canales de  $Ca^{+2}$  dependientes de voltaje, interfiriendo directamente en la maquinaria de liberación (Seburg, 2007).

## Plasticidad sináptica en la región CA1 del hipocampo

El término de "plasticidad sináptica" fue propuesto por el psicólogo polaco Jerzy Konorski en 1948, el cual dijo que la actividad persistente conduce a cambios en la eficiencia sináptica. En 1949, Donald Hebb retomó esta idea y postuló lo siguiente:

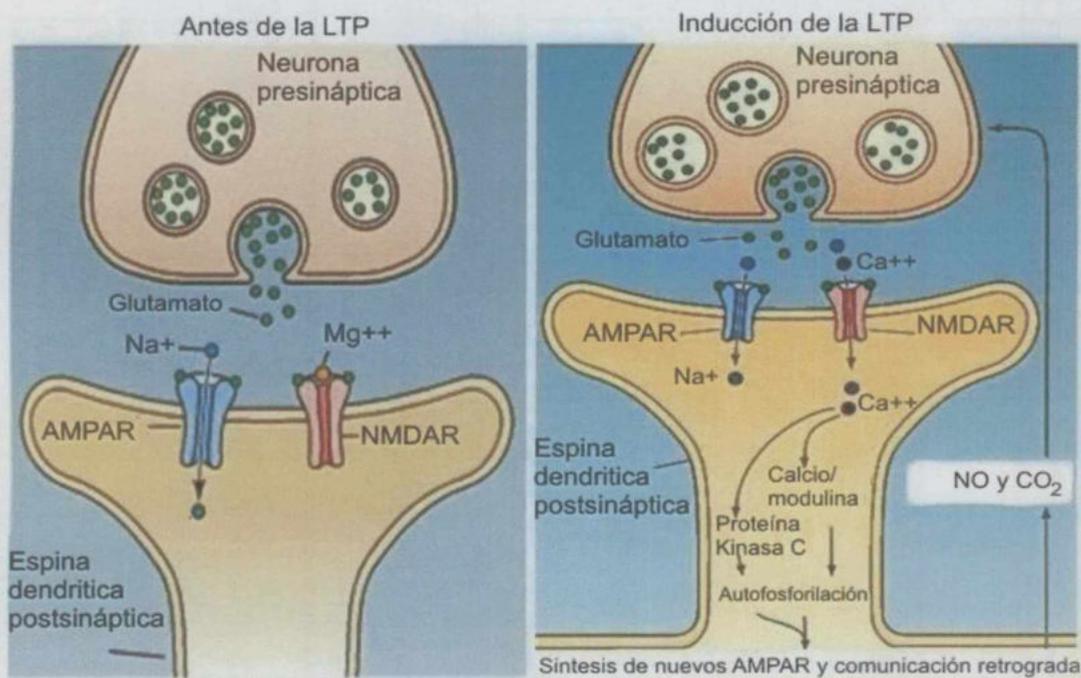
"Cuando el axón de una célula A está lo suficientemente cerca como para excitar a una célula B repetidamente, ocurren procesos de crecimiento o cambios metabólicos en una o ambas células de manera que tanto la eficiencia de la célula A, como la capacidad de excitación de la célula B son aumentadas"

En particular, las sinapsis del hipocampo tienen una alta capacidad de responder a patrones específicos de activación por lo que son altamente plásticas. En 1973 un trabajo publicado por Bliss & Lomo, aportó las primeras evidencias de un cambio en la eficiencia sináptica en un circuito neuronal. Los experimentos se enfocaron en la estimulación y el registro bilateral, de la vía perforante y células granulares del giro dentado respectivamente, del hipocampo del conejo (Bliss & Lomo, 1973). El estudio de la transmisión eléctrica bilateral por medio de una HFS (150 pulsos por 1s) con diferentes tiempo de inducción, provocó el incremento de la amplitud de los EPSPs (mv), así como la disminución de la latencia del registro (ms), estos resultados indican un cambio en la excitabilidad de las células granulares del hipocampo (Bliss & Lomo, 1973). Al incremento en la excitabilidad fue denominado potenciación de larga duración (LTP por sus siglas en ingles), ya que éste incremento se mantuvo por horas implicando un reforzamiento en el circuito neuronal (Bliss & Lomo, 1973).

La LTP inducida por una HFS, ha sido utilizada como un modelo para conocer los procesos neuroquímicos y biofísicos que participan en la plasticidad sináptica (Bliss y Collingridge, 1993). La generación de la LTP en el hipocampo depende de mecanismos pre y postsinápticos (Morris, 1988; Kandel, et al., 1991). La estimulación constante y prolongada de las C. Sch. produce la liberación de glutamato hacia la hendidura sináptica activando los AMPAR de las piramidales de CA1 (Seeburg, 2007). La activación de los

AMPA produce una despolarización (generada por la entrada de  $\text{Na}^+$ ) lo suficientemente fuerte como para remover el  $\text{Mg}^{2+}$  del poro de los NMDAR y permitiendo el flujo de iones a través de estos (Ikeszu y Gendelman, 2008; Benke et al., 1996; Ascher y Nowak, 1988).

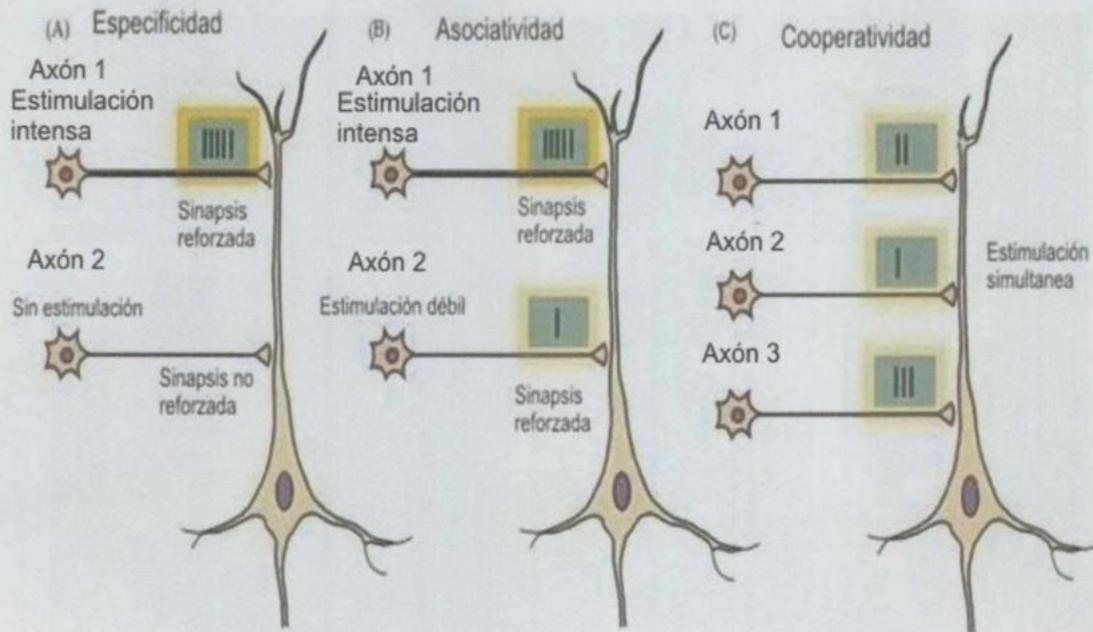
La activación de los NMDAR es importante para la inducción de la LTP ya que el  $\text{Ca}^{2+}$  que fluye a través de estos receptores permite la activación de diversas vías de señalización. En particular, el  $\text{Ca}^{2+}$  se une a la proteína  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina quinasa II (CaMKII) que promueve la inserción y síntesis de novo de AMPAR y NMDAR hacia la membrana (Ikeszu & Gendelman, 2008). Este incremento permite la formación de óxido nítrico, el cual actúa sobre la presinápsis promoviendo la liberación del glutamato por parte de las C. Sch. (Roberson et al., 1996; Schuman & Madison, 1994) (Figura 4).



**Figura 4. Esquema de los mecanismos celulares que intervienen en la inducción de la potenciación de larga duración en la región CA1 del hipocampo.** A, La transmisión sináptica basal está mediada por los receptores AMPA (AMPA). B, Al despolarizarse la membrana de la neurona postsináptica, el  $\text{Mg}^{2+}$  deja de bloquear el poro permitiendo el paso de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{K}^+$  a través de los receptores NMDA (NMDAR). El incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  facilita la síntesis de novo de AMPAR y la síntesis de óxido nítrico (NO) y  $\text{CO}_2$  que promueven la liberación de glutamato (Kandel, 2002).

Desde hace varios años ha sido aceptado que la LTP es la base funcional que subyace a los procesos de aprendizaje y memoria. Esto se fundamenta en cuatro puntos principalmente 1) la LTP se induce fácilmente en el hipocampo, un área estrechamente relacionada con la adquisición de la memoria (Lynch, 2004); 2) las descargas rítmicas que inducen la LTP son similares al ritmo teta que se registra en el hipocampo durante una conducta exploratoria (Diamond et al., 1988; Larson et al., 1986); 3) Los inhibidores de la LTP del hipocampo, también bloquean la adquisición y retención en tareas exploratorias (Morris et al., 1986); y 4) Diversos cambios bioquímicos que ocurren después de la inducción de la LTP, también ocurren durante la adquisición de la memoria (Lynch, 2004).

Existen tres características de la LTP en el hipocampo, la cooperatividad, la asociatividad y la especificidad (Abraham et al., 1994) (Figura 6). La LTP que se genera en las colaterales de Schaffer, requiere de la activación simultánea de distintos axones aferentes (cooperatividad). Como segundo aspecto se requiere que haya actividad concomitante tanto de las neuronas presinápticas como de las postsinápticas (asociatividad). Como resultado de los otros dos aspectos, el establecimiento de la LTP se restringe a las sinapsis estimuladas (especificidad) (Abraham et al., 1994) (Figura 6).



**Figura 5. Propiedades de la potenciación de larga duración en neuronas de la región CA1 del hipocampo.** Efecto de la estimulación de las colaterales de Schaeffer (glutamatérgicas) sobre diferentes tipos de plasticidad. **A**, Especificidad, la estimulación intensa del axón 1 produce un incremento en la fuerza sináptica del axón 1 sin afectar la fuerza sináptica del axón 2. **B**, Asociatividad, si al igual que en A, se estimula el axón 1, pero al mismo tiempo se da una estimulación débil en el axón 2, ambas sinapsis son reforzadas. **C**, Cooperatividad, la inducción de la potenciación de larga duración requiere de la activación concomitante de varios axones. (Modificada de Purves et al., 2005).

### Acetilcolina y Nic

La acetilcolina (ACh) es un neurotransmisor liberado en el hipocampo por el septum medial y la banda diagonal de Broca (Linstér & Hasselmo, 2000). La ACh liberada en el hipocampo, actúa sobre receptores metabotrópicos (muscarínicos) e ionotrópicos (nicotínicos), estos últimos pueden ser activados además de la acetilcolina por un ligando exógeno como la Nic (Jones et al., 2002; Kullman, 2007).

La nicotina es el principal componente y en gran medida el responsable de la adicción al tabaco. Tiene la capacidad de modular la función neuronal ya que, como se mencionó anteriormente, es capaz de unirse a los receptores de ACh de tipo nicotínicos (nAChRs). Los nAChR son canales pentaméricos

(homoméricos o heteroméricos) conformados por la combinación de nueve subunidades que van de  $\alpha 2$ - $\alpha 7$  y  $\beta 2$ - $\beta 4$  (Wheeler et al., 1993). Las propiedades cinéticas de los nAChR, así como su conductancia, son determinadas por las subunidades que los conforman, por ejemplo, las subunidades  $\alpha 3/\beta 2$  son 17 veces menos sensibles a Nic mientras que, los conformados por  $\alpha 2/\beta 2$  son cinco veces más sensibles a Nic con respecto a su activación por Ach (Luetje & Patrick, 1991). La activación de los nAChR produce una despolarización, debido a la alta permeabilidad a  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{+2}$  que poseen estos receptores (Séguéla et al., 1993). En particular en la región CA1 del hipocampo, se encuentran predominantemente los receptores conformados por las subunidades  $\alpha 7$ ,  $\alpha 4\beta 2$  y  $\alpha 3\beta 4$  (Levin, 2002). Los nAChR  $\alpha 7$  poseen una alta permeabilidad a  $\text{Ca}^{+2}$ , una baja afinidad de activación y una rápida desensibilización (Buisson & Bertrand, 2001; Fucile et al., 2004; Bornashev et al., 1995). Por otro lado, los nAChR  $\alpha 4\beta 2$  poseen una alta afinidad de activación y lenta desensibilización, su activación promueve en las neuronas presinápticas un incremento en la liberación de neurotransmisores como glutamato y GABA (Gray et al., 1996; Alkondon et al., 1997). Por su parte la activación de los nAChR  $\alpha 3\beta 4$ , promueve por un lado la liberación de glutamato de las C. Sch. y por otro lado aumenta la excitabilidad de las piramidales de CA1 (Maggi et al., 2003; Levin & Resvani, 2001; Emptage et al., 2001).

Estudios de Fuji y colaboradores (1999), demostraron la capacidad de la Nic como modulador de la LTP inducida por una HFS en las C. Sch. en rebanadas de cerebro de rata. El estudio consistió en producir dos HFS con diferentes frecuencias, una con una frecuencia capaz de inducir LTP (20 pulsos a 100 Hz) y otra incapaz de producirla (15 pulsos a 100 Hz) (Fuji et al., 1999). La aplicación de Nic (1  $\mu\text{M}$ ) provocó cambios en la excitabilidad de las C. Sch., lo que permitió que durante la HFS de 15 pulsos a 100 Hz se produjera una LTP (Fuji et al., 1999). Estudios posteriores descubrieron que la aplicación de Nic era capaz de inducir una LTP por sí sola, cuyos mecanismos diferían de la LTP inducida por una HFS (He et al., 2003).

La inducción de la LTP provocada por la aplicación de Nic en las C. Sch., ha sido explicada por medio de diversos mecanismos como la necesaria inactivación de los receptores  $\alpha 7$  y la activación de los no  $\alpha 7$  (Fuji et al., 2000;

Yamazaki et al., 2005). La inhibición de las interneuronas GABAérgicas, sobre las neuronas piramidales de CA1 ha sido otro modelo planteado para explicar la LTP inducida por Nic, ya que al inhibir la inhibición aumenta la excitabilidad de la comunicación sináptica de las C. Sch. hacia CA1 (Ji & Dani 2000; Alkondon & Albuquerque 2001). El efecto de la Nic sobre la neurona postsináptica, promueve un incremento mayor en la despolarización por medio de la activación de los nAChR, disminuyendo el umbral de activación de los NMDAR lo que permite la inducción de la LTP (Malenka & Nicol, 1999)

### Células Gliales

Las células gliales comprenden casi la mitad del volumen del sistema nervioso central (SNC) (Tortora & Grabowski, 2002). Su nombre proviene de la primera función atribuida a estas células llamándoles el “cemento” que mantenía unido al tejido nervioso (Tortora & Grabowski, 2002). Su número excede en una proporción de 5 a 50 veces el de las neuronas por lo que no es de extrañar que se encuentren distribuidas en todo las regiones del Sistema Nervioso (Verkhatsky & Butt, 2007; Tortora & Grabowski, 2002).

Existen seis tipos de células gliales, dos se encuentran en el sistema nervioso periférico y cuatro en el SNC. En el sistema nervioso periférico se encuentran las células de Schwann, responsables de la formación de las vainas de mielina (cada célula forma una vaina individual), y las células satélite las cuales envuelven a las neuronas de los ganglios (Tortora & Grabowski, 2002; Verkhatsky & Butt, 2007). En el SNC se localizan los oligodendrocitos, capaces de generar varias vainas de mielina; las células ependimarias, que producen el líquido cefalorraquídeo en los ventrículos del encéfalo; la microglía, que elimina los desechos de células muertas y bacterias, las cuales tiene la facultad de emigrar a áreas del tejido nervioso que han sufrido algún daño; y los astrocitos, células con forma de estrella que cumplen funciones vitales para el mantenimiento de las neuronas entre las más conocidas la regulación del pH, aportación de nutrientes y la regulación iónica (Tortora & Grabowski, 2002; Verkhatsky & Butt, 2007). Además de esto, recientemente se han descubierto nuevas funciones de los astrocitos lo que ha provocado un cambio en la interpretación de su papel en la comunicación sináptica.

## Astrocitos y transmisión sináptica

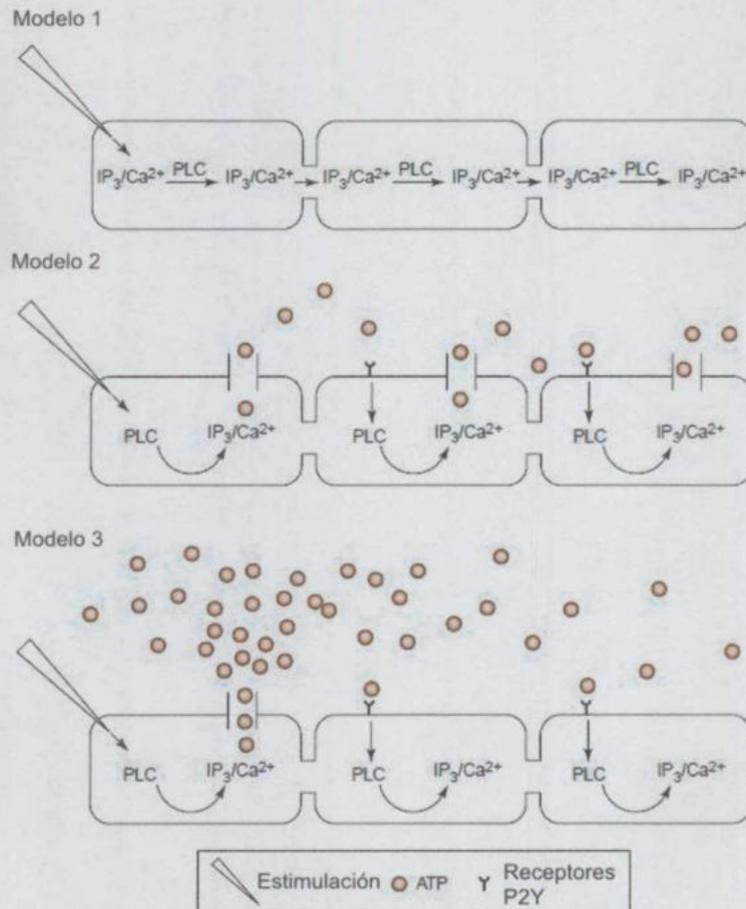
### Receptores astrocíticos

Los astrocitos expresan receptores prácticamente para todos los neurotransmisores lo que les permite responder a la actividad neuronal (Schipke y Kettenmann, 2004). Particularmente en el hipocampo, se expresan en los astrocitos receptores purinérgicos (Fellin et al., 2006a), GABAérgicos (Mejer et al., 2008), glutamatérgicos AMPA y NMDA (Matthias et al., 1993; Schipke y Kettenmann, 2004), colinérgicos, entre otros. Los astrocitos del hipocampo de igual forma expresan diversas subunidades de receptores nicotínicos como las  $\alpha 3$ -  $\alpha 5$ ,  $\alpha 7$  y  $\beta 4$  (Gahring et al., 2004; Graham et al., 2003). De manera interesante, la activación de estos receptores produce en su mayoría incrementos en la concentración de  $Ca^{+2}$  en los astrocitos lo que ha llevado a diversos grupos de investigación proponer un tipo de excitabilidad astrocítica dependiente del  $Ca^{+2}$ .

### Excitabilidad astrocítica

A pesar de que los astrocitos no son excitables, entendiendo este concepto como la capacidad de las células de producir potenciales de acción, en 1990 Cornell-Bell y colaboradores reportaron que los astrocitos hipocampales en cultivo respondían a la aplicación de glutamato con la generación de ondas de  $Ca^{+2}$  intracelular. Dichas ondas se propagan a una velocidad de 15-27  $\mu m/seg$  y se han propuesto 3 modelos para explicar la generación y propagación de estas ondas de  $Ca^{+2}$  (Figura 6). El modelo 1, indica que el incremento de  $Ca^{+2}$  producido por una estimulación, puede permear (al igual que el IP3) a través de las conexinas que se establecen entre astrocitos adyacentes (Boitiano et al., 1992; Saéz et al., 1989). El modelo 2, propone que ante la estimulación de un astrocito, se da la liberación de ATP (dependiente de la concentración de  $Ca^{+2}$ ), mismo que puede actuar sobre receptores purinérgicos de tipo P2Y y P2X presentes en astrocitos adyacentes (Nedergaard et al., 2003). La activación de estos receptores, promueve el incremento de  $Ca^{+2}$  y la subsecuente liberación de ATP del astrocito adyacente, regenerando la respuesta de  $Ca^{+2}$  en un evento

en cadena (Nedergaard et al., 2003). Por último el modelo 3 plantea que la liberación de ATP de un solo astrocito puede, por si solo, ser capaz de estimular a varios astrocitos vecinos (Nedergaard et al., 2003) (Figura 6).



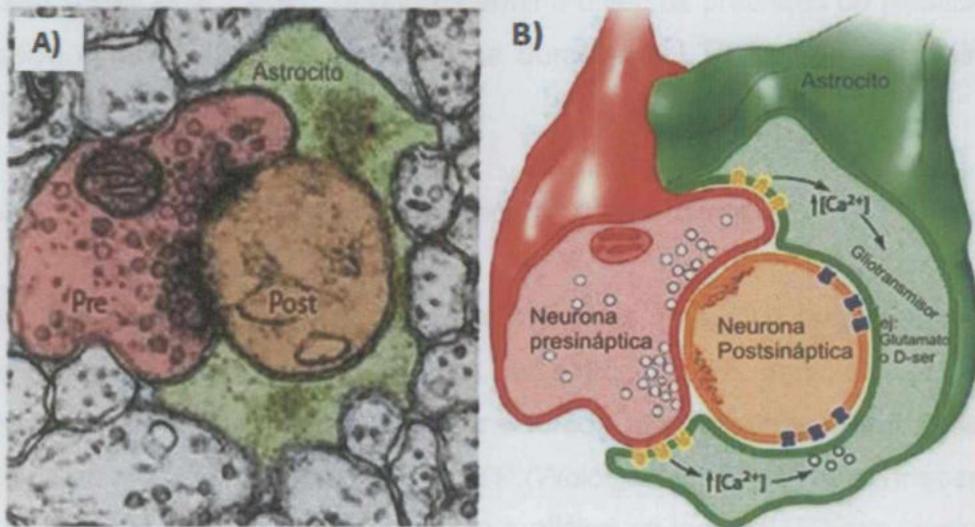
**Figura 6. Modelos propuestos de la propagación de ondas de calcio en los astrocitos.** Modelo 1, indica que el incremento de  $\text{Ca}^{+2}$  y/o el  $\text{IP}_3$  pueden pasar a los astrocitos adyacentes. Modelo 2, el ATP liberado por un astrocito puede aumentar el  $\text{Ca}^{+2}$  en un astrocito adyacente. Modelo 3, la liberación de ATP de un solo astrocito puede ser capaz de estimular a varios astrocitos vecinos (Modificado de Nedergaard et al., 2003).

## Gliotransmisores y su liberación

La capacidad de los astrocitos de responder a la actividad neuronal con la liberación de transmisores (gliotransmisores) como ATP, glutamato, D-serina, entre otros, cambió la interpretación del papel de los astrocitos en la comunicación neuronal. Actualmente, se conocen tres mecanismos celulares para la liberación de gliotransmisores: a través de hemicanales, de transportadores y por exocitosis (tanto clásica como de kiss & run), (Ye et al., 2003; Duan et al., 2003) (ANEXO 1). La liberación de gliotransmisores es dependiente del incremento de  $Ca^{+2}$  intracelular de los astrocitos (Mothet et al., 2005). En este sentido, Hassinger y cols. (1996) mostraron que la liberación del ATP de los astrocitos depende del incremento de IP3 y el consecuente  $Ca^{+2}$  intracelular (Hassinger et al., 1996). De igual manera, estudios del grupo de Volterra y cols. (2005), mostraron que el incremento de  $Ca^{+2}$  en astrocitos producía una fusión de vesículas que contenían ATP (Volterra et al., 2005). Al igual que con el ATP, La liberación del glutamato y la D-ser, por su parte son liberados por medio de la vía exocítica la cual a su vez es dependiente de la vía de IP3 (Mothet et al., 2005).

## Comunicación astrocito-neurona

Los astrocitos pueden modular la actividad neuronal a través de la liberación de diferentes gliotransmisores los cuales pueden activar o inhibir la transmisión sináptica (Hydon & Carmignoto, 2006). En el hipocampo esto adquiere una importancia particular ya que el 60% de las sinapsis se encuentran rodeadas por astrocitos (Ventura & Harris 1999) (Figura 7). Así, se establece una comunicación bidireccional entre las neuronas y los astrocitos a lo que se le denominó sinapsis tripartita (Araque et al., 1999; Halassa et al., 2007).



**Figura 7. Sinapsis tripartita en el hipocampo.** **A**, Se muestra una fotomicrografía de una sinapsis obtenida con microscopía electrónica, en donde se indica la neurona presináptica (pre), postsináptica (post), y un astrocito. **B**, Representación de una sinapsis tripartita del hipocampo, en donde la liberación de glutamato por parte de la neurona presináptica (círculos blancos), induce un incremento de  $Ca^{2+}$  y por consecuencia la liberación de gliotransmisores como el Glutamato o la D-serina (Modificado de Fellin et al., 2005).

La gran variedad de gliotransmisores que son liberados en el hipocampo dificulta una clasificación de sus efectos sobre la transmisión sináptica. En este sentido, se ha observado que la aplicación de una enzima que degrada al ATP produce una potenciación de las corrientes postsinápticas excitatorias (EPSCs) (Fellin et al., 2005). Estos hallazgos sugieren que la liberación de ATP por parte de los astrocitos ejerce una inhibición tónica de las respuestas sinápticas en CA1 por lo que al disminuir la inhibición se observa una facilitación (Fellin et al., 2005)

De igual manera, se ha observado en co-cultivos de astrocitos y neuronas hipocámpales así como en rebanadas de hipocampo que, la liberación de glutamato producida por la estimulación de los astrocitos provoca un incremento en la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular en las neuronas, en la excitabilidad neuronal y en las respuestas excitatorias mediadas por NMDAR (Parpura et al., 1994; Ni et al., 2007). A pesar de que generalmente se considera al glutamato como el principal gliotransmisor que facilita las respuestas sinápticas, recientemente ha sido reconocida la importancia de un aminoácido, la D-ser, el cual al unirse al sitio de unión a glicina presente en los

### **III. HIPÓTESIS**

La D-serina participa en la LTP inducida por la Nic en las sinapsis de CA3-CA1 en el hipocampo de rata.

### **IV. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar si en la LTP inducida por nicotina participa la D-serina en las sinapsis de CA3-CA1 en el hipocampo de rata.

### **V. OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Analizar la LTP inducida por nicotina en la región CA1 en presencia de la D-serina.
2. Examinar la participación de los receptores NMDA en la LTP inducida por nicotina
3. Evaluar si la LTP inducida por nicotina depende de la activación del sitio de unión a D-serina en los receptores NMDA

## VI. METODOLOGÍA

### Obtención de rebanadas de Hipocampo

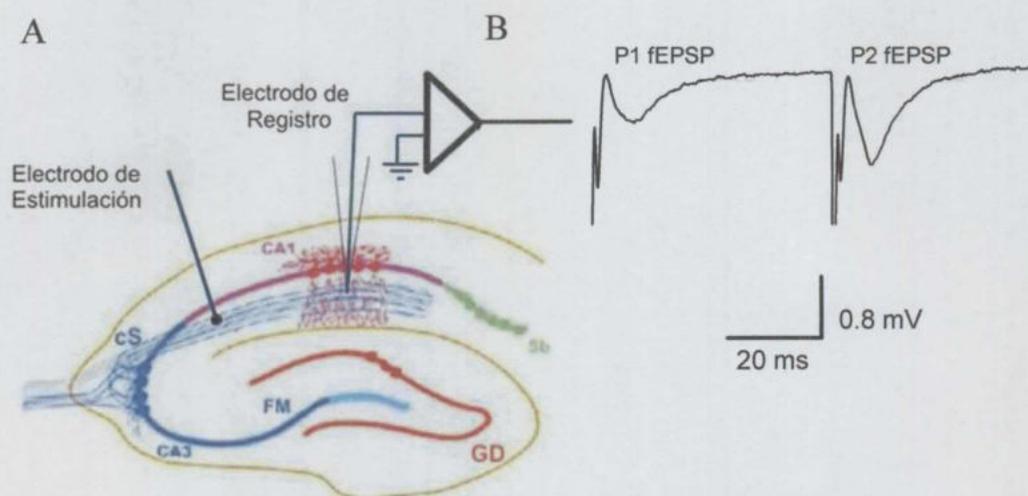
Se utilizaron ratas macho de la cepa *Wistar*, con un peso de 120 gramos, proporcionadas por el Bioterio de la UNAM. Las ratas fueron anestesiadas con eter y sacrificadas por decapitación. El cerebro fue removido e inmediatamente sumergido en una solución rica en sacarosa (en mM: 238 sacarosa, 30 glucosa, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 3 KCl, 2.5 MgCl<sub>2</sub>), a una temperatura de 4°C y un pH de 7.3-7.4. Se obtuvieron rebanadas parasagitales de 400 µm con un vibratomo. Las rebanadas obtenidas, se mantuvieron por al menos 1 hora en líquido cefalorraquídeo artificial -FCA- (en mM: 126 NaCl, 3 KCl, 1 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 11 glucosa) a una temperatura de 25 ° C y un pH de 7.3 - 7.4 previamente ajustado. Las soluciones, se mantuvieron en constante oxigenación, con una mezcla de O<sub>2</sub> (95%) y CO<sub>2</sub> (5%).

Posteriormente se colocó una cámara de registro en el microscopio, en donde se situó la rebanada para ser perfundida con FCA por gravedad con una velocidad de 2 a 3 ml/min, recirculada con ayuda de una bomba peristáltica.

### Registro electrofisiológico

Se realizaron registros electrofisiológicos extracelulares de campo (fEPSPs) de la región de CA1 del hipocampo, provocados por la estimulación de las C. Sch.. Los fEPSPs fueron registradas con micropipetas de borosilicato que fueron llenadas con NaCl 2M y tuvieron una resistencia de entre 1 y 2 MΩ. Para la estimulación de las C. Sch. se utilizó un electrodo de estimulación con un grosor de 25µm. Para producir los fEPSPs se utilizó un protocolo de pulsos pareados (0.15 ms; 0.033 Hz) con un intervalo entre pulsos de 60 ms, en donde P1 y P2 son los fEPSPs producidos por el primer y segundo estímulo respectivamente (ANEXO 2) (Figura 8). Para cada rebanada, la intensidad de estimulación del pulso se ajustó como la necesaria para producir aproximadamente el 50% de la respuesta máxima. Las señales electrofisiológicas se registrarón con ayuda de un amplificador Axopatch 200B

(filtro pasa bajos 1 KHz y un pasa altos de 1Hz) y se amplificaron 100 veces (100x) para su visualización. Las señales obtenidas se digitalizaron con un conversor analógico-digital y se almacenaron en el disco duro de una PC para su posterior análisis (Figura 8).



**Figura 8. Diagrama del registro electrofisiológico.** A, El electrodo de estimulación fue colocado sobre las colaterales de Schaffer y el electrodo de registro en el *stratum radiatum* de CA1. B, registro de los potenciales postsinápticos excitatorios de campo típicos (fEPSP) producidos por el protocolo de pulsos pareados en donde P1 se refiere a la primera respuesta y P2 a la segunda respuesta. Colaterales de Schaffer, **Cs**; Fibras musgosas, **FM**; Giro dentado, **GD**.

## Drogas

Todas las drogas fueron compradas en Sigma-Aldrich (St Louis) y diluidas en FCA y aplicadas en la perfusión.

## Análisis de Datos

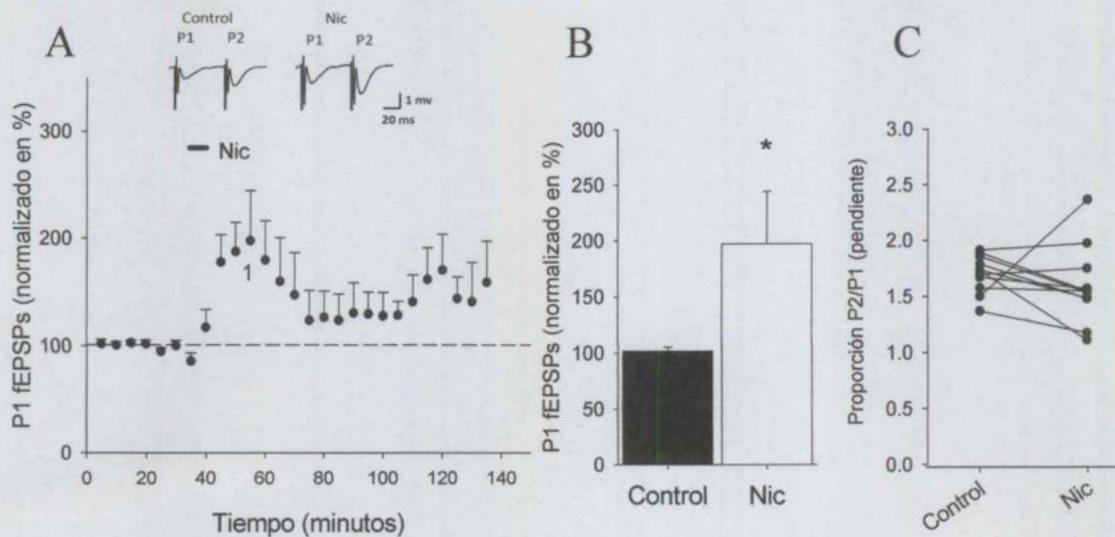
Los resultados se muestran normalizados con respecto al control (promedio de los primeros 30 minutos de registro). La pendiente (mV/ms) fue medida a la mitad de la fase de descenso de P1 y P2. Las gráficas muestran el promedio  $\pm$  EE. Para determinar la proporción de los pulsos pareados se dividió la pendiente de P2 entre la pendiente de P1 (P2/P1). Para la medición de las pendientes de los fEPSPs se empleó el programa Clampfit de Axon Instruments Inc. y para el análisis estadístico se utilizó el programa Sigma Plot

ver. 10. Se utilizó una t-student pareada cuando se analizaban el efecto de una droga antes y después de la aplicación de ésta y, una t-student no pareada cuando se analizaban las diferencias entre 2 poblaciones diferentes de rebanadas. Se tomaron como diferencias estadísticamente significativas aquellos valores de  $p \leq 0.05$ ).

## VII. RESULTADOS

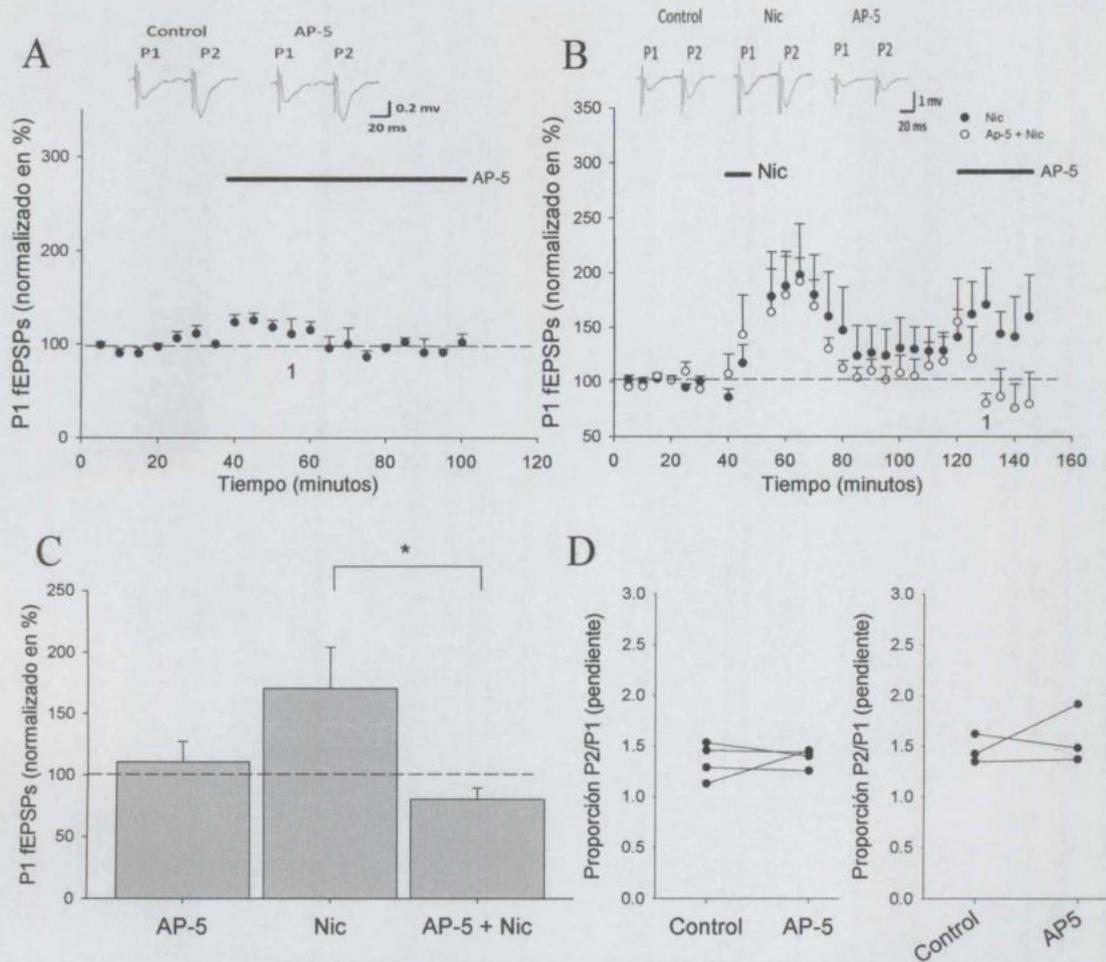
Se registraron 36 rebanadas de hipocampo provenientes de 22 ratas. Se tomaron en cuenta únicamente aquellas rebanadas cuyas respuestas se mantuvieran estables por al menos 30 min.

El efecto de la nicotina (Nic) sobre la transmisión sináptica de la región CA1 fue analizada. Durante la aplicación de Nic, (1  $\mu$ M, 7 minutos) no se observaron cambios significativos en las pendientes del fEPSP de P1 (Figura 9A). Sin embargo, 5 minutos posteriores a la aplicación de Nic se observó un incremento significativo en la pendiente de  $77 \pm 25\%$  (t-student,  $*p \leq 0.05$ ) (Figura 9A). El efecto máximo se presentó 15 minutos después de la aplicación de Nic que mostró un aumento promedio de  $197 \pm 46\%$  - (Figura 9B; t-student,  $*p \leq 0.05$ ). De manera interesante, la sola aplicación de Nic, produjo un incremento en la pendiente de las respuestas (superior a 30%) que se mantuvieron por las dos horas de registro (LTP). Dicho efecto presentó una forma oscilatoria con un periodo de oscilación de 60 min aproximadamente (Figura 9A). El análisis de la proporción entre P2 y P1 -P2/P1- (15 minutos después de la aplicación de Nic), no muestra cambios por efecto de la Nic lo que sugiere que ésta actúa a nivel postsináptico (control,  $1.7 \pm 0.05$ ; Nic,  $1.5 \pm 0.1\%$ ) (Figura 9C).



**Figura 9. Efecto de la nicotina sobre la transmisión sináptica.** **A**, curso temporal de las respuestas antes y después de la aplicación de Nic, arriba trazos representativos previos a la aplicación de Nic y postaplicación de Nic (Nic; 1 mM, 7 min). **B**, análisis de los datos mostrados en A, 15 minutos después de la aplicación de Nic (promedio  $\pm$  EE). **C**, análisis de la proporción de los pulsos pareados antes y después de la aplicación de Nic Diagrama del registro electrofisiológico.

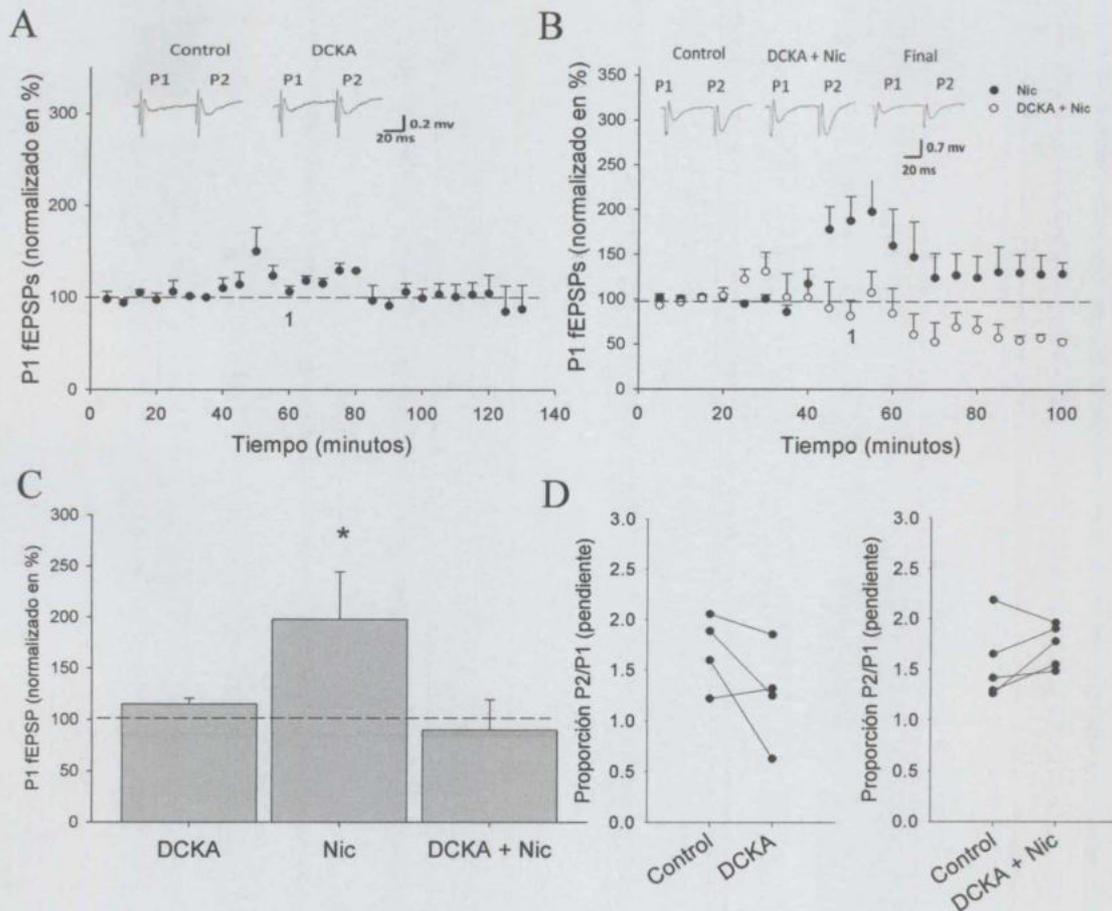
Con la finalidad de conocer la participación de los NMDAR en la LTP inducida por Nic, se usó un antagonista de los NMDAR (AP-5). La aplicación de AP-5 (50  $\mu$ M por 60 min) por sí sola, no produjo cambios significativos con respecto al control (Figura 10A), sin embargo, a pesar de que la LTP inducida por Nic ya estaba establecida (90 min después de la aplicación de Nic), durante la aplicación de AP-5, el efecto facilitatorio de la Nic no se observa, llevando las respuestas incluso por debajo de los controles (Nic, 170.3%  $\pm$  33.5; Nic + AP-5, 80.2%  $\pm$  9; \* $p \leq 0.05$ ) (Figura 10B y 10C). De manera interesante, cuando se retiró el AP-5 de la perfusión, el efecto de la Nic se re-estableció (Nic, 197  $\pm$  46%; lavado Nic + AP-5, 184.3  $\pm$  28). Como era de esperarse, la comparación en las proporciones de los pulsos pareados (P2/P1) entre las rebanadas tratadas con Nic y las de Nic+AP-5, no mostraron diferencias significativas sugiriendo que el efecto del AP-5 sobre la LTP inducida por Nic es a nivel postsináptico (Control, 1.35  $\pm$  0.09; Nic + AP-5, 1.38  $\pm$  0.04) (Figura 10D).



**Figura 10. Efecto del AP-5 sobre la LTP inducida por nicotina.** **A**, efecto del AP-5 (50 mM, 60 min) sobre la transmisión sináptica basal. Trazos representativos antes y después de la aplicación de AP-5 **B**, curso temporal de las respuestas antes y después de la aplicación de nicotina (Nic; 1 mM, 7 min) y AP-5 reflejado en la amplitud de los trazos representativos respectivos **C**, análisis de los datos mostrados en B 90 minutos después de la aplicación de Nic (promedio  $\pm$  EE). **D**, análisis de la proporción de los pulsos pareados antes y después de la aplicación de AP-5 y Nic.

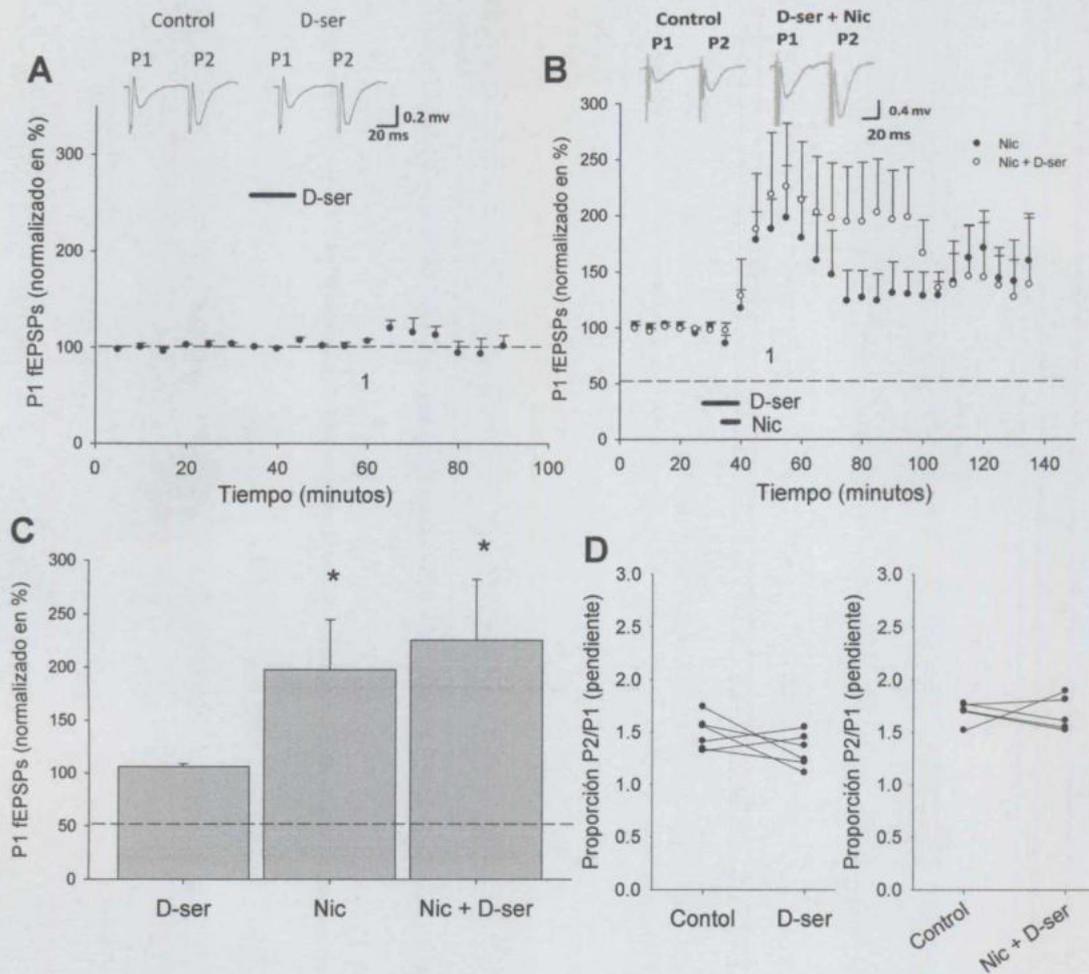
Como se mencionó en los antecedentes, los astrocitos tienen la capacidad de modular la actividad de los NMDAR a través de la liberación de D-ser. Por esto, nos planteamos evaluar si, el bloqueo del sitio de unión a D-ser (con DCKA), así como la aplicación de D-ser exógena modulaban la LTP inducida por Nic. En la figura 11A se muestra que la administración de DCKA (200nM, 20min) no es capaz por sí sola de modificar las respuestas (P1) con respecto al control. Sin embargo, en presencia de DCKA, la Nic no fue capaz de inducir un incremento de las respuestas del fEPSP de P1 (15 min después de la aplicación de Nic) (Nic,  $197 \pm 46\%$ ; DCKA + Nic,  $81.2\% \pm 17.6$ ) (Figura

11C). En cambio, las respuestas disminuyeron de manera gradual, así, al final del registro (90 min después de aplicar la Nic) se presentó una depresión de las respuestas que se mantuvo por al menos 20 min. (Nic,  $140.9\% \pm 36$ ; Nic + DCKA,  $56.7 \pm 4.9$ ;  $P \leq 0.05$ ) (Figura 11B). El análisis de la proporción entre P1 y P2 (P2/P1) del grupo control, el DCKA y DCKA + Nic no presentaron diferencias significativas ( $1.68 \pm 0.183$ ;  $1.261 \pm 0.251$  y  $1.732 \pm 0.09$  respectivamente  $p \leq 0.05$ ).



**Figura 11. Efecto del DCKA sobre la LTP inducida por nicotina.** **A**, efecto del DCKA (200 nM, 20 min) sobre la transmisión sináptica basal y en la amplitud indicada en los trazos representativos. **B**, curso temporal de las respuestas antes y después de la aplicación de Nic (Nic; 1 mM, 7 min) y DCKA, así como su efecto en la amplitud demostrada en los trazos representativos durante la aplicación de los fármacos. **C**, análisis de los datos mostrados en B 15 minutos después de la aplicación de Nic (promedio  $\pm$  EE). **D**, análisis de la proporción de los pulsos pareados antes y después de la aplicación de DCKA y Nic.

En la figura 12 se muestra que la aplicación de D-ser (20  $\mu$ M por 10 min), no produce cambios significativos en la transmisión sináptica (Figura 12A). Para conocer el efecto de la D-ser sobre la LTP inducida por Nic, se aplicó antes y durante la administración de Nic. En la presencia de D-ser, desde los primeros minutos de aplicación de Nic se observó un incremento significativo de P1 fEPSP (Nic,  $117 \pm 16.7$ ; D-ser + Nic,  $125 \pm 20$ ) (Figura 12B). El análisis del efecto 15 minutos después de la aplicación de Nic se muestra en el apartado C. El efecto de la D-ser más la Nic fue significativo con respecto su grupo control (Control,  $96.07\% \pm 2.00$ ; D-ser + Nic,  $217\% \pm 50.64$ ; \* $P \leq 0.05$ ) (Figura 12B y 12C). La diferencia en el promedio con respecto al grupo que recibió solo la Nic (Nic,  $197 \pm 46\%$ ; D-ser + Nic,  $217 \pm 50.63$ ) no presentó diferencias estadísticamente significativas. El análisis de la proporción de la pendiente de los pulsos pareados (P2/P1) entre el grupo control y la D-ser, no indicó ningún cambio significativo (Control,  $1.490 \pm 0.066$ ; D-ser,  $1.321 \pm 0.067$ ), al igual que la D-ser + Nic (Control,  $1.662 \pm 0.074$ ; D-ser + Nic,  $1.749 \pm 0.105$ ) sugiriendo un efecto postsináptico (Figura 12D).



**Figura 12. Efecto de la D-serina sobre la LTP inducida por nicotina.** **A**, efecto del D-serina (D-ser; 20 mM, 10 min) sobre la transmisión sináptica basal. **B**, curso temporal de las respuestas antes y después de la aplicación de Nic (Nic; 1 mM, 7 minutos presencia y ausencia de D-ser, así como su efecto en la amplitud de las respuestas mostrados en los trazos representativos. **C**, análisis de los datos mostrados en B 15 minutos después de la aplicación de Nic (promedio  $\pm$  EE). **D**, análisis de la proporción de los pulsos pareados antes y después de la aplicación de D-ser y Nic.

## VIII. DISCUSIÓN

### *Efecto de la Nic sobre la transmisión sináptica en la región CA1 del hipocampo*

El hipocampo es una estructura cerebral con circuitos neuronales capaces de desarrollar, con cierta facilidad, diferentes tipos de plasticidad sináptica. Estas características hacen del hipocampo una estructura clave en tareas de aprendizaje y memoria. Diversas sustancias endógenas y exógenas como la Nic facilitan el aprendizaje y la memoria así como la LTP (base celular que subyace a dichos procesos). Nuestros resultados muestran que la Nic es capaz producir una LTP (Figura 9A y B) que dura por lo menos 90 min de registro (Figura 9A). Estos resultados concuerdan con los observados por Yamazaki y cols (2006) y Magueresse & Cherubini (2007). Sin embargo, a diferencia del trabajo de Margueresse, en donde el efecto es a nivel presináptico (incrementando la probabilidad de liberación de las C. Sch., el análisis de la proporción en los pulsos pareados en nuestras condiciones (Figura 9D) sugiere que el efecto es postsináptico. Estas discrepancias en los resultados puede ser explicados por las diferencias en la metodología experimental usada, ya que Magueresse & Cherubini, ya que tomaron en cuenta únicamente a las sinapsis con baja probabilidad de liberación y de edades postnatales inferiores a las nuestras (P1-P7 vs P30-P35 respectivamente). Estos parámetros son relevantes, ya que según Maggi y colaboradores (2004), el efecto de la Nic sobre la probabilidad de liberación del glutamato, depende de la probabilidad inicial de liberación de la sinapsis.

### *Participación de los receptores NMDA en la LTP inducida por la Nic*

Existe controversia respecto a la participación de los NMDAR en la LTP inducida por Nic. Por un lado, He y cols. (2003) mostraron que la administración de un antagonista de los NMDAR, el MK 801, no tenía ningún efecto sobre la LTP inducida por Nic. Mientras que por otro lado, Yamazaki y cols. (2006) mostraron que la LTP inducida por Nic era debida a un incremento en la corrientes sinápticas mediadas por los NMDAR. En este contexto,

nuestros resultados concuerdan con lo publicado por Yamazaki, ya que en presencia de AP-5, la Nic no facilita la eficiencia sináptica (Figura 10). Como era de esperarse, la aplicación de AP-5 (por sí sola) no altera la transmisión sináptica (Figura 10), en congruencia con la afirmación de que la transmisión sináptica basal en CA1 depende únicamente de los AMPAR (Kandell, 2002; Kullmann, 2007). Las diferencias encontradas con el grupo de He y cols. (2003) pueden atribuirse a la concentración Nic (10  $\mu$ M) y sobre todo al sitio de registro, ya que ellos registran en la capa piramidal del hipocampo, a diferencia de nuestro trabajo que registramos en el stratum radiatum. La localización del electrodo de registro, determina la obtención de potenciales de acción (He et al., 2003) o potenciales sinápticos en nuestro caso, siendo esto un aspecto importante para la interpretación de los resultados.

#### *Participación de la D-ser en la LTP inducida por Nic*

La D-serina es un aminoácido sintetizado a partir de la L-serina por la enzima racemasa (Wolosker et al., 1999). A pesar de que las neuronas expresan la enzima racemasa, los niveles de expresión en comparación con los astrocitos son mucho menores (Schell et al., 1995; Mothet et al., 2000), sugiriendo fuertemente que son los astrocitos y no las neuronas los que liberan este transmisor. La D-ser puede actuar como co-agonista de los NMDAR ya que se une al sitio de unión de la glicina presente en los NMDAR. Diversos grupos han sugerido que la D-ser es el ligando endógeno de este sitio y no la glicina (Mothet et al., 2000; Wolosker et al., 1999; Yang et al., 2003; Panatier et al., 2006). Así, la degradación de D-ser (con la DAAO) pero no la Glicina (con la oxidasa de glicina) afecta las respuestas mediadas por NMDAR (Panatier et al., 2006). De manera interesante, se ha sugerido que los astrocitos pueden coliberar al agonista (glutamato) y al co-agonista (D-ser) de los NMDAR (Hydon & Carmignoto, 2006) asegurando con esto el adecuado funcionamiento de los NMDAR.

Los resultados mostrados en la figura 11 y 12, muestran que en presencia del bloqueador del sitio de unión a glicina (DCKA) la LTP inducida por Nic no se presenta similar a lo observado con AP-5 (Figura 10B y C), y que en presencia del agonista (D-ser) se facilita la LTP inducida por Nic. Este

hallazgo sugiere que a las dosis usadas de Nic, el sitio de D-ser no está saturado.

Nuestros resultados son congruentes con los resultados de Yang y cols (2003) y más recientemente Henneberger et al., (2010) en donde, la LTP inducida por HFS en cultivos de neuronas, co-cultivos de astrocitos con neuronas, así como en rebanadas de hipocampo de la rata dependen de la presencia de D-ser.

El mecanismo mediante el cual se interrelacionan la Nic y la D-ser no es claro aún. Dos posibilidades existen en este sentido: 1) Que la Nic promueva directamente la liberación de la D-ser, ya que la activación de sus receptores en los astrocitos promueva un incremento de  $Ca^{+2}$  necesario para la exocitosis de la D-ser (Shell et al., 1995; Sharma & Vijayaraghavan al., 2007) y 2) Que el incremento en la liberación de glutamato por efecto de la activación de los nAChR, actué sobre los astrocitos para promover la liberación de D-ser.

## IX. CONCLUSIONES

- 1.- La LTP inducida por nicotina en el hipocampo de la rata, requiere del sitio para glutamato de los NMDAR.
- 2.- El sitio a D-serina en los NMDAR, es esencial para la inducción de la LTP por nicotina en el hipocampo de la rata.
- 3.- La D-serina puede modular la LTP inducida por nicotina, incrementando la amplitud y la duración de la LTP.

## X. Anexos

### Anexo 1

La D-serina como un Gliotransmisor: Síntesis y liberación

Síntesis de la D-serina

La D-serina (D-ser) es un aminoácido que se sintetiza a partir de L-serina con ayuda de la enzima serina racemasa para catalizar la reacción (Wolosker et al., 1999). La degradación de la D-ser en mamíferos se da a través de la D-amino ácido-oxidasa (DAAO), por lo que la distribución de D-ser en el cerebro de la rata depende directamente de los niveles de expresión de la DAAO y de la serina racemasa (Wolosker et al., 1999).

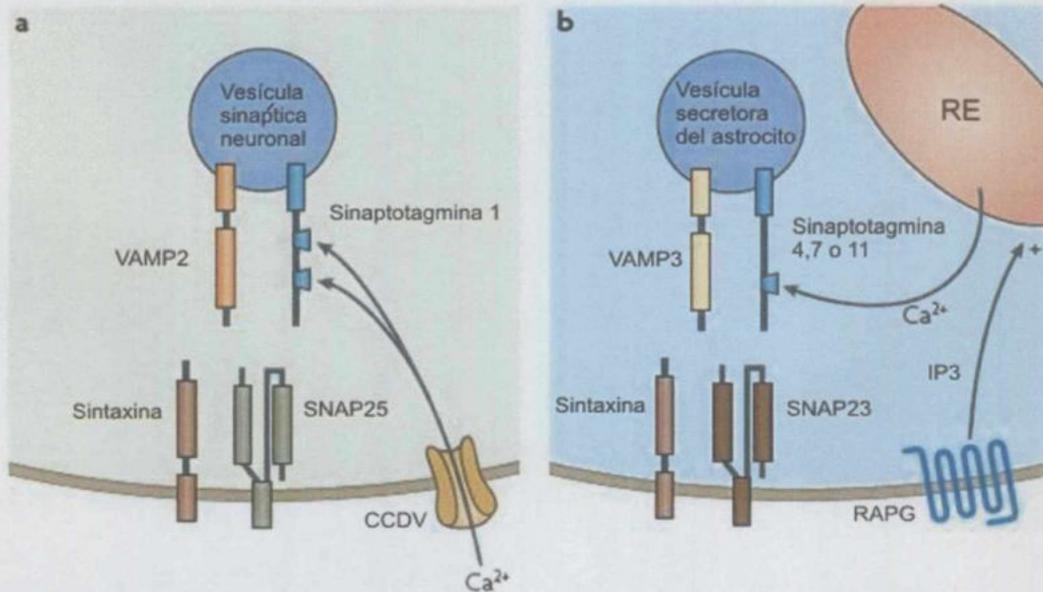
Aunque se ha reportado la capacidad de expresar la enzima racemasa en neuronas corticales (Kartvelishvily et al., 2006), la D-ser es sintetizada y liberada principalmente por los astrocitos (Wolosker et al., 1999). En este sentido, Yang y cols. (2003) mostraron que la liberación de D-ser en cultivos de astrocitos era igual que la liberada en cultivos mixtos de neuronas y astrocitos. Además, dicha liberación no dependía del bloqueo de canales  $\text{Na}^+$  lo que sugirió que no era necesaria la activación de las neuronas para producir un incremento en la liberación de D-ser.

Liberación de D-serina astrocitica

Uno de los mecanismos mejor descrito para la liberación de transmisores en las neuronas es mediado a través de vesículas. Una hecho que llamo la atención fue la presencia de pequeñas vesículas en los astrocitos del hipocampo que contactan con las neuronas (Bezzi et al., 2004; Jourdain et al., 2007). Estas vesículas expresan clásicamente diversas proteínas (en particular las de la familia SNARE) para cumplir la función de reconocimiento, anclaje y fusión de las vesículas con la membrana plasmática. En este sentido, se han reportado la expresión de diversas proteínas en las vesículas que contienen D-ser en los astrocitos como la VAMP3 (análoga a la VAMP2 en neuronas) y syntaxina (Parpura et al., 1995; Cahoy et al., 2008M, Mainschein et

al., 1999). Así mismo se reportó la presencia de la proteína SNAP23 (análoga a la SNAP25 de las neuronas) la cual es esencial para la liberación de gliotransmisores (Mainschein et al., 1999; Hepp et al., 1999).

Una vez formado el complejo SNARE es necesario de un sensor de  $Ca^{2+}$  para regular la exocitosis. En el caso de los astrocitos se ha sugerido la participación de la sinaptotagmina 1, aunque nuevos datos reportan la presencia del tipo 4, 5 y 11 (Mainschein et al., 1999, Martineau et al., 2008). El sensor de  $Ca^{2+}$  es indispensable ya que al bloquear los incrementos de  $Ca^{2+}$  con quelantes, entre otros, se bloquea la liberación de D-ser (Figura 13) (Jourdain et al., 2007; Fiacco et al., 2007; Fonnum et al., 1997).



**Figura 13.- Proteínas propuestas en la participación en la exocitosis de las neuronas y los astrocitos. a)** Modelo de liberación vesicular sináptica neuronal anclada al complejo SNARE conformado por las proteínas **VAMP2**, **sintaxina**, **SNAP25** y **Sinaptotagmina**, esta última actúa como sensor del incremento de  $Ca^{2+}$  proveniente de los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje (CCDV). **b)** Modelo de la liberación vesicular del astrocito, en las cuales participan proteínas análogas a las neuronales como la **VAMP2**, **SNAP23** y sinaptotagmina 4,7 o 11. La activación de receptores acoplados a proteínas G (**RAPG**) promueve la producción de **IP3**, el cual se une al retículo endoplásmico (**RE**) liberando así el  $Ca^{2+}$  indispensable para la liberación de la vesícula (modificado de Hamilton & Attwell 2010)

## D-ser como un ligando endógeno

La D-ser ha sido estudiada en el cerebro de mamíferos incluyendo el humano. Desde los experimentos de Hashimoto et al., se reportó la presencia de la D-ser en diferentes (corteza cerebral, diencéfalo, mesencéfalo, el cerebelo entre otras) regiones del cerebro de la rata (Hashimoto et al., 1993). La D-ser es un agonista selectivo al sitio de unión a glicina en los NMDAR (Wolosker et al., 1999). Al igual que la glicina, la D-ser actúa sobre las subunidades NR1 y NR2 incrementando la acción de glutamato en estos receptores (Yang et al., 2003). A diferencia de la glicina, la expresión de la D-ser co-localiza con los NMDAR (Hashimoto et al., 1993). El papel crucial de la D-ser en la función de los NMDAR ha sido ampliamente estudiado en cultivos y en rebanadas de hipocampo (Yang et al., 2003; Hennenberger et al., 2010, Panatier et al., 2006). En particular, la eliminación de la D-ser endógena con DAAO, promueve una marcada inhibición de la LTP, lo cual en contraste con la inhibición de glicina no provoca cambio alguno en la LTP (Yang et al., 2003).

### Fuentes:

- Araque, A., Sanzgiri, R. P., Parpura, V. & Haydon, P. G. (1998).** *Calcium elevation in astrocytes causes an NMDA receptor-dependent increase in the frequency of miniature synaptic currents in cultured hippocampal neurons.* J. Neurosci. 18, 6822–6829.
- Bezzi, P. et al (2004).** *Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate.* Nature Neurosci. 7,613–620 (2004).
- Cahoy, J. D. et al. (2008).** *A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function.* J. Neurosci. 28, 264–278 (2008).
- Fiacco, T. A. et al. (2007).** *Selective stimulation of astrocyte calcium in situ does not affect neuronal excitatory synaptic activity.* Neuron 54, 611–626.
- Fonnum, F., Johnsen, A. & Hassel, B (1997).** *Use of fluorocitrate and fluoroacetate in the study of brain metabolism.* Glia 21, 106–113.
- Hamilton N. B. & Attwell D. (2010)** *Do astrocytes really exocytose neurotransmitters?.* Nature reviews. Neuroscience vol. 11:042010-227

**Hashimoto, A., Kumashiro, S., Nishikawa, T., Oka, T., Takahashi, K., Mito, T., Takashima, S., Doi, N., Mizutani, Y., Yamazaki, T., Kaneko, T. & Ootomo, E.** (1993). *J. Neurochem.* 61, 783-786.

**Henneberger C, Popuin T, Oliet SHR & Rusakov AD** (2010). *Long-term Potentiation depends on release of D-serine From astrocytes.* Nature doi: 10.1038

**Hepp, R. et al.** (1999). *Cultured glial cells express the SNAP-25 analogue SNAP-23.* *Glia* 27, 181–187.

**Jourdain, P. et al.** (2007) *Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength.* *Nature Neurosci.* 10, 331–339.

**Kartvelishvily, E., Shleper, M., Balan, L., Dumin, E. & Wolosker, H.** (2006). *Neuron-derived D-serine release provides a novel means to activate N-methyl-D-aspartate receptors.* *J. Biol. Chem.* 281, 14151–14160.

**Maienschein, V., Marxen, M., Volkandt, W. & Zimmerman, H** (1999). *A plethora of presynaptic proteins associated with ATP-storing organelles in cultured astrocytes.* *Glia* 26, 233–244.

**Martineau, M., Galli, T., Baux, G. & Mothet, J.-P.** (2008) *Confocal imaging and tracking of the exocytotic routes for D-serine-mediated gliotransmission.* *Glia* 56, 1271–1284.

**Parpura, V., Fang, Y., Basarsky, T., Jahn, R. & Haydon, P.** (1995). *Expression of synaptobrevin II, cellubrevin and syntaxin but not SNAP-25 in cultured astrocytes.* *FEBS Lett.* 377, 489–492.

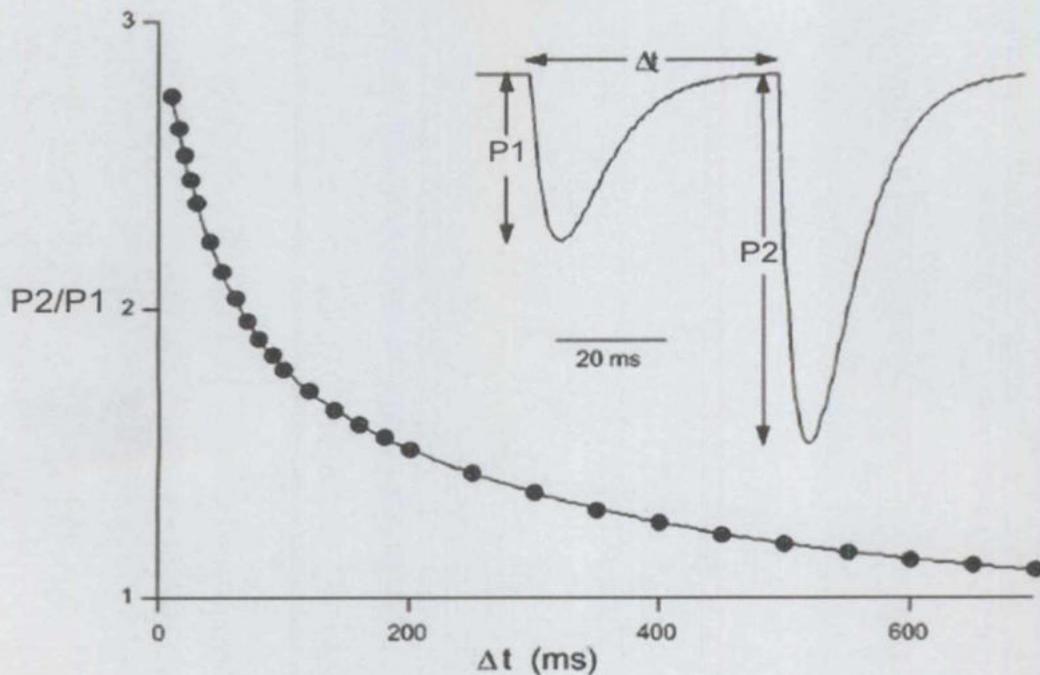
**Wolosker H, Sheth KN, Takahashi M, Mothet JP, Brady RO Jr, Ferris CD, and Snyder SH** (1999). *Purification of serine racemase: biosynthesis of the neuromodulator D-serine.* *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 721–725.

**Yang Y, Ge W, Chen Y, Zhang Z, Shen W, Wu C, Poo M Y Shumin D.** (2003). *Contribution of Astrocytes to Hippocampal Long-Term Potentiation Through Release of D-Serine.* *Pnas.* 100: 15194.

## Anexo 2

### Pulsos pareados: Facilitación por pulsos pareados

La estimulación eléctrica de las neuronas presinápticas desencadena la apertura de canales de  $K^+$  y  $Na^+$  induciendo un potencial de acción que recorre la terminal axónica (Kandel 2002). La despolarización de la membrana provoca además la apertura de canales de  $Ca^{+2}$  dependientes de voltaje, y un incremento en la concentración de  $Ca^{+2}$  intracelular que produce la liberación de neurotransmisores (Kandel 2002). La aplicación de dos estímulos eléctricos (E1 y E2 respectivamente) sobre la presinapsis (protocolo de pulsos pareados, PP), produce 2 respuestas postsinápticas (P1 y P2 respectivamente) cuyo análisis permite discriminar experimentalmente los mecanismos pre y postsinápticos (Fisher et al., 1997). Este protocolo produce un cambio en la eficiencia sináptica que depende, entre otras cosas, de la intensidad de estimulación y del intervalo de tiempo entre cada pulso. Así, al aplicarse E2 con un tiempo de entre 50-100 ms de E1, las concentraciones de  $Ca^{+2}$  se encuentran aún incrementadas por el E1, a lo que se le llama  $Ca^{+2}$  residual (Katz & Miledi 1968; Rosenthal 1969; Weinreich 1971). Este  $Ca^{+2}$  residual junto con la despolarización provocada por el E2 aumenta la probabilidad de liberación del neurotransmisor con respecto a E1 (Fisher et al., 1997), lo que implica un incremento de la amplitud de la respuesta del P2. La variación del tiempo entre E1 y E2 determinará el grado de PPF. De esta manera, existe una relación inversa entre el intervalo y la proporción de P2/P1 (Figura 14). El cambio en la proporción P2/P1 generada por la PPF puede indicar un efecto pre o postsináptico (Zucker & Regehr, 2002). El efecto presináptico en la PPF provoca un cambio en la proporción entre P2 y P1, indicando un cambio en la liberación de neurotransmisor (Zucker & Regehr, 2002). El efecto postsináptico se ve reflejado en el mantenimiento de la proporción P2/P1, lo que puede ser explicado por un mayor reclutamiento de receptores por parte de la neurona postsináptica, sin que esto provoque un cambio en la probabilidad liberación de neurotransmisor de la presinapsis (Zucker & Regehr, 2002).



**Figura 14.- Variación en la proporción P2/P1 en relación al intervalo de tiempo entre el pulso 1 y el pulso 2.** La proporción está determinada por la amplitud del pulso 2 entre la amplitud del pulso 1, siendo la variación del tiempo ( $\Delta t$ ) entre la generación de los pulsos, lo que determina la facilitación por pulsos pareados (PPF). A menor tiempo entre pulsos mayor facilitación, a mayor tiempo entre pulsos menor facilitación (modificado de Zucker & Regehr, 2002).

#### Fuentes:

**Katz B & Miledi R.** (1968). *The role of calcium in neuromuscular facilitation.* *J. Physiol.* 195:481-92

**Rosenthal J.** (1969). *Post-tetanic potentiation at the neuromuscular junction of the frog.* *J. Physiol.* 203:121-33

**Weinreich D.** (1971). *Ionic mechanism of post-tetanic potentiation at the neuromuscular junction of the frog.* *J. Physiol.* 212:431-46

**Fisher SA, Fischer TM, Carew TJ.** (1997). *Multiple overlapping processes underlying short-term synaptic enhancement.* *Trends Neurosci.* 20:170-77

**Zucker R. S & Regehr W.G** (2002). *Short-term synaptic plasticity.* *Annu. Rev. Physiol* 64.355-405

## I. BIBLIOGRAFÍA

**Abraham W.C.**, Mason-Parker S.E., Williams J. y Dragunow M. (1994). *Analysis of the decremental nature of LTP in the dentate gyrus*. Brain Research. Molecular Brain Research, 30, 367-372.

**Alkondon M & Albuquerque EX** (2001) *Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 and alpha4beta2 subtypes differentially control GABAergic input to CA1 neurons in rat hippocampus*. J Neurophysiol 86(6):3043–3055

**Alkondon M**, Pereira EF, Barbosa CT, Albuquerque EX. (1997). *Neuronal nicotinic acetylcholine receptor activation modulates gamma-aminobutyric acid release from CA1 neurons of rat hippocampal slices*. J. Pharmacol. Exp. Ther. 283:1396–411

**Amaral & Lavanex** (2007). *Hippocampal Neuroanatomy*. En: *Hippocampus Book*. Eds. Andersen P, Morris R, Amaral D, Blis T, O'Keefe J, Oxford Neuroscience Ser. USA, Oxford University Press.

**Anwyl R** (1996). *The role of amino acid receptors in synaptic plasticity* En: *Molecular and Cellular Neurobiology: Cortical plasticity LTP and LTD*. Eds. Fazeli MS & Collingridge GL. BIOS Scientific Publishers Limited

**Araque A.**, Sanzgiri R. P., Parpura V. and Haydon P. G. (1999). *Calcium Elevation In Astrocytes causes an NMDA Receptor-Dependent increase in the frequency Of miniature synaptic currents in cultured hippocampal neurons*. J. Neurosci. 18, 6822–6829.

**Ascher P**, Nowak L (1988) *The role of divalent cations in the Nmethyl-D-aspartate responses of mouse central neurones in culture*. J Physiol 399:247–266

**Benke TA**, Bresinck I, Collett VF, Doherty AF, Henley FM y Collingridfe GL. (1996). *Post-translational mechanisms wich could underlie the postsynaptic expression of LTP and LTD* En: *Molecular and Cellular Neurobiology: Cortical plasticity LTP and LTD*. Eds. Fazeli MS & Collingridge GL. BIOS Scientific Publishers Limited

**Benke TA**, Bresinck I, Collett VF, Doherty AF, Henley FM y Collingridfe GL. (1996). *Post-translational mechanisms wich could underlie the postsynaptic expression of LTP and LTD* En: *Molecular and Cellular Neurobiology: Cortical*

*plasticity LTP and LTD*. Eds. Fazeli MS & Collingridge GL. BIOS Scientific Publishers Limited

**Birks JL** (2006) *Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease*. *Cochrane Database. Syst Rev* (1):CD005593

**Bliss TV and Collingridge GL.** (1993). *A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus*. *Nature* 361: 31–39.

**Bliss TV, Lomo T** (1973). *Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path*. *J Physiol.* Jul;232(2):331–356.

**Bliss TVP & Fazeli MS** (1996). *The locus of expression of NMDA receptor-dependent LTP in the hippocampus* En: *Molecular and Cellular Neurobiology: Cortical plasticity LTP and LTD*. Eds. Fazeli MS & Collingridge GL. BIOS Scientific Publishers Limited

**Boitiano S,** Dirksen ER, Sanderson MJ (1992). *Intercellular propagation of calcium waves mediated by inositol trisphosphate*. *Science* 258:292-295.

**Burnashev N,** Zhou Z, Neher E, Sakmann B. (1995). *Fractional calcium currents through recombinant GluR channels of the NMDA, AMPA and kainate receptor subtypes*. *J Physiol* 485 (Part 2):403– 418.

**Calabuig G JA & Villanueva CE** (2004) *Medicina legal y toxicología*. Edición 6 MASSON, SA. Barcelona (España)

**Cornell-Bell AH,** Finkbeiner SM, Cooper MS, and Smith SJ (1990). *Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: longrange glial signaling*. *Science* 247: 470–473.

**Dani, J.A.** (2001). *Biol. Psychiatry* 49, 166–174.

**Diamond DM,** Dunwiddie TV, and Rose GM (1988). *Characteristics of hippocampal primed burst potentiation in vitro and in the awake rat*. *J Neurosci* 8: 4079–4088.

**Dingledine, R.,** Borges, K., Bowie, D. and Traynelis, S.F. (1999). *The glutamate receptor ion channels*. *Pharmacolog. Rev.* 51, 7-61.

**Duan S.,** Anderson C. M., Keung E. C., Chen Y., Chen Y. and Swanson R. A. (2003) *P2X7 receptor-mediated release of excitatory amino acids from astrocytes*. *J. Neurosci.* 23, 1320–1328

**Dupuy ST**, Houser CR. (1997) *Developmental changes in GABA neurons of the rat dentate gyrus: an in situ hybridization and birthdating study*. J Comp Neurol. 389, 402-18.

**Duvernoy M. H.** (2005). *The Human hippocampus: Functional anatomy, vascularization and serial sections with MRI*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Germany Third edition. 6-9

**Emptage NJ**, Reid CA, Fine A. (2001). *Calcium stores in hippocampal synaptic boutons mediate short-term plasticity, store-operated Ca<sup>2+</sup> entry, and spontaneous transmitter release*. Neuron 29:197–208.

**Fellin T**, Pascual O, Gobbo S, Pozzan T, Haydon PG, and Carmignoto G (2004). *Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors*. Neuron 43: 729–743.

**Fellin T**, Pascual, y Haydon P. (2006a). *Astrocytes Coordinate Synaptic Networks: Balanced Excitation and Inhibition*. Physiol. 21: 208-215.

**Forrest D**, Yuzaki M, Soares HD, Ng L, Luk DC, Sheng M, Steward CL, Morgan JI, Connor JA, Curran T (1994) *Targeted disruption of NMDA receptor 1 gene abolishes NMDA response and results in neonatal death*. Neuron 12:325–338.

**Fucile S**, Renzi M, Lauro C, Limatola C, Ciotti T, Eusebi F. (2004). *Nicotinic cholinergic stimulation promotes survival and reduces motility of cultured rat cerebellar granule cells*. Neuroscience 127: 53–61.

**Fuji S**, Ji Z, Morita N, Sumikawa K (1999). *Acute and chronic nicotine exposure differentially facilitate the induction of LTP*. Brain Research. ELSEVIER.

**Fujii S**, Ji Z, Sumikawa K (2000) *Inactivation of alpha7 ACh receptors and activation of non-alpha7 ACh receptors both contribute to long term potentiation induction in the hippocampal CA1 region*. Neurosci Lett 286(2):134–138

**Gahring LC**, Persiyanov K, Togers SW (2004). *Neuronal and astrocyte expression of nicotinic receptor subunit  $\beta 4$  in the adult mouse brain*. J Comp Neurol 468:322-333

**Gotti C**, Zoli M, Clementi F. (2006). *Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance*. Trends Pharmacol Sci 27:482-491

**Graham AJ**, Ray MA, Perry EK, Jaros E, Perry RH, Volsen SG, Bose S, Evans N, Linstrom J, Court JA (2003). *Differential nicotinic acetylcholine receptor subunit expression in the human hippocampus*. J Chem Neuroanat. 25:97-113

**Gray R**, Rajan AS, Radcliffe KA, Yakehiro M, Dani JA. (1996). *Hippocampal synaptic transmission enhanced by low concentrations of nicotine*. Nature 383:713-16

**Halassa M. M.**, Fellin T. And Haydon P. G. (2007). *The Tripartite Synapse: Roles For Gliotransmission In Health And Disease*. Trends Mol. Med. 13, 54-63.

**Hassinger TD**, Guthrie PB, Atkinson PB, Bennett MV, and Kater SB (1996). *An extracellular signaling component in propagation of astrocytic calcium waves*. Proc Natl Acad Sci USA 93: 13268- 13273.

**Haydon P y Carmignoto G.** (2006). *Astrocyte Control of Synaptic Transmission And Neurovascular Coupling*. Physiol Rev. 86: 1009-1031

**He J et al** (2000) *Long-term potentiation induced by nicotine in CA1 region of hippocampal slice is Ca(2+)-dependent*. Acta Pharmacol Sin 21(5):429-432

**Henneberger C**, Popuin T, Oliet SHR & Rusakov AD (2010). *Long-term Potentiation depends on release of D-serine From astrocytes*. Nature doi: 10.1038

**Ikezu**, Tsuneya; Gendelman, Howard E. (Eds.) (2008). *Neuroimmune Pharmacology*, L, 828 P. 164 Illus., 40 In Color. With Cd-Rom., Hardcover ISBN: 978-0-387-72572-7

**Ji D & Dani JA** (2000) *Inhibition and disinhibition of pyramidal neurons by activation of nicotinic receptors on hippocampal interneurons*. J Neurophysiol 83(5):2682-2690

**Jones S**, Lo H & Sidney AS (2002). *Nicotinic receptors in the periphery*. En: *Nicotinic Receptors in the nervous System*. Methods & new frontiers in neuroscience series, Ed. Levin ED. (2002). Boca Raton, CRC PRESS

**Kandel ER (2002)**. *Cellular Mechanisms of learning and the biological basis of Individuality*. En: Principles of neural Science. Eds. Kandel ER, Schwartz J.H., Jessell T.M. Mc Graw-Hill medical; 4 edition.

**Kenney JW & Gould TJ** (2008). *Modulation of Hippocampus-Dependent Learning and Synaptic Plasticity by Nicotine*. *Mol. Neurobiol* 38:101-121

**Kullmann D** (2007). *Synaptic Function*. En: *Hippocampus Book*. Eds. Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J, Oxford Neuroscience Ser. USA, Oxford University Press.

**Larson J, Wong D, and Lynch G** (1986). *Patterned stimulation at the theta frequency is optimal for the induction of hippocampal longterm potentiation*. *Brain Res* 368: 347–350.

**Leinekugel X, Khalilov I, McLean H, Caillard O, Gaiarsa JL, Ben-Ari Y, Khazipov R.** (1999) *GABA is the principal fast-acting excitatory transmitter in the neonatal brain*. *Adv Neurol.* 79, 189-201.

**Levin ED & Rezvani AH** (2002). *Nicotinic Involvement in Cognitive Function of rats*. En: *Nicotinic Receptors in the nervous System. Methods & new frontiers in neuroscience series*, Ed. Levin ED. (2002). Boca Raton, CRC PRESS

**Levin ED & Rezvani AH** (2002). *Nicotinic Involvement in Cognitive Function of rats*. En: *Nicotinic Receptors in the nervous System. Methods & new frontiers in neuroscience series*, Ed. Levin ED. (2002). Boca Raton, CRC PRESS

**Lewis M S, Heitkemper McL M y Ruff Dirksen RS, O'Brien GP, Giddens FJ y Bucher L** (2004). *Medical-Surgical Nursing*. Mosby, Inc., an Elsevier Imprint

**Luetje CW & Patrick J** (1991). *Both  $\alpha$ - and  $\beta$ - subunits contribute to the agonist sensitivity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors*. *J. Neurosci.* 11:837-845

**Lynch MA** (2003). *Long-term Potentiation and memory*. *Physiol Rev* 84:87-136

**Maggi L, Le Magueresse C, Changeux JP, Cherubini E.** (2003). *Nicotine activates immature "silent" connections in the developing hippocampus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:2059–2064.

**Malenka RC, Nicoll RA** (1999) *Long-term potentiation: a decade of progress?* *Science* 285:1870 –1874.

**Matthias K**, Kirchhoff F, Seifert G, Hüttmann K, Matyash M, Kettenmann H, Steinhäuser C. (2003). *Segregated expression of AMPA-type glutamate receptors and glutamate transporters defines distinct astrocyte populations in the mouse hippocampus*. *J Neurosci*. 23: 1750-1758

**Meier SD**, Kafits KW, Rose CR (2008). *Developmental profile and mechanisms of GABA-induced calcium signaling in hippocampal astrocytes*. *Glia* 56:1127-1137

**Morris RG**, Anderson E, Lynch GS, and Baudry M. (1986). *Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5*. *Nature* 319: 774–776.

**Mothet JP**, Pollegioni L, Ouanounou G, Martineau M, Fossier P, and Baux G (2005). *Glutamate receptor activation triggers a calcium-dependent and SNARE protein-dependent release of the gliotransmitter D-serine*. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 5606–5611,

**Nedergaard M** (1994). *Direct signaling from astrocytes to neurons in cultures of mammalian brain cells*. *Science* 263: 1768–1771.

**Ni Y**, Markey EB & Parpura V (2007). *Vesicular release of glutamate mediates bidirectional signaling between astrocytes and neurons*. *J. Neurochem*

**Nordberg A** (2001). *Nicotinic receptor abnormalities of Alzheimer's disease: therapeutic implications*. *Nat Rev Psychiatry* 49(3)200-210

**Oddo S**, LaFerla FM (2006). *The role of nicotinic acetylcholine receptors in Alzheimer's disease*. *J Physiol Paris*. 99 (2-3):172-179

**Owens DF**, Boyce LH, Davis MB, Kriegstein AR. (1996) *Excitatory GABA responses in embryonic and neonatal cortical slices demonstrated by gramicidin perforated-patch recordings and calcium imaging*. *J Neurosci*. 16, 6414-23

**Panatier, A.** Theodosis DT, Mothet JP, Touquet B, Pollegioni L, Poulain DA, Oliet SH (2006) *Glia-derived D-serine controls NMDA receptor activity and synaptic memory*. *Cell* 125, 775–784.

**Parpura V**, Basarsky TA, Liu F, Jęftinija K, Jęftinija S, and Haydon PG (1994). *Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling*. *Nature* 369: 744–747.

**Paxinos G & Watson C** (1998). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* 4 ed. Academic Press, San Diego, California.

**Purves D**, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, LaMantia A-S, Williams SM (2004). *Neuroscience*. 3ed Sinaver, Associates, inc

**Roberson ED**, English JD & Sweatt JD N (1996). *Second messengers in LTP and LTD*. En: *Molecular and Cellular Neurobiology: Cortical plasticity LTP and LTD*. Eds. Fazeli MS & Collingridge GL. BIOS Scientific Publishers Limited

**Saéz JC**, Conner JA, Spray DC, (1989). *Hepatocyte gap junctions are permeable to the second messenger, inositol 1,4,5-trisphosphate, and to calcium ions*. Proc Nat Acad Sci 86:2708-2712.

**Santiago Ramón y Cajal** (1911). *Alteraciones de la sustancia gris provocadas por conmoción y aplastamiento*. Trab. del Lab. de Invest. Biol. 1911.

**Schell MJ**, Brady RO Jr, Molliver ME, and Snyder SH (1997). *D-Serine as a neuromodulator: regional and developmental localizations in rat brain glia resemble NMDA receptors*. J Neurosci 17: 1604–1615.

**Schell MJ**, Molliver ME, and Snyder SH (1995). *D-Serine, an endogenous synaptic modulator: localization to astrocytes and glutamate-stimulated release*. Proc Natl Acad Sci USA 92: 3948–3952.

**Schipke CG & Kettenmann H**. (2004) *Astrocyte responses to neuronal activity*. Glia 47:226-232

**Schuman EM**, Madison DV (1994) *Locally distributed synaptic potentiation in the hippocampus*. Science 263:532-536

**Seeburg PH** (2007) *Molecular mechanisms of synaptic function*. En: *Hippocampus Book*. Eds. Andersen P, Morris R, Amaral D, Blis T, O'Keefe J, Oxford Neuroscience Ser. USA, Oxford University Press.

**Séguéla P**. Wadiche J, Dinley-Miller R, Dani JA & Patrick JW (1993). *Molecular cloning, functional properties and distribution in rat brain  $\alpha 7$ ; a nicotinic cation channel highly permeable to calcium*. J. Neuroscience 13,1595-604.

**Sharma G & Vijayaraghavan S**. (2001). *Nicotinic cholinergic signaling in hippocampal astrocytes involves calcium-induced calcium release from intracellular stores*. Proc Natl Acad Sci USA 98:4148–4153.

**Shigemoto R**, Kinoshita A, Wada E, Nomura S, Ohishi H, Takada M, Flor PJ, Neki A, Abe T, Nakanishi S, Mizuno N. (1997). *Differential presynaptic*

localization of metabotropic glutamate receptor subtypes in the rat hippocampus. *J Neurosci.* 1997 Oct 1;17(19):7503-22.

**Sigurdsson T** (2007). *Long-term potentiation in the amygdale: a cellular mechanism of fear learning and memory.* *Neuropharmacology* 52(1): 215-277

**Sontheimer H & Waxman SG** (1993). *Expression of voltage-activated ion channels by astrocytes and oligodendrocytes in the hippocampal slice.* *J. Neurophysiol.* 70:1863-1873

**Taupin F.** (2007). *The hippocampus neurotransmission and plasticity in the nervous system.* Nova Biomedical books. New York. Nova Science Publishers Inc.

**Tortora GJ & Grabowski SR** (2002). *Principios de Anatomía y Fisiología.* Oxford University Press.

**Vallejo YF, Buisson B, Bertrand D, Green WN.** (2005). *Chronic nicotine exposure upregulates nicotinic receptors by a novel mechanism.* *J. Neurosci.* 25:5563–72

**Verkhratsky A & Butt A** (2007). *Glial neurobiology: a text book.* John Wiley & Sons Ltd. England.

**Verkhratsky A., Orkand R. K. and Kettenmann H.** (1998) *Glial calcium: homeostasis and signaling function.* *Physiol. Rev.* 78, 99–141.

**Vizi ES & Lendvai B.** (1999). *Modulatory role of presynaptic nicotinic receptors in synaptic and non-synaptic chemical communication in the central nervous system.* *Brain Res Brain Res Rev* 30:219–235.

**Ventura T & Harris KM** (1999). *Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes.* *J Neurosci* 19:6897-6906.

**Volterra A & Meldolesi J** (2005). *Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues.* *Nat Rev Neurosci* 6: 626–640, 2005.

**Wisden W, Errington ML, Williams S, Dunnet SB, Waters C, Hitchcock D, Evan G, Bliss TVP, Hunt SP** (1990). *Differential expression of immediate early genes in the hippocampus and spinal cord.* *Neuron* 4: 603-614

**Wolosker H, Sheth KN, Takahashi M, Mothet JP, Brady RO Jr, Ferris CD, and Snyder SH** (1999). *Purification of serine racemase: biosynthesis of the neuromodulator D-serine.* *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 721–725.

**Xiong H**, (2008). *Hippocampus Neuroimmune pharmacology*.En: *Neuroimmune pharmacology*,Eds. Ikezu T. and Gendelman H.E. (ed). Springer US 55-64

**Yang Y**, Ge W, Chen Y, Zhang Z, Shen W, Wu C, Poo M Y Shumin D. (2003). *Contribution of Astrocytes to Hippocampal Long-Term Potentiation Through Release of D-Serine. Pnas.* 100: 15194.